

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**INMUNOTOXINAS ANTITUMORALES BASADAS EN  
RIBONUCLEASAS EXTRACELULARES: TRAS LOS  
PASOS DE PAUL EHRLICH**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Jaime M<sup>a</sup> Tomé Amat**

**Bajo la dirección del doctor**

**Javier Lacadena García-Gallo**

**Madrid, 2013**



**INMUNOTOXINAS ANTITUMORALES BASADAS  
EN RIBONUCLEASAS EXTRACELULARES.**

**TRAS LOS PASOS DE PAUL EHRLICH**

**JAIME M<sup>a</sup> TOMÉ AMAT**

A mi padre. A mi madre.  
A Marieti. A Marta.



Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**INMUNOTOXINAS ANTITUMORALES  
BASADAS EN RIBONUCLEASAS  
EXTRACELULARES.  
TRAS LOS PASOS DE PAUL EHRLICH**

JAIME M<sup>a</sup> TOMÉ AMAT

TESIS DOCTORAL

Director:

Dr. Javier Lacadena García-Gallo

Madrid, 2012

V°B°

Dr. Javier Lacadena García-Gallo  
Director de la Tesis Doctoral

Jaime M<sup>a</sup> Tomé Amat  
El Doctorando

## ABREVIATURAS:

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

APC: célula presentadora de antígeno

CDC: citotoxicidad dependiente de anticuerpo

CDR: regiones de hipercomplementariedad

CRC: cancer colorrectal

CTI: efecto citotóxico

DAB: diaminobenzidina

DNA: ácido desoxirribonucleico

dsFv: dominio Fv de un anticuerpo estabilizado por puentes disulfuro

DT: toxina diftérica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FITC: isotiocianato

mAb: anticuerpo monoclonal

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio

PE: exotoxina A de *Pseudomonas*

PMSF: fenilmetanosulfonilfluorido

Poli(A): polinucleótido de adenina

Poli(G): polinucleótido de guanina

RIP: proteína inactivante de ribosomas

RNA<sub>m</sub>: RNA mensajero

RNA<sub>r</sub>: RNA ribosómico

RNasa: ribonucleasa

scFv: dominio Fv de anticuerpo de cadena única

SDS: dodecilsulfatoódico

SRL: lazo sarcina-ricina

TAA: antígenos asociados a tumor

TAE: tris-EDTA

TSA: antígenos específicos de tumor

VLS: síndrome de fragilidad vascular

# INDICE

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	13
0.- CRONICA DE UNA VIEJA ENFERMEDAD: DE IMHOTEP A PAUL EHRLICH	15
1.- EL CANCER DE COLON	19
1.1.- INCIDENCIA Y DISTRIBUCION	19
1.2.- DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO	22
2.- INMUNOTERAPIA: ANTIGENOS Y ANTICUERPOS	23
2.1.- MARCADORES TUMORALES	24
2.2.- EL ANTICUERPO MONOCLONAL COMO "ARMA" TERAPEUTICA	25
3.- INMUNOTOXINAS E INMUNORRIBONUCLEASAS	29
3.1.- EVOLUCION EN EL DISEÑO DE INMUNOTOXINAS	31
3.2.- MECANISMO DE ACCIÓN	36
4.- GPA33 Y mAbA33: UNA PAREJA MODELO	40
4.1.- EL ANTIGENO GPA33	40
4.2.- EL ANTICUERPO MONOCLONAL mAbA33	42
5.- RIBONUCLEASAS EXTRACELULARES FUNGICAS	44
5.1.- LA RNasaT1	46
5.2.- LAS RIBOTOXINAS	47
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y METODOS	61
1.- MATERIALES	63
1.1.- TIPOS CELULARES Y ORGANISMOS	63
1.2.- VECTOR DE CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN EN <i>P.pastoris</i>	66
1.3.- MEDIOS DE CULTIVO	67
1.4.- TAMPONES	67
2.- METODOLOGÍA	70
2.1.- TECNICAS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS	70
2.2.- TECNICAS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE PROTEINAS	73
2.3.-METODOLOGÍA REFERENTE A LA CARACTERIZACIÓN DE LA INTEGRACIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO	77
2.4.- TECNICAS DE CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEOLÍTICA	80
2.5.- TECNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA	83
2.6.- <i>IN VIVO</i>	86
RESULTADOS	87

BLOQUE 1: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INMUNOTOXINAS E INMUNORRIBONUCLEASAS	91
1.1.- LOS DOMINIOS VARIABLES scFvA33	92
1.1.1.- OBTENCIÓN DEL PLASMIDO pPICZ $\alpha$ AscFvA33	92
1.1.2.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE scFvA33	92
1.1.3.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	94
1.1.4.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	95
1.2.- INMUNOTOXINA scFvA33 $\alpha$ -sarcina (IMTXA33 $\alpha$ S)	97
1.2.1.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IMTXA33 $\alpha$ S	98
1.2.2.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	99
1.2.3.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	100
1.3.- inmunoRNasa BASADA EN LA RNasaT1 (IMTXA33T1)	109
1.3.1.- DISEÑO Y OBTENCIÓN DEL PLASMIDO pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33T1	110
1.3.2.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IMTXA33T1	110
1.3.3.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	111
1.3.4.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	112
1.4.- INMUNOTOXINA BASADA EN LA HtA W68/71/75F (HtA3 $\Delta$ W)	118
1.4.1.- DISEÑO Y OBTENCIÓN DEL PLASMIDO pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33-HtA3 $\Delta$ W	119
1.4.2.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA IMTXA33HtA3 $\Delta$ W	120
1.4.3.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL	121
1.4.4.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL	122
 BLOQUE 2: ESTUDIO DE LAS RUTAS INTRACELULARES DE PROCESAMIENTO DE LAS INMUNOTOXINAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.	 125
“UNA IMAGEN VALE MÁS QUE MIL PALABRAS”	
2.1.- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INMUNOTOXINAS MARCADAS	128
2.2.- ESTUDIOS DE LA UNIÓN Y RUTAS INTRACELULARES	130
2.2.1.- IMTX A33 $\alpha$ -sarcina Alexa-555 (IMTXA33 $\alpha$ S-555)	130
2.2.2.- inmunoRNasaA33T1 Alexa-555 (IMTXA33T1-555)	136
2.2.3.- IMTX A33 HtA3 $\Delta$ W Alexa-555 (IMTXA33 HtA3 $\Delta$ W -555)	140
 BLOQUE 3: CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA IMTXA33 $\alpha$ S	 145
3.1.- GENERACIÓN DE TUMORES	146
3.2.- ESTUDIO DEL EFECTO ANTITUMORAL DE IMTXA33 $\alpha$ S	147
3.2.1.- PRIMER ENSAYO ANTITUMORAL	147
3.2.2.- SEGUNOD ENSAYO ANTITUMORAL	152
 DISCUSIÓN	 157
1.- LAS INMUNOTOXINAS	159
2.- ANTIGENO GPA33-ANTICUERPO mAbA33	160
3.- TOXINAS	161
4.- INMUNOTOXINAS BASADAS EN LOS scFvA33	162
4.1.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS INMUNOTOXINAS	163

4.2.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS INMUNOTOXINAS	164
4.3.- <i>TRAFFICKING</i>	169
4.4.- CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA IMTXA33αS	173
CONCLUSIONES	177
COROLARIO	181
BIBLIOGRAFÍA	187



## RESUMEN

Han pasado más de 100 años desde que el laureado premio Nobel, Paul Ehrlich, introdujese el concepto de “*bala mágica*”, refiriéndose a una molécula con la capacidad de actuar específicamente sobre un determinado tipo de células. Este concepto supuso una revolución en la terapia y tratamiento de enfermedades, pues implicaba actuar solamente sobre las células dañadas, sin afectar al resto del organismo. Décadas después, su teoría de la actividad específica se hizo realidad revolucionando la terapia convencional, con la aparición del anticuerpo monoclonal y la aplicación de su exquisita especificidad en la inmunoterapia.

Las inmunotoxinas suponen un paso más allá, combinando la especificidad de un anticuerpo por un antígeno tumoral con una actividad enzimática responsable de la muerte de la célula diana. Así, el dominio marcador dirige la acción del dominio tóxico. Este diseño ha evolucionado hacia la obtención de construcciones de menor tamaño más efectivas frente a tumores sólidos, siendo su máximo exponente las scFv-inmunotoxinas recombinantes. La utilización de anticuerpos que reconocen distintos antígenos específicos de tumor, como dominio tóxico; y de diferentes tipos de toxinas o RNAsas, como dominio tóxico, han permitido crear una gran diversidad de construcciones, potencialmente interesantes en el tratamiento contra el cáncer.

Nuestro grupo de investigación lleva décadas ahondando en las relaciones estructura-función de ribonucleasas extracelulares microbianas, habiendo estudiado en profundidad los mecanismos de actuación de las ribotoxinas  $\alpha$ -sarcina e hirsutelina A, dos ribonucleasas citotóxicas, capaces de inactivar el ribosoma. En la presente Tesis se han utilizado estas ribotoxinas, o variantes de ellas, como constituyentes del dominio tóxico de inmunotoxinas; así como la RNasaT1, otra ribonucleasa microbiana, pero de carácter no tóxico. Las inmunotoxinas cuya caracterización se presentan en esta Tesis Doctoral tienen como dominio marcador los dominios variables del anticuerpo monoclonal A33 (scFvA33), que reconocen específicamente al antígeno GPA33, antígeno específico de tumor, que se presenta en el 95% de los tumores de colon, estando ausente en tejidos normales.

En la presente tesis doctoral se aborda la caracterización estructural y funcional de estas inmunotoxinas basadas en RNAsas extracelulares. Los resultados indican una elevada especificidad y eficacia citotóxica de las inmunotoxinas purificadas. Los resultados se discuten en términos de las diferencias encontradas en cuanto a dicha eficacia y especificidad y su capacidad o no para interactuar con membranas celulares; y en sus diferencias como ribonucleasas.



## **INTRODUCCIÓN**



## 0.- CRÓNICA DE UNA VIEJA ENFERMEDAD: DE IMHOTEP A PAUL EHRLICH

Pretender hacer una breve introducción o presentar los antecedentes históricos sobre una enfermedad como el cáncer, no sólo es prácticamente imposible dada la cantidad de información de la que se dispone acerca de su origen, su incidencia, su diagnóstico o su tratamiento; sino que incluso podría llegar a ser presuntuoso. De hecho, esta palabra, “cáncer” se hace presente a diario, no sólo en un entorno científico, sino en los medios de comunicación más generalistas y en conversaciones “de la gente de la calle”. Incluso, se podría afirmar que “todo el mundo sabe” que en realidad no es una enfermedad, sino muchas, que comparten una característica común: el crecimiento anormal de las células.

Recientemente, en el laboratorio me recomendaron e insistieron para que me leyera un libro sobre el cáncer, que hoy en día casi se ha convertido en un libro de cabecera para nuestro grupo de investigación. Se titula “El emperador de todos los males. Una biografía del cáncer”, de Siddhartha Mukherjee, galardonado con el Premio Pulitzer en 2010. El libro recorre la historia del cáncer, desde la primera descripción de un paciente con cáncer, a la esperanza y sufrimiento de los actuales; de la agresividad de los primeros tratamientos a la exquisita especificidad de los últimos; del miedo y misterio en la opinión pública, al mecenazgo económico y político de visionarios luchadores contra la enfermedad.

Han pasado más de 4000 años desde la primera descripción de un cáncer de mama, realizada por Imhotep (médico y visir en la corte del rey Zoser) y recogida en un manuscrito de alrededor de 2.500 a.c., y copiado posteriormente en un papiro en el siglo XVII a.c. (**Figura 1**) hasta el análisis de los datos contenidos en el Atlas del Genoma del Cáncer (Consortio del Atlas del Genoma del Cáncer y Hospital Johns Hopkins) para su aplicación en la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Durante este tiempo un gran número de científicos, médicos o bacteriólogos; instituciones públicas y privadas han dedicado su esfuerzo en aportar nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer.

Viajando hacia atrás en el tiempo, y saltando por las páginas de “El emperador de todos los males”, nos situamos en excavaciones en las que se descubrieron huellas inequívocas producidas por el cáncer. Restos momificados de hace más de mil años, en el antiguo Egipto, en la India o en la planicie del sur de Perú, con marcas de tumores

óseos o de mama (Breasted, 1922; Miller, 1929; Aufderheide, 2003). Es en la época de Hipócrates, 400 a.c., cuando aparece por primera vez la palabra “*karkinos*”, -cangrejo en griego- para designar el cáncer. Ésta, según Hipócrates, hace referencia al aspecto de un tumor con el racimo de vasos sanguíneos inflamados, que recuerda al de “un cangrejo enterrado en la arena con las patas extendidas”; o a la superficie endurecida del tumor que “evoca al duro caparazón del cangrejo”, o a las punzadas de dolor, como “al quedar atrapado en la pinza de un cangrejo” (recogido en Sigerist, 1932). Posteriormente, se ha relacionado otra palabra griega con el cáncer, “*onkos*”. En este caso haciendo referencia a la “masa o carga” de un tumor.

A



B

*“Si examinas [un caso] con masas abultadas en [los] pechos y compruebas que se han diseminado por él; si pones la mano en [los] pechos y los sientes fríos, sin fiebre alguna en ellos cuando los tocas; no tienen granulaciones, no contienen fluidos y no producen ninguna descarga líquida, pero aparecen protuberantes al tacto, debes decir al respecto: <<Tengo que enfrentarme aquí con un caso de masas abultadas. [...] Los tumores abultados del pecho implican la existencia de hinchazones en él, grandes, extendidas y duras; tocarlas es como tocar una bola de vendas, o bien puede comparárselas a un fruto sanguíneo no maduro, duro y frío al tacto”.*

**Figura 1:** A) Fotografía de un fragmento del papiro del siglo XVII a.c. encontrado por Edwin Smith. B) Fragmento traducido correspondiente al Caso 45, encontrado en dicho papiro (Breasted, J.H. “The Edwin Smith Papyrus”, 1922)

El estudio de la naturaleza del cáncer, desde “la bilis negra” que postulaba Galeno (Galeno, 1586) hasta la asociación de un gen concreto, un oncogén, con un determinado tipo de cáncer, determinó en gran medida el tipo de tratamiento o terapia que se aplicó en cada época. La presencia de “masas” tumorales localizadas, impulsó la cirugía como principal herramienta en la lucha contra el cáncer, haciéndose cada vez más agresiva y radical a finales del siglo XIX, debido a la aparición de recidivas. El descubrimiento de los rayos X en 1895 por Wilhelm Röntgen en Alemania; y del radio por los hermanos Curie, en 1902, supuso un cambio radical en el tratamiento del cáncer. La capacidad penetrante de la energía emitida por estos compuestos permitía eliminar células con preferencia por aquellas que se dividían con mayor rapidez. Así en 1896, se utilizó por primera vez la radioterapia contra un cáncer de mama.

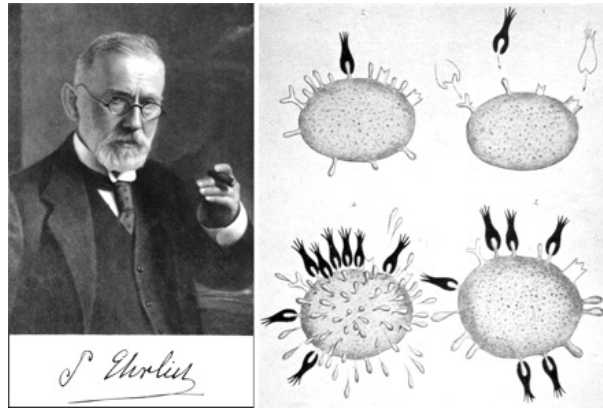
La continua aparición de recidivas y la expansión sistémica de un tumor inicialmente local, cambió nuevamente la estrategia terapéutica. Al ser el cáncer una enfermedad sistémica, era necesario que la cura también lo fuese, lo que desembocó en la búsqueda de drogas que actuaran también de forma sistémica, pero a ser posible protegiendo los tejidos normales. Las primeras drogas surgieron gracias a investigadores que supieron combinar los intereses y conocimientos de la industria textil en la obtención de colorantes, con los primeros indicios de la relación entre “lo natural” y “lo químico”. La obtención de malva de anilina, un potente colorante, a partir de la ebullición de ácido nítrico y benceno (William Perkins, 1856) y la obtención de urea, un compuesto “natural” a partir de cianato de amonio (Friedrich Wöhler, 1828) desencadenaron toda una serie de discusiones que desembocaron en una pregunta: ¿pueden utilizarse compuestos químicos en las células?

Surge aquí la figura de un estudiante de medicina, alemán, cuyos estudios para su Tesis Doctoral se centraron en la utilización de tinturas de telas (anilina) para la tinción de tejidos animales. Así, observó como sólo se marcaban algunas partes de la célula. Es decir, el colorante es capaz de discriminar entre compuestos químicos, que él denominó “ocultos”, dentro de la célula (Ehrlich., 1881). Es la primera vez en que se empieza a hablar de especificidad, un término que le acompañará a lo largo de su carrera.

A partir de estos resultados, en 1882 y en colaboración con Robert Koch desarrolló un método para teñir e identificar el bacilo de la tuberculosis, el cual se sigue usando hoy en día, con pequeñas modificaciones. Posteriormente se centró en la búsqueda de nuevas drogas y colorantes dirigidas a eliminar patógenos causantes de enfermedades, como el rojo tripano, que elimina el parásito *Trypanosoma brucei*, responsable de la enfermedad del sueño; o el compuesto 606, activo contra *Treponema pallidum*, responsable de la sífilis, presentado en 1910 en el Congreso de Medicina Interna de Wiesborden.

Es en esta etapa cuando demuestra la existencia de “antitoxinas” generadas por un organismo al ser inyectado con una toxina, y como aquella es capaz de desactivarla con una especificidad extraordinaria. Esas antitoxinas, son los anticuerpos, identificados muchos años después.

Este estudiante es Paul Ehrlich (**Figura 2**) una figura imprescindible para entender la evolución en el tratamiento de enfermedades, reconocido como uno de los creadores o pioneros de la quimioterapia, y responsable del concepto de afinidad específica. Por este principio de afinidad específica, expuesto en su Teoría de la inmunidad de la cadena lateral,



**Figura 2:** Fotografía de Paul Ehrlich, y uno de los esquemas que explican su Teoría de la inmunidad de la cadena lateral.

recibió el Premio Nobel de Medicina en 1908. En sus comunicaciones, él definía sus drogas como “balas mágicas”, capaces de matar, pero dirigidas exclusiva y específicamente contra un tipo celular. Sus “balas mágicas” tuvieron éxito en el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos, pero no logró encontrar una que fuese eficaz contra el cáncer. Como él describió después, “la afinidad específica se apoya en su contrario, no en la afinidad”. Es decir, las diferencias entre una bacteria, o una enzima bacteriana y su equivalente humano, es lo que hace específica a una droga. Sin embargo las semejanzas entre una célula cancerosa y una normal, evitan el éxito terapéutico de esa misma droga.

Tuvieron que pasar casi 50 años, hasta que aparecieron drogas con una marcada especificidad, como la aminopterina (Sidney Farber, 1947) capaces de actuar frente a células cancerosas que se dividen con rapidez en la médula ósea; y casi treinta más hasta que los anticuerpos irrumpieron en la lucha contra el cáncer como una poderosa herramienta, gracias en gran medida a los trabajos de Kohler y Milstein.

En 1992, se realizó con gran éxito, el primer ensayo clínico con Herceptin (Trastuzumab), un anticuerpo dirigido contra el producto de un oncogén, Her-2, que se sobreexpresa en la variante más agresiva del cáncer de mama. Sólo pasaron tres años entre que se identificó el Her-2 hasta que se obtuvo un anticuerpo humanizado frente a él.

Las “balas mágicas” dirigidas contra el cáncer, imaginadas por Paul Ehrlich, son hoy en día una realidad. La inmunoterapia basada en la especificidad de la molécula del anticuerpo por un antígeno asociado a un tumor, está en continuo desarrollo. El

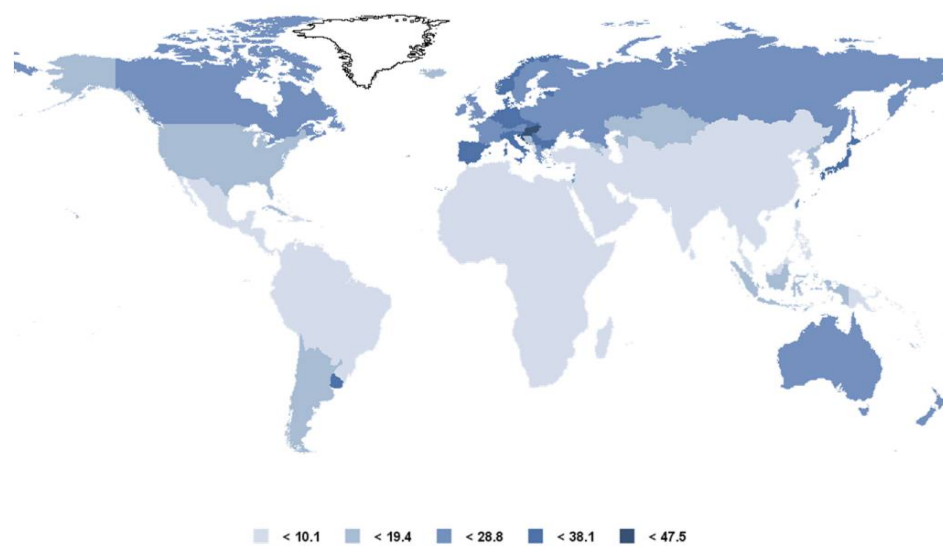
conocimiento que hoy en día se tiene del cáncer, de su biología y de su base genética es enorme, y ha permitido desarrollar nuevas estrategias y fármacos, que permitirían seguir recorriendo la historia del cáncer hasta el día de hoy.

En este caso, el “hoy” en el que se centra esta Tesis Doctoral es en seguir, humildemente, los pasos de Paul Ehrlich, tratando de buscar nuevas “balas mágicas” contra el cáncer. Como comenta Siddhartha Mukherjee en el libro, adaptando lo que le dice la Reina roja a Alicia, en “A través del espejo” de Lewis Carrol: “En el cáncer, estamos obligados a seguir corriendo con el único fin de mantenernos en el mismo sitio”.

## 1.- EL CANCER DE COLON

### 1.1.- Incidencia y distribución

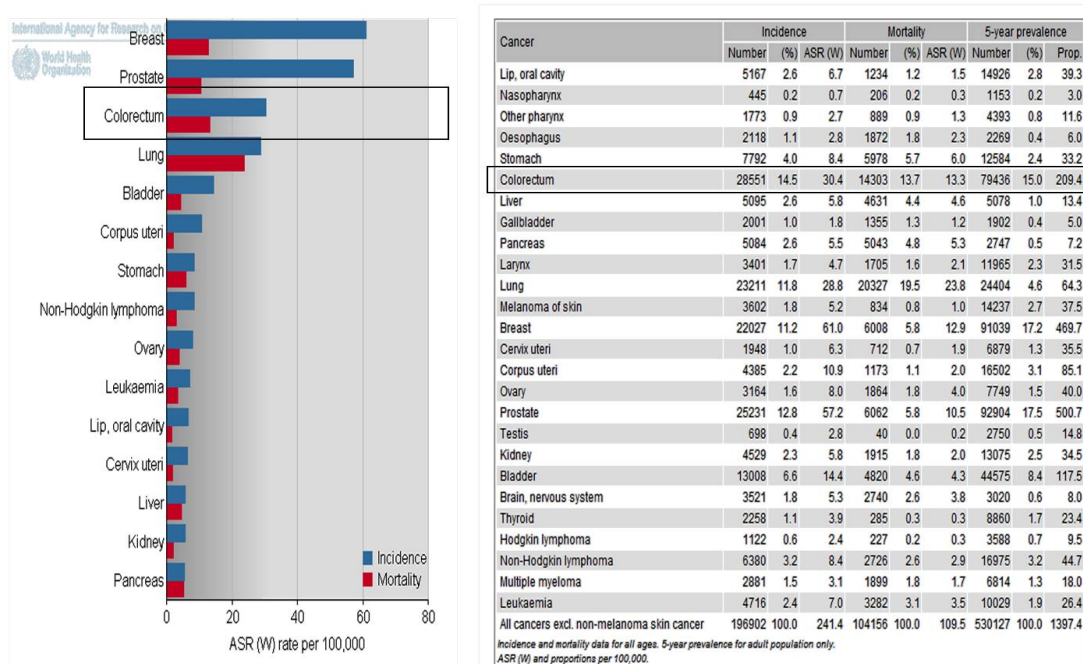
Por cáncer colorrectal (CRC, de sus siglas en inglés), también denominado cáncer de colon, se entiende todo tipo de neoplasia en colon, recto y apéndice. Es la cuarta causa de muerte en hombre (después del de pulmón y próstata, y de muertes por enfermedad cardiovascular) y la tercera en mujer, en el mundo (después del de mama y de la derivada por enfermedad cardiovascular) (**Figura 3**). Se detectan cerca de un millón de nuevos casos de cáncer de colon cada año, a nivel mundial, y aproximadamente medio millón de muertes debido a dicho cáncer (Heath *et al.*, 1997; Heijstek *et al.*, 2005; Siegel *et al.*, 2012).



**Figura 3:** Distribución, a nivel mundial, del número de muertes por cáncer de colon por cada 100000 personas (Referido a ambos sexos, todas las edades) (Fuente: *World Health Organization*, 2008)

Existen diversos factores, bien extrínsecos o intrínsecos, como factores genéticos, que actúan como desencadenantes en las células madre del epitelio intestinal, que pueden acabar derivando en la aparición del tumor o en una predisposición a desarrollar la enfermedad (Leedham *et al.*, 2008). Entre estos factores secundarios que conllevan un incremento en el riesgo de aparición de cáncer de colon, se encuentran la obesidad, una dieta rica en carnes y baja en frutas y vegetales, la ausencia de una actividad física y, por supuesto, fumar. Todo ello relacionado además con la edad del sujeto.

Si atendemos a estos factores, se entiende porque se sugiere una estrecha relación entre la incidencia de cáncer de colon en los diferentes países y lo que se podría denominar “occidentalización”. Así, por ejemplo, en el caso de Estados Unidos, el índice de mortalidad debido a cáncer de colon es mayor, siendo la segunda causa de muerte en hombres y la tercera en mujeres (Center *et al.*, 2009), y si atendemos a los datos de España (**Figura 4**), el cáncer de colon es el segundo en cuanto a causa de muerte.



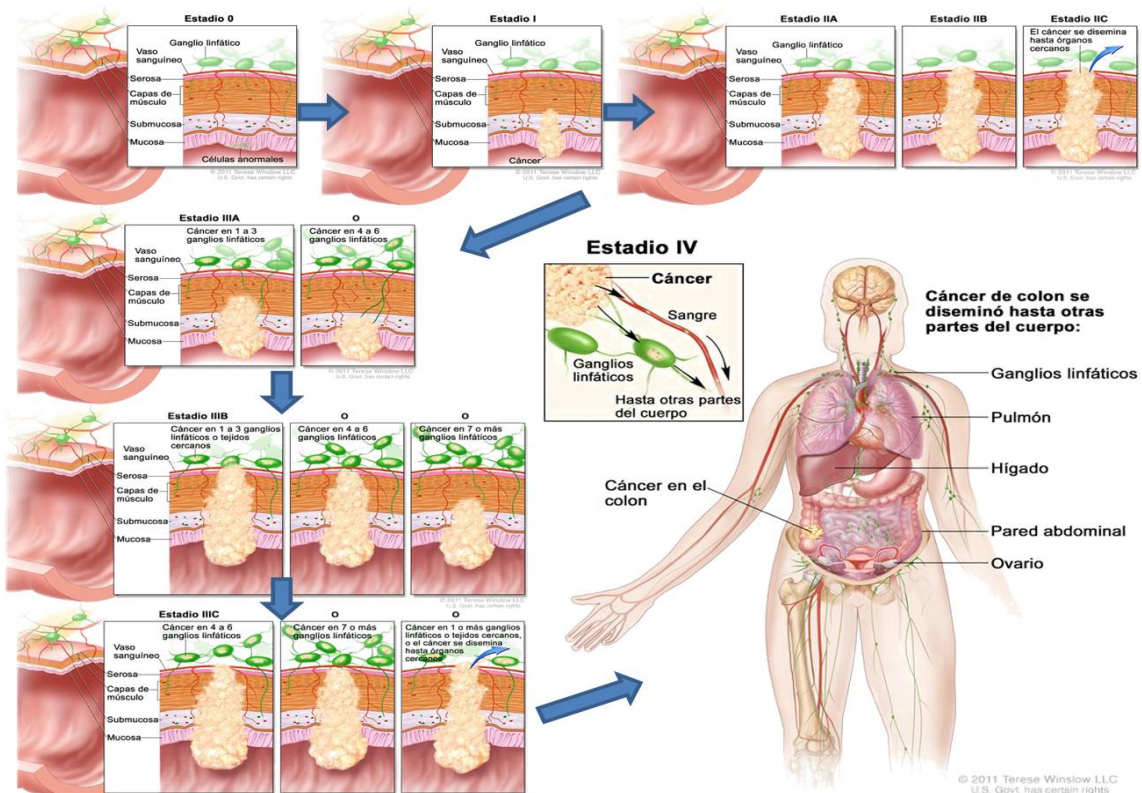
**Figura 4:** Datos sobre incidencia y mortalidad asociada a cáncer en España. A la izquierda se muestra una grafica con los índices por 100000 personas para los distintos tipos de cáncer. A la derecha una tabla con los valores numéricos para cada tipo de cáncer. (Fuente: *International Agency for Research on Cancer (IARC)*)

Su elevado índice de mortalidad se debe en gran parte a que su diagnóstico es tardío, lo que puede ser debido, en parte, a la ausencia de síntomas en los primeros

estadios. En líneas generales se establecen cinco estadios en el desarrollo del cáncer de colon (Datos obtenidos del *National Cancer Institute*; 2012):

1. Estadío 0: El cáncer se encuentra sólo en el revestimiento más interno del colon o del recto.
2. Estadío I: El tumor ha crecido dentro de la pared interior del colon o recto. El tumor no ha atravesado la pared al crecer.
3. Estadío II: El tumor se extiende con más profundidad dentro o a través de la pared del colon o recto. Es posible que haya invadido tejido cercano, pero las células cancerosas no se han diseminado a los ganglios linfáticos.
4. Estadío III: El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos, pero no a otras partes del cuerpo.
5. Estadío IV: El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como al hígado o a los pulmones.

Las dos últimas fases se relacionan con un proceso metastático (**Figura 5**).



**Figura 5:** Representación gráfica de la evolución en el desarrollo del cáncer de colon. (Fuente: *National Cancer Institute*, 2012, USA)

La tasa de supervivencia es inversamente proporcional al avance en el estadio del tumor del paciente. Este hecho se encuentra en concordancia con el elevado índice de mortalidad del CRC, debido a que si atendemos al diagnóstico, el 64% de los casos diagnosticados corresponden con el tercer estadio o superior (Dato obtenido del *National Cancer Institute* (USA); 2012)

## 1.2.- Diagnóstico y tratamiento

El examen para detectar la aparición de CRC se lleva a cabo mediante la realización de una o más de las siguientes técnicas: análisis de sangre presente en heces, sigmoidoscopia, colonoscopia, enema de bario con doble contraste, examen rectal digital.

Si alguna de estas pruebas resulta positiva se suele realizar una biopsia para estudiar si existen células tumorales en el tejido o no. Si la biopsia es positiva se harán diferentes pruebas para examinar el intestino. Además, y haciendo referencia a lo ya comentado anteriormente, se analizará también en la medida de lo posible, los pulmones y el hígado, por si se encontrasen evidencias de posible metástasis.

En el tratamiento del cáncer de colon, se consideran diferentes tratamientos estándar o convencionales. Un ejemplo es la cirugía, en el que se intenta la extirpación lo más completa del tumor. Hay diversos tipos de cirugía según el lugar, tipo o tamaño del tumor, como escisión, resección, colostomía o criocirugía, entre otras. Aun así, sea cual sea el tipo de cirugía, en muchos casos el paciente se ve sometido a otro tipo de terapia, a fin de eliminar cualquier resto de célula cancerosa que pueda haber quedado en el tumor. Entre ellas, la quimioterapia, en la que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, mediante su destrucción o inhibiendo su replicación, o la radioterapia basada en el uso de rayos X de alta energía u otros tipos de radiación que destruyen las células cancerosas, pudiendo ser externa, si se utiliza un aparato fuera del cuerpo, o interna, en la que se utilizan agujas o catéteres que colocan radionúclidos, en el tumor o cerca de él. Estos tipos de terapia son los más comúnmente utilizados.

Más recientemente se ha extendido un nuevo tipo de terapia dirigida, basada en la utilización de anticuerpos monoclonales que atacan específicamente a las células cancerosas sin que se ejerza una acción tóxica en las células normales. Este tipo de

terapia es conocida como inmunoterapia y será desarrollada más adelante en la presente tesis.

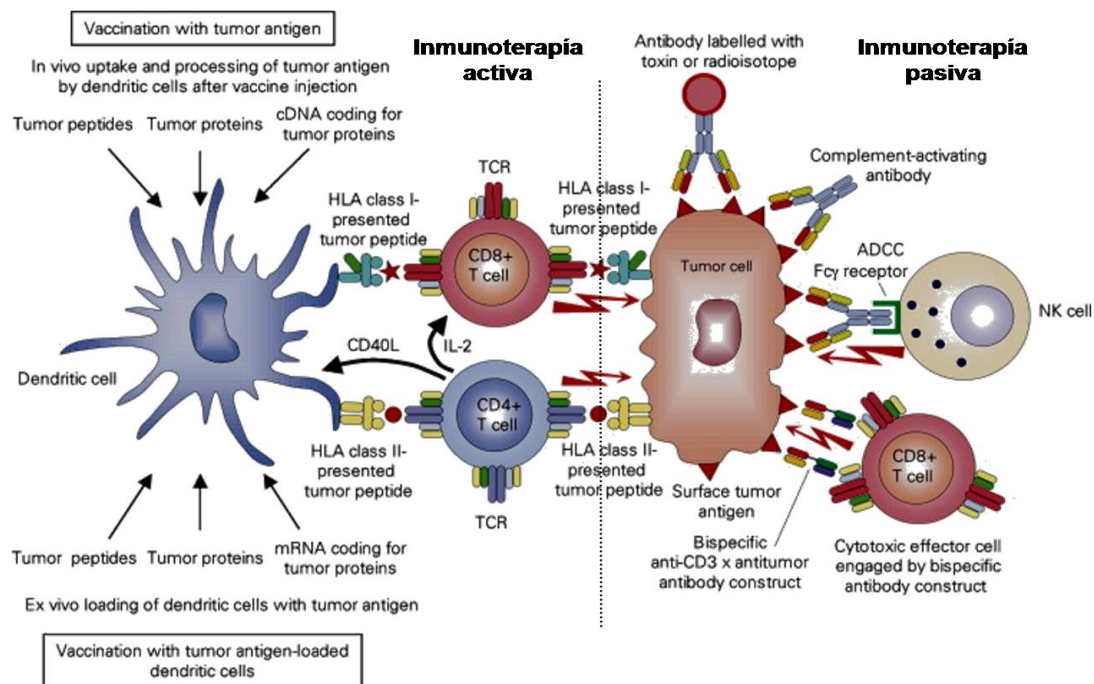
Como se ha comentado anteriormente, los distintos tipos de terapia que se han desarrollado frente al cáncer de colon resultan muy eficaces en estadios tempranos. Sin embargo, como normalmente el tumor es diagnosticado en estadios avanzados la eficacia disminuye significativamente. Este hecho también explica el por qué, cada vez más, se está investigando no sólo para el tratamiento sino también en la búsqueda de un diagnóstico cada vez más precoz en el desarrollo del tumor. En este sentido, la búsqueda de marcadores tumorales específicos es objeto de estudio por parte de numerosos grupos (Catimel *et al.*, 1996; Moritz *et al.*, 1998; Johnstone *et al.*, 2000; Scanlan *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2008).

Más aun, es cada vez mayor el número de estudios que se llevan a cabo a diferentes niveles, para intentar entender mejor no sólo las posibles causas y factores que conllevan la aparición del cáncer de colon, sino también como éste se desarrolla en los diversos estadios, y en cada uno de los pacientes. Es decir, nos dirigiríamos hacia una medicina personalizada, basada en un diagnóstico precoz, altamente sensible y específico, que permita personalizar el tratamiento (Dalglish & Panda, 2007; Finn, 2008; Kelly & Sigman, 2012; Weller *et al.*, 2012)

## 2.-INMUNOTERAPIA: ANTIGENOS Y ANTICUERPOS

Como se ha comentado anteriormente, por inmunoterapia se entiende el conjunto de estrategias basadas en la estimulación del sistema inmune, o bien utilizando alguno de sus componentes, dirigidos a la eliminación de células cancerosas. (*National Cancer Institute, USA, 2012*).

Hay una inmunoterapia dirigida directamente frente a antígenos o marcadores tumorales (específica) y otra que pretende una activación global del sistema inmune (inespecífica). Para ambos casos existe una inmunoterapia pasiva, que consiste en la transferencia de células o anticuerpos previamente generados *in vitro* y dirigidos contra el tumor, y una inmunoterapia activa, en la que se pretende inducir *in vivo* una respuesta inmune (**Figura 6**) (Inogés *et al.*, 2004; Dougan *et al.*, 2009).



**Figura 6:** Representación de los procesos implicados en la inmunoterapia activa y pasiva. (Adaptada de Kiessling *et al.*, 2008)

La presente Tesis se enmarca dentro de la inmunoterapia pasiva específica que es aquella en la que se utiliza como herramienta clave de la terapia el anticuerpo monoclonal. El reconocimiento específico por parte de un anticuerpo monoclonal de un antígeno específico de tumor es la clave de este tipo de terapia, en la que se ahondará a continuación.

## 2.1.- Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son moléculas que se encuentran en el organismo y que pueden detectarse en una persona con cáncer. Un marcador tumoral clásico podría ser una proteína que puede estar presente en niveles elevados en la sangre ante la existencia de cierto tipo de cáncer. Sin embargo, no todos los marcadores tumorales se manifiestan así. Algunos se encuentran en la orina u otros fluidos corporales, mientras que otros pueden estar presentes en los tumores y otros tejidos. Pueden ser productos de las mismas células cancerosas, o ser producidos por el cuerpo en respuesta al cáncer (**Tabla 1**). Si bien la mayoría de los marcadores tumorales son proteínas, recientemente se han incorporado genes u otras moléculas. (Adaptado de *American Cancer Society* y *National Cancer Institute*, 2012).

Cuando estos marcadores presentes en las células tumorales son susceptibles de ser reconocidas por el sistema inmune o parte de él, se denominan antígenos tumorales. Si estos antígenos tumorales se encuentran exclusivamente en la superficie de las células tumorales, siendo presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I o MHC II), se denominan antígenos tumorales específicos (TSA, de las siglas en inglés). Por otro lado si los antígenos son presentados tanto en células normales como tumorales, se denominan antígenos asociados a tumor (TAA, de las siglas en inglés). En ambos casos, el reconocimiento por parte del sistema inmune desencadenaría una respuesta inmune, que produciría la muerte celular.

Marcador	Tumor Asociado
AFP	Higado, testículo
CEA	Neoplasias epiteliales
$\beta$ -hCG	Tumores trofoblásticos, testículo
Calcitonina	Carcinoma medular de tiroides
Tiroglobulina	Carcinoma papilar y folicular de tiroides
CA 125	Ovario, endometrio, pulmón
CA 19.9	Páncreas, estómago, colon y recto, ovario
CA 15.3	Mama, ovario
CA 72.4	Colon y recto, páncreas, ovario, estómago
CYFRA 21-1	Neoplasias epiteliales
PSA	Próstata
NSE	Pulmón
SCC	Carcinomas epidermoides
HER2/neu	Mama, ovario, próstata, pulmón
5-HIAA	carcinoide

**Tabla 1:** Principales marcadores tumorales utilizados en laboratorio clínico. (Adaptado de Fernández *et al.*, 2007)

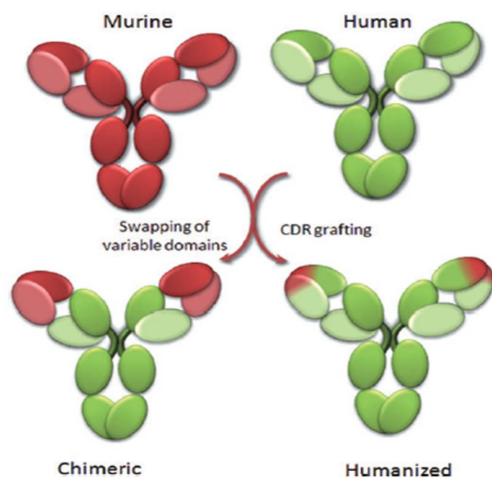
Como hemos dicho estos antígenos tumorales son capaces de activar el sistema inmune. Sin embargo, en muchos casos, esta activación no es suficiente para matar las células, ya que una de las características que presentan los tumores es su capacidad para evadir el sistema inmune (Chames *et al.*, 2009; Mellman *et al.*, 2011), o bien porque en algunos casos el sistema inmune puede estar defectuoso (como en el caso de los linfomas). Estos hechos condujeron a la búsqueda de nuevas estrategias o de nuevas moléculas que ayuden o complementen la acción del sistema inmune, cuando éste por sí mismo no sea suficiente.

## 2.2.- El anticuerpo monoclonal como “arma” terapéutica.

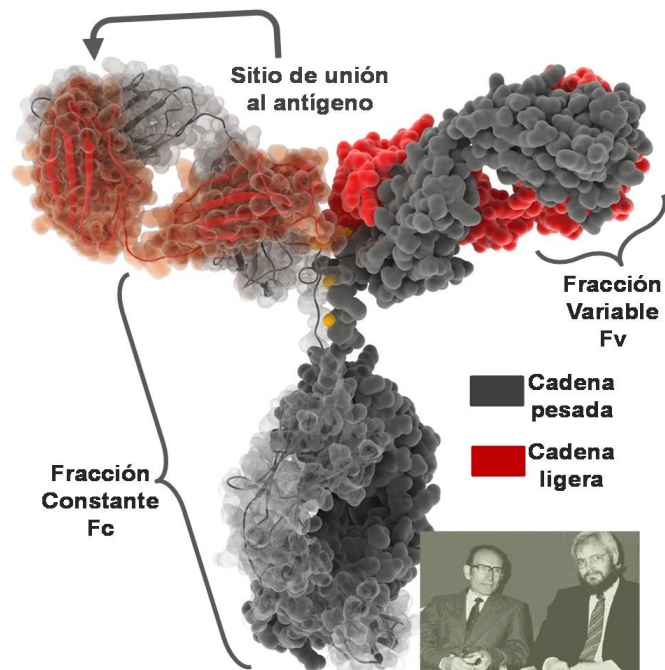
En 1975, Kohler y Milstein desarrollaron la metodología necesaria para producir de un modo eficiente anticuerpos monoclonales (mAb) (**Figura 7**). Estos anticuerpos, permitirían hacer realidad la idea de “bala mágica” acuñada por Paul Ehrlich, que quedó recogida en 1956, en un libro recopilatorio sus textos (Ehrlich., 1956), según la cual se podrían crear moléculas quiméricas que de manera específica dirigieran un compuesto

tóxico hacia una célula diana “marcadora” y producir su muerte, utilizándose para diagnóstico y terapia específicos frente a una enfermedad. Las primeras pruebas sin embargo resultaron ineficaces ya que el origen murino de los anticuerpos no sólo no era capaz de activar el sistema inmune contra la célula diana, sino que lo activaba en forma de rechazo frente al anticuerpo inyectado (Chames *et al.*, 2009).

Sin embargo, a principios de los años 90, Winter y Milstein, desarrollaron la metodología para clonar los genes de moléculas IgG y clonarlos en vectores de expresión eucarióticos (McCafferty *et al.*, 1990). Así nació la ingeniería de anticuerpos, optimizando su clonación y producción (Hoogenboom *et al.*, 2000). Esta optimización se dirigió inicialmente hacia la humanización de los anticuerpos, bien mediante la construcción de quimeras (Neuberger *et al.*, 1985, Reichert *et al.*, 2005) o bien mediante *CDR-grafting* (Jones *et al.*, 1986) (Figura 8).



**Figura 8:** Representación esquemática de dos métodos de humanización de anticuerpos para su utilización en clínica. (Chames *et al.*, 2009)



**Figura 7:** Representación de la estructura de una molécula de anticuerpo tipo IgG. Se destacan las distintas partes que lo componen. En la fotografía, Milstein y Kohler, galardonados con el premio Nobel.

Otro gran hito llegó con el desarrollo de la técnica denominada “phage-display” (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990) que permite obtener anticuerpos frente a proteínas y además optimizar su afinidad por el antígeno hasta el rango sub-picomolar (Luginbuhl *et al.*, 2006) y que fue optimizada por el grupo del Dr. Lerner (Barbas *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2002). Las investigaciones realizadas por los doctores G. Winter y R. Lerner, les han

convertido en los pioneros de la ingeniería de anticuerpos y su aplicación a un uso terapéutico. El reconocimiento a su labor científica se ha traducido en numerosos premios internacionales, y recientemente con la concesión del Premio Príncipe de Asturias en Investigación Científica y Técnica 2012.

Todos estos avances derivaron en la pronta utilización de anticuerpos monoclonales para su utilización en terapia. En la actualidad, hay casi 30 anticuerpos monoclonales aprobados para su comercialización. (**Tabla 2**).

Generic name	Trade name	Antibody format	Antigen	Approved Indication	<sup>11</sup> FDA approval	<sup>11</sup> EMA approval
Muromomab	Orthoclone	Murine, IgG2a	CD3	Allograft rejection in allogeneic renal transplantation	86/06/19	NA
Abciximab <sup>1</sup>	ReoPro	Chimeric, IgG1	GPIIb/IIIa r	Maintenance of coronary patency	94/12/22	NA
Rituximab <sup>2</sup>	Mabthera	Chimeric, IgG1	CD20	CD20-positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma	97/11/26	98/06/02
Dacizumab	Zenapax	Humanized, IgG1	CD25 (IL2r)	Allograft rejection	97/12/10	99/02/26
Basiliximab	Simulect	Chimeric, IgG1	CD25 (IL2r)	Allograft rejection	98/05/12	98/10/09
Palivizumab	Synagis	Humanized, IgG1	Protein F	Respiratory syncytial virus (RSV inhibitor) in children	98/06/19	99/08/13
Infliximab	Remicade	Chimeric, IgG1	TNF $\alpha$	Crohn's disease and rheumatoid arthritis	98/08/24	99/08/13
Trastuzumab	Herceptin	Humanized, IgG1	HER2/Neu	Metastatic breast cancer	98/09/25	00/08/28
Etanercept <sup>3</sup>	Enbrel	huFc $\gamma$ 1/TNFr	TNF $\alpha$ and $\beta$	Autoimmune diseases such as ankylosing spondylitis	98/11/02	00/02/03
Gemtuzumab <sup>4</sup>	Mylotarg	Humanized, IgG4	CD33	CD33-positive acute myeloid leukemia	00/05/17	NA
Alemtuzumab <sup>5</sup>	Mabcampath	Humanized, IgG1	CD52	B-cell chronic lymphocytic leukemia	01/05/07	01/07/06
Ibritumomab <sup>6</sup>	Zevalin <sup>90</sup> Y	Mouse, IgG1	CD20	B-cell non-Hodgkin's lymphoma	02/02/19	04/01/16
Adalimumab <sup>7</sup>	Trudexa	Human, IgG1 (PD)	CD20	Crohn's disease and rheumatoid arthritis	02/12/31	03/09/01
Alefacept <sup>8</sup>	Amevive	huFc $\gamma$ 1/LFA-3	CD2	Chronic plaque psoriasis	03/01/30	NA
Omalizumab	Xolair	Humanized, IgG1	IgE	Treatment of asthma	03/06/20	05/10/25
Tositumomab <sup>9</sup>	Bexxar <sup>125</sup> I	Murine, IgG2a	CD20	CD20-positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma	03/06/27	NA
Efalizumab	Raptiva	Humanized, IgG1	CD11a	Moderate to severe plaque psoriasis	03/10/27	04/09/20
Cetuximab	Erlbitux	Chimeric, IgG1	EGFR	Metastatic colorectal and head and neck carcinoma	04/02/12	04/06/29
Bevacizumab	Avastin	Humanized, IgG1	VEGF-A	Metastatic colorectal and non-small cell lung carcinoma	04/02/26	05/01/12
Natalizumab <sup>10</sup>	Tysabri	Humanized, IgG4	Integrin- $\alpha$ 4	Multiple sclerosis	04/11/23	06/06/27
Ranibizumab	Lucentis	Humanized, IgG1	VEGF-A	Wet-type age-related macular degeneration	06/06/30	07/01/22
Panitumumab <sup>10</sup>	Vectibis	Human, IgG2	EGFR	Metastatic colorectal carcinoma	06/09/27	07/12/19
Eculizumab <sup>11</sup>	Soliris	Humanized, IgG2/4	C5	Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria	07/03/16	07/06/20
Certolizumab <sup>12</sup>	Cimzia	Humanized, IgG1	TNF $\alpha$	Crohn's disease	08/04/18	NA

<sup>1</sup>Abciximab is a Fab fragment.

<sup>2</sup>Rituximab is commercialized under the trade name Rituxan in USA.

<sup>3</sup>These molecules are fusions between the IgG1 Fc portion and a receptor. On 2 May 2008, the FDA placed a black box warning on Etanercept due to a number of serious infections associated with the drug.

<sup>4</sup>Gemtuzumab 'ozogamicine' is coupled to calicheamicin, an anti-tumoural antibiotic.

<sup>5</sup>Alemtuzumab is commercialized under the trade name Campath in USA.

<sup>6</sup>Ibritumomab 'tiuxetan' and Tositumomab are coupled to radioisotopes.

<sup>7</sup>Adalimumab is commercialized under the trade name Humira in USA.

<sup>8</sup>All approved antibodies have a  $\kappa$  light chain except Tositumomab that has a  $\gamma$  light chain.

<sup>9</sup>Natalizumab was voluntarily withdrawn from the market in February 2005. On 5 June 2006, FDA approved a special restricted distribution programme.

<sup>10</sup>Panitumumab is the first human antibody obtained from humanized mice.

<sup>11</sup>Eculizumab contains a CH1 domain and hinge from IgG2, and CH2-CH3 domains from IgG4.

<sup>12</sup>Certolizumab pegol is a PEGylated humanized Fab fragment.

<sup>13</sup>Year/month/day; NA, not approved in Europe.

EGFR, epidermal growth factor receptor; EMEA, European Medicines Agency; FDA, US Food and Drug Administration; HER, human epidermal growth factor receptor; TNF, tumour necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

**Tabla 2:** Relación de anticuerpos aprobados para su uso en clínica. (Adaptado de Chames *et al.*, 2009)

Si bien las perspectivas de éxito eran muy altas, con el tiempo empezaron a observarse la aparición de problemas secundarios en la utilización de los anticuerpos en terapia. El primer problema surgió como consecuencia de los elevados costes de producción, dado que los anticuerpos son proteínas grandes, multiméricas, que necesitaban de sofisticados sistemas eucarióticos para su producción. En la actualidad se están investigando otros sistemas heterólogos de producción basados en

microorganismos y plantas para poder evitar este problema (Giritch *et al.*, 2006; Graumann *et al.*, 2006; Hempel *et al.*, 2011)

Otro contratiempo se debió a la relación entre farmacocinética y penetración en tumor. Así, inicialmente en ratones, se observó que los mAbs permanecían largo tiempo en sangre y que no más del 20% de la dosis administrada llegaba al tumor (Beckman *et al.*, 2007).

Sin embargo, la utilización de la molécula completa del anticuerpo presentaba otra serie de ventajas. Así, el tamaño del anticuerpo (unos 150 KDa) permitía evadir la filtración glomerular en riñón. Además la presencia de la fracción constante (Fc), que no sólo interviene en aumentar la vida media del anticuerpo, sino que está implicado en la activación del sistema inmune bien a nivel celular, como molecular permitía considerar a estos anticuerpos como terapéuticos. Sin embargo, estas mismas características serían a la vez un inconveniente. Así, no es casualidad que sólo dos de los anticuerpos aprobados para el uso en clínica vayan dirigidos a tumores sólidos, pues se comprobó que el tamaño del anticuerpo completo es demasiado grande para su difusión en un tumor sólido, presentando una accesibilidad y una penetración en el tumor muy limitada (Pirker, 1988). Por otra parte, la presencia del dominio Fc representaba ciertas complicaciones a distintos niveles: genético, en cuanto a su producción heteróloga (Cartron *et al.*, 2002; Weng y Levy, 2003), postraduccional en cuanto a las glicosilaciones en la producción (Shinkawa *et al.*, 2003), afinidad y competitividad por el receptor de Fc (“activadores o inhibidores”) (Preithner *et al.*, 2006; Nimmerjahn y Ravetch, 2007).

En la actualidad, todos estos problemas han derivado en un incremento considerable de la investigación en ingeniería de anticuerpos, dirigida hacia la modificación de los distintos dominios del anticuerpo, o a la utilización de variantes no completas de los mismos para su posible uso en terapia (Chames *et al.*, 2009; Mellman *et al.*, 2011).

De las distintas dificultades encontradas durante el desarrollo de la inmunoterapia basada en la utilización del anticuerpo monoclonal quisiera llamar la atención sobre tres de ellas en particular, que ayudarán a entender mejor hacia donde se dirigió la investigación relacionada con la ingeniería de anticuerpos. Estos tres inconvenientes son: el elevado tamaño del anticuerpo y su deficiente penetración en el tumor; la aparición de reacciones secundarias adversas, como el síndrome de fragilidad

vascular (VLS, de sus siglas en inglés) y la capacidad del tumor para evadir o inactivar la respuesta inmune.

Una vez determinado que el principal logro de la inmunoterapia reside en el reconocimiento absolutamente específico de un marcador tumoral por parte de un anticuerpo monoclonal, y considerando que esa capacidad se circunscribe a unos pocos aminoácidos localizados en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables, parecía lógico estudiar si se podían obtener variantes de los anticuerpos que solo constasen de esas regiones variables, sin que eso afecte al reconocimiento del antígeno.

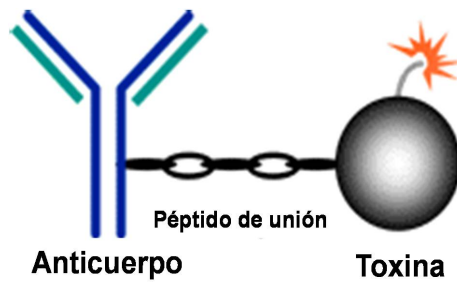
Por otro lado, teniendo en cuenta que la presencia de los dominios constantes no siempre era suficientemente eficaz para producir una respuesta inmune contra las células cancerosas, se planteó poder incorporar otras moléculas que pudiesen producir la muerte de las células diana, debido a su actividad “toxica”.

De este modo, de la visión inicial de Paul Ehrlich acerca de las balas mágicas, y a través del primer acercamiento utilizando únicamente el anticuerpo completo y la respuesta inmune que provoca, se llegó al nacimiento de una nueva estrategia que reúne la especificidad del anticuerpo, con una actividad toxica, en una molécula quimérica. Nacen así las inmunotoxinas.

### 3.- INMUNOTOXINAS E INMUNORRIBONUCLEASAS

Las inmunotoxinas son moléculas quiméricas, normalmente de naturaleza proteica, compuestas por un anticuerpo (o fragmento de él) unido a una toxina (Pastan *et al.*, 2006; Holzman *et al.*, 2009).

Se componen de dos dominios: el de especificidad o marcador, compuesto normalmente por un anticuerpo, o un derivado suyo, y el toxico, que es el que ejerce la actividad tóxica sobre la célula diana a la que va dirigido el dominio de especificidad (**Figura 9**) (Kreitman, 2009)



**Figura 9:** Representación esquemática de las partes que componen una

Las primeras inmunotoxinas que se diseñaron fueron inmunoconjugados producidos mediante la unión química de un anticuerpo completo y una toxina.

Estas primeras inmunotoxinas estaban formadas, en su dominio tóxico, por toxinas de origen microbiano como la exotoxina de *pseudomonas* (PE) (Kondo *et al.*, 1988; Kreitman *et al.*, 1990; 1993; Li *et al.*, 2004) o la toxina diftérica (DT) (Foss *et al.*, 1998; Potala *et al.*, 2008), o bien por toxinas de origen vegetal como la ricina (Ghetie *et al.*, 1993; Engert *et al.*, 1997; O'Toole *et al.*, 1998) normalmente mediante la utilización de formas truncadas de estas toxinas, eliminando así la parte de la proteína implicada en la interacción con la célula, dejando solo el dominio catalítico (Thrush *et al.*, 1996; Kreitman 1999; 2006; Li *et al.*, 2005; Pastan *et al.*, 2006; 2007).

La utilización de esta primera generación de inmunotoxinas en estudios clínicos, mostró diversos contratiempos como la pérdida de especificidad o baja estabilidad; así como una composición heterogénea, debido a la presencia del dominio tóxico libre, observándose en la mayoría de los casos el síndrome de fragilidad vascular (VLS), que deriva en un colapso vascular (Baluna *et al.*, 2000). También se describió una deficiente penetración en tumores sólidos o reacciones de rechazo. (Fujimori *et al.*, 1989; Thrush *et al.*, 1996; McGrath *et al.*, 2003; Beckman *et al.*, 2007; Roopenian y Akilseh, 2007). Estos problemas ya han sido comentados en el apartado anterior de la introducción, y no eran del todo inesperados considerando la naturaleza y características de estas moléculas.

Sin embargo, este hecho pareció eliminar la potencialidad de esta “nueva” vía de inmunoterapia, sobre todo en aquellos casos en los que el sistema inmune del paciente era defectuoso. Por ello, se planteó la posibilidad de utilizar estas moléculas de manera combinada con pacientes inmunodeprimidos, o combinadas con quimioterapia (Singh *et al.*, 2007; 2012). Esto ha supuesto que hoy en día se siga investigando en la utilización de inmunotoxinas que mantienen en su diseño la molécula del anticuerpo completo, administradas junto con otras sustancias que favorecen su acción antitumoral (Ghetie *et al.*, 2001; Kreitman *et al.*, 2006; Pastan *et al.*, 2006).

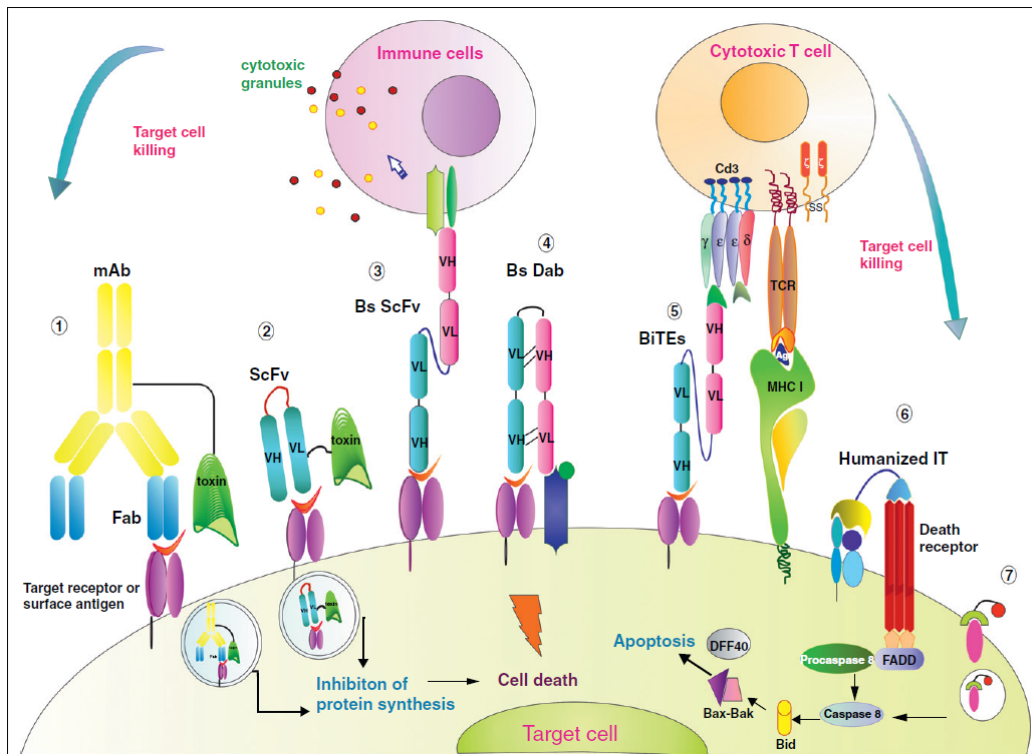
### 3.1.- Evolución en el diseño de inmunotoxinas.

#### 3.1.1.- Dominio marcador.

Como suele suceder en ciencia, la aparición de dificultades, relacionadas en este caso concreto en el tratamiento, supuso un nuevo impulso a la investigación, centrada en la evolución del diseño de estos inmunoconjugados, que implicaron el diseño de nuevas construcciones dirigidas a mitigar esos problemas (Selvaggi *et al.*, 1993; Siegall *et al.*, 1997; LeMaistre *et al.*, 1998; Tsutsumi *et al.*, 2000). Así, se empezaron a construir inmunotoxinas en las que el dominio marcador estaba formado solamente por el fragmento Fab (Shimba *et al.*, 1995) o por derivados mucho más pequeños, formados únicamente por los dominios  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo.

Con los avances de la biología molecular, que hicieron posible la clonación del cDNA codificante para las diferentes cadenas polipeptídicas del anticuerpo, unido a la mejora de los sistemas de expresión y una vez que se demostró el mantenimiento de la capacidad de interacción de los dominios variables solos al antígeno, se empezaron a diseñar inmunotoxinas recombinantes, en las que se clonó el cDNA de los dominios variables del anticuerpo fusionado con el cDNA de la toxina. Surgieron así las inmunotoxinas de cadena única (sc, del inglés: *single chain*) que incluyen los dos dominios, de especificidad y tóxico.

Estas inmunotoxinas se denominaron de segunda generación (Chaudhary *et al.*, 1989). La unión de ambos dominios se realizaba mediante un péptido de unión formado por un pequeño número de aminoácidos (Huston *et al.*, 1988; Bird *et al.*, 1989) o mediante la incorporación de dos cisteínas para crear un puente disulfuro (Brinkmann *et al.*, 1991; 2000; Reiter *et al.*, 1996) (**Figura 10**). Una de las principales ventajas de esta segunda generación de inmunotoxinas de menor tamaño es que puede ser producida en sistemas heterólogos favoreciendo la obtención de grandes cantidades así como la modificación de las mismas mediante ingeniería de proteínas.



**Figura 10:** Esquema de diferentes mecanismos de diferentes inmunotoxinas. La toxina se conjuga al mAb completo (1) o bien a los fragmentos variables scFv (2). También se muestran dominios bispecificos Bs-scFv (3) y Diabodies (4) uniéndose a diferentes antígenos de la misma o diferentes células. Se muestra una inmunotoxina humanizada conteniendo un ligando para receptores de muerte (6). (Adaptado de Madhumathi *et al.*, 2012)

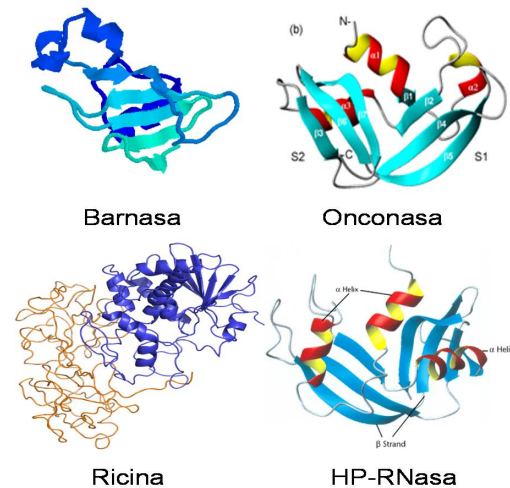
### 3.1.2.- Dominio toxico.

Por otro lado, la evolución del diseño de estas inmunotoxinas recombinantes también afectó al dominio toxico. Así, se empezaron a utilizar otras proteínas con actividades y orígenes diferentes. De este modo, se incorporaron proteínas de origen fúngico o humano (Fang *et al.*, 2011), y de carácter tóxico o no tóxico, con diferentes actividades enzimáticas.

En este sentido la utilización de proteínas no tóxicas, que ejercerían su actividad sólo al acceder al interior celular, o bien que requieren una etapa de activación intracelular, evitaría problemas de citotoxicidad inespecífica (Deckert *et al.*, 2003). Entre ellas, se han utilizado proteínas activadoras de la apoptosis como son Bim o Bax (Mathew *et al.*, 2009), o RNasas (Menzel *et al.*, 2008; Ardelt *et al.*, 2009; Schirrmann *et al.*, 2009; Shlyakhovenko, 2009). Cabe destacar el creciente interés por la utilización de proteínas con actividad ribonucleolítica como componente del dominio tóxico, tanto en

inmunoconjugados como en inmunotoxinas de segunda generación. Esto ha llevado a acuñar el término inmunoRNasa, cuando las RNasas utilizadas son de naturaleza no tóxica, frente al de inmunotoxina, referida en este caso a la utilización de RNasas tóxicas, como son las ribotoxinas (Rybak *et al.*, 1999; 2009; Makarov *et al.*, 2008).

Ejemplos de estas inmunoRNasas e inmunotoxinas serían la basada en la RNasa pancreática humana (Zewe *et al.*, 1997; De Lorenzo *et al.*, 2007, 2008; 2009; Borriello *et al.*, 2011), la onconasa, de origen animal (Newton *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2010) o microbianas como la barnasa o la binasa (Glinka *et al.*, 2006; Balandin *et al.*, 2011) o ribotoxinas, como la restrictocina o la  $\alpha$ -sarcina (Orlandi *et al.*, 1988; Conde *et al.*, 1989; Warzynzak *et al.*, 1991; Rathore *et al.*, 1997; Rosenblum *et al.*, 2003) (**Fig.11**).



**Figura 11:** Representación estructural de algunas de las proteínas tóxicas utilizadas como dominio tóxico en inmunotoxinas.

En general, las moléculas utilizadas como dominio tóxico deben reunir las siguientes características (Johannes *et al.*, 2005):

1. La toxina debe poseer una elevada toxicidad, en el rango nanomolar. Así, por ejemplo, la toxina diftérica es ampliamente utilizada, pues una sola molécula es suficiente para matar una célula (Vallera *et al.*, 2002).
2. El inmunoconjugado debe preservar las características de la toxina, en cuanto a su actividad.
3. La toxina debe ser liberada al citosol para ejercer su acción (Morokoff y Novak, 2004).
4. La toxina debe ser capaz de sobrevivir a la degradación proteolítica intracelular y el ambiente ácido de los lisosomas. La ruta intracelular empleada para acceder a su sustrato es un punto clave para observar el efecto citotóxico deseado (Frankel *et al.*, 2009)

### 3.1.3.- Optimización del diseño: estabilidad, tamaño, humanización.

Hoy en día se han establecido dos corrientes de opinión en las estrategias en la optimización del diseño de inmunotoxinas, dirigiéndose bien a la búsqueda de una mayor estabilidad o a la reducción del tamaño para favorecer una mayor penetración en tumores sólidos. Esto se basa en la incorporación de algunas de las regiones constantes de las cadenas pesadas para obtener nanoanticuerpos que son más estables, o bien en la utilización de la fracción Fab, los dominios variables solos (scFv) o incluso en la utilización de únicamente dos CDR (*pheromonicinas*) respectivamente (Adams *et al.*, 2001; Adams y Weiner, 2005; Röthlisberguer *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2009). Este debate se mantiene sin un resultado claro pues todavía hoy en día, hay una vertiente que prefiere una estabilidad mayor, a costa de una menor especificidad de acción antitumoral, y una vertiente que prefiere una mayor reducción del tamaño a costa de una menor afinidad por el antígeno (Qiu *et al.*, 2007).

Otro de los problemas más comúnmente observados al realizar ensayos *in vivo* con las inmunotoxinas se refiere a la inmunización del paciente frente a ellas, desencadenando una respuesta inmune de rechazo tras repetidas dosis de tratamiento. Por ello, la optimización de las inmunotoxinas también se ha centrado en la obtención de variantes humanizadas o menos inmunogénicas (Mathew *et al.*, 2009). En el caso de los dominios variables, obtenidos normalmente de ratón o conejo, se conservan exclusivamente los CDR para asegurar el mantenimiento de la afinidad por el antígeno (Scott *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2005) o bien se cambian determinadas regiones de la secuencia hasta no observar reactividad o una disminución significativa de la misma (Knappik *et al.*, 2000; Chames *et al.*, 2009).

En el caso de la inmugenicidad debido al dominio toxico se han seguido dos estrategias: la utilización de ribonucleasas humanas (De Lorenzo *et al.*, 2007, 2008; Krauss *et al.*, 2008) o la identificación y eliminación de posibles epítomos, responsables de la inmunogenicidad, de la toxina, como se hizo por ejemplo con la toxina de *Pseudomonas* en la que, sin verse afectada la actividad, se obtuvo una variante mucho menos inmunogénica (Onda *et al.*, 2006; 2008). Este proceso se ha realizado tanto con los anticuerpos monoclonales completos utilizados en terapia; como con aquellos anticuerpos o fragmentos derivados de ellos incluidos en las inmunotoxinas (McCarfferty *et al.*, 1990; Onda *et al.*, 2008; Mathew *et al.*, 2009). En la **Tabla 3** se resume el estado actual en la investigación con algunas de estas inmunotoxinas e inmunoRNAsas, siendo más de treinta las que se encuentran en fase clínica (Madhumathi *et al.*, 2012).

Table 1				
Target antigens of immunotoxins used for solid tumors.				
Target	Targeting moiety	Toxin	Target tissues/diseases	Experimental phase
IL4R	IL4	PE	Glioblastoma, astrocytoma, head and neck squamous cell carcinoma, prostate carcinoma, lymphoma, kidney, lung and breast cancer	I/II
IL13R	IL13	PE	Glioma, renal cell carcinoma, ovarian cancer, KS, head and neck carcinoma	I/II, III
IL2R TNFR	IL2 TNF	DT	Melanoma, ovarian, breast, kidney cancers, KS Melanoma	II
ErbB2 (Her2)	dsFv	PE	Ovarian, squamous cell, prostate, head and neck, NSCLC	I
	ScFv	PE Ricin	Breast, colon, melanoma Gastric cancer	
EGFR	EGF	DT	Carcinomas	I/II
	TGF $\alpha$	PE	Bladder cancer, glioblastoma	I/II
	ScFv/bsFv	PE	Neoplastic meningitis, malignant mesothelioma	<i>In vivo</i>
	EGF, Mab	SAP	Sarcoma, adenocarcinoma and cervical cancer	<i>In vivo</i>
FGFR	FGF	SAP	Melanoma, teratocarcinoma, neuroblastoma cells, bladder and prostate carcinoma	<i>In vivo</i>
VEGFR	VEGF	PE	Glioma	<i>In vivo</i>
TfR	Transferrin	DT	Brain and CNS tumors	I/II
	Mab	Ricin	Leptomeningeal neoplasia	I
	Transferrin	SAP	Glioblastoma cell lines	<i>In vitro</i>
EpCAM	scFv Fab	PE Bouganin	Lung, colon, breast, squamous cell carcinomas	<i>In vivo</i>
Mesothelin	dsFv	PE	Mesothelioma, ovarian, pancreatic, and lung cancers	I
72 kDa TAA	Mab	Ricin	Colorectal cancer	I
Melanoma antigen	Mab	Ricin	Melanoma	I/II
Carbohydrate antigen Le <sup>y</sup>	Mab dsFv, ScFv	PE	Breast, ovarian, gastrointestinal cancer adenocarcinoma	I
CEA	Mab	Ricin	Colorectal cancer	I/II
55 kDa antigen	Mab	Ricin	Breast carcinoma	I (suspended)
NCAM (CD56)	Mab	Ricin	SCLC	II (suspended)
Urokinase receptor	ATF of urokinase	PE	Glioblastoma multiforme, leptomeningeal neoplasia	<i>In vitro</i>
5T4	Fab	Superantigen	Solid tumors-NSCLC, renal cell carcinoma	I
CDR3 $\delta$ specific for OEC	ScFv	DT	Ovarian carcinoma, cervix adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, and rectum adenocarcinoma	<i>In vivo</i> model
PSMA	Mab	Ricin	Prostate cancer	<i>In vivo</i>
		SAP	Prostate cancer	<i>In vivo</i>
CDCP1	Mab	SAP	Prostate cancer	<i>In vivo</i>
Tomoregulin	Mab	SAP	Prostate cancer	<i>In vitro</i>
HSP65	Mab	SAP	Pancreatic carcinoma	<i>In vivo</i>
CEACAM6	Mab	SAP	Pancreatic adenocarcinoma	<i>In vivo</i>
RPTP $\beta$	Mab	SAP	Glioblastoma, astrocytic tumor	<i>In vivo</i>
ALCAM/CD166	ScFv	SAP	Many solid tumors	<i>In vitro</i>
HAAH	ScFv	SAP	Liver tumor cell line	<i>In vitro</i>
Endosialin/CD248/tumor endothelial marker 1	Mab	SAP	Ewing's sarcoma cell line	<i>In vitro</i>
Cell cycle-associated overexpression of transcobalamin receptor (CD320)	Mab	SAP	Human colon adenocarcinoma and epidermoid carcinoma cell lines	<i>In vitro</i>
Integrin-like cell surface protein (TEM8)	Mab	SAP	Tumor blood vessels	<i>In vitro</i>
HMW-MAA	Mab	SAP	Melanoma	<i>In vitro</i>
gp54	Mab	SAP	Bladder cancer	<i>In vitro</i>
P glycoprotein 170	Mab	SAP	Colon carcinoma	<i>In vitro</i>
gp240	ScFv	Gelolin	Melanoma	<i>In vitro</i>
Bladder cancer specific antigen	Mab	Momodin	Bladder cancer	I

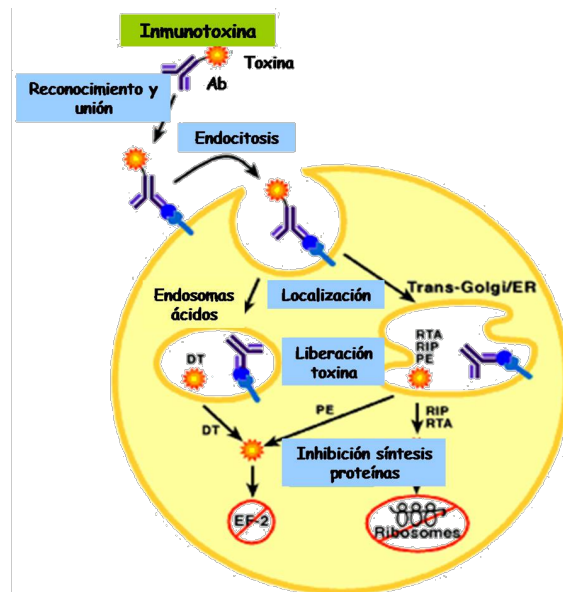
*Abbreviations:* IL(R): interleukin (receptor), tumor necrosis factor receptor (TNFR), epidermal growth factor receptor (EGFR), transforming growth factor (TGF $\alpha$ ), fibroblast growth factor receptors (FGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), transferrin receptor (TfR), tumor associated antigen (TAA), Lewis Y (Le<sup>y</sup>), human carcinoembryonic antigen (CEA), amino terminal fragment of urokinase (ATF), prostate-specific membrane antigen (PSMA), CUB domain-containing protein 1 (CDCP1), heat shock protein 65 (HSP65), carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6), receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$  (RPTP $\beta$ ), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166), human aspartyl (asparaginy)  $\beta$ -hydroxylase (HAAH), high-molecular-weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA). Diphtheria toxin (DT), *Pseudomonas* exotoxin (PE), saporin (SAP), pokeweed antiviral protein (PAP), MAb: monoclonal antibody; dsFv: disulfide-stabilized Fv antibody fragment; scFv: a single chain variable fragment; bisFv: two Fv fragments connected via a disulfide bond; Fab': fragment antigen-binding (one constant/one variable domain of each heavy and light chain connected by a disulfide bond); Kaposi's sarcoma (KS), non-small cell lung cancer (NSCLC), small-cell lung cancer (SCLC), ovarian carcinoma (OEC), head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN).

**Tabla 3:** Estado actual en la experimentación con inmunotoxinas. (Adaptado de Madhumathi *et al.*, 2012)

### 3.2.- Mecanismo de acción.

El mecanismo de actuación de las inmunotoxinas puede describirse de modo general como un proceso en tres etapas que desembocaría en la muerte celular de las células diana. En una primera etapa se produciría el reconocimiento del antígeno tumoral específico por parte del dominio marcador de la inmunotoxina. Esta interacción antígeno-anticuerpo evoluciona hacia la internación del complejo mediante endocitosis, detectándose la inmunotoxina en endosomas. Por último, y siguiendo diferentes vías de tráfico intracelular, se produciría la liberación del dominio tóxico, que ejercería su actividad enzimática frente a su sustrato, produciendo la muerte celular. (Sakamoto *et al.*, 2000; 2006; Kreitman, 2003, 2006; Pastan *et al.*, 2007) (Figura 12)

Este mecanismo general puede diferir en función de las particularidades o características intrínsecas tanto del dominio marcador como de las toxinas empleadas.



**Figura 12:** Esquema del mecanismo de actuación de las inmunotoxinas. Se muestran los diferentes pasos del mecanismo desde el reconocimiento y unión de la inmunotoxina a la célula diana hasta su muerte debido a la acción de la toxina.

Así, en cuanto a la unión e internación, el mecanismo de acción será debido a la actividad del dominio marcador, produciéndose la internación de la inmunotoxina según la vía que corresponda a dicha interacción antígeno-anticuerpo, y que podrá variar en los diferentes casos. Una vez la inmunotoxina es internada, y debido a la acidificación de los endosomas se producirá el procesamiento de la misma, que implicará diferentes rutas intracelulares, hasta la liberación de la toxina en el interior celular.

En líneas generales las toxinas utilizadas pueden agruparse en tres clases diferentes, en función de su mecanismo de acción. La clase I, formada por enzimas que bloquean los procesos de biosíntesis de proteínas actuando sobre el factor de elongación 2 (EF-2) como la toxina diftérica o la toxina de *Pseudomonas* (Sarnovsky *et al.*, 2010) o a nivel del RNA ribosomal como la ricina, gelonina, saporina, etc.

(Wawrzynczak *et al.*, 1991; Francisco *et al.*, 1997; Ferreras *et al.*, 2011), o bien degradando el RNA total como es el caso de las RNasas no específicas (De Lorenzo *et al.*, 2007; Edelweiss *et al.*, 2008; 2010). La clase II está formada por aquellas que actúan a nivel de las cascadas de señalización intracelular (Chovnick *et al.*, 1991). Por último, estarían las de clase III formada por porinas, que producen la formación de un poro en la membrana celular. Entre ellas estarían la melitina, la toxina de la cobra o la familia de las esticholisinas (Tejuca *et al.*, 2004; Penton *et al.*, 2011).

### 3.2.1.- Factores que afectan a la eficacia del mecanismo

Son muchos los procesos relacionados con el mecanismo de actuación a tener en cuenta para el estudio de la mayor o menor efectividad de una inmunotoxina. Entre ellos, podrían incluirse aquellos relacionados con la forma de suministro de estas moléculas en tratamientos *in vivo*, siendo habitual su suministro mediante inyección intravenosa. La forma en la cual se suministra la inmunotoxina puede tener repercusión a diferentes niveles, como es la aparición o no de reacciones inmunogénicas (Kreitman, 2000; Weber *et al.*, 2003), su biodistribución o su especificidad, entre otros (Frankel *et al.*, 2002). Todos estos procesos parecen ser susceptibles de ser mejorados con el uso de coadyuvantes o mediante ingeniería de proteínas (Siegall *et al.*, 1997). Sin embargo, una vez el inmunoconjugado ha llegado al tumor, se presenta uno de los pasos críticos en la acción antitumoral o no de la inmunotoxina.

La efectividad en la acción de la toxina en el interior celular depende directamente tanto de la internación del complejo según sea el antígeno o receptor al que éste va dirigido, como del proceso intracelular que sufre la toxina una vez liberada (Byers *et al.*, 1991). Así, por ejemplo, la toxina diftérica puede liberarse directamente desde los endosomas tempranos al citosol (Antignani y Youle, 2008), mientras que la toxina de *Pseudomonas* ha de pasar a través del Golgi y el retículo endoplasmático antes de alcanzar el citosol (Weldon *et al.*, 2011).

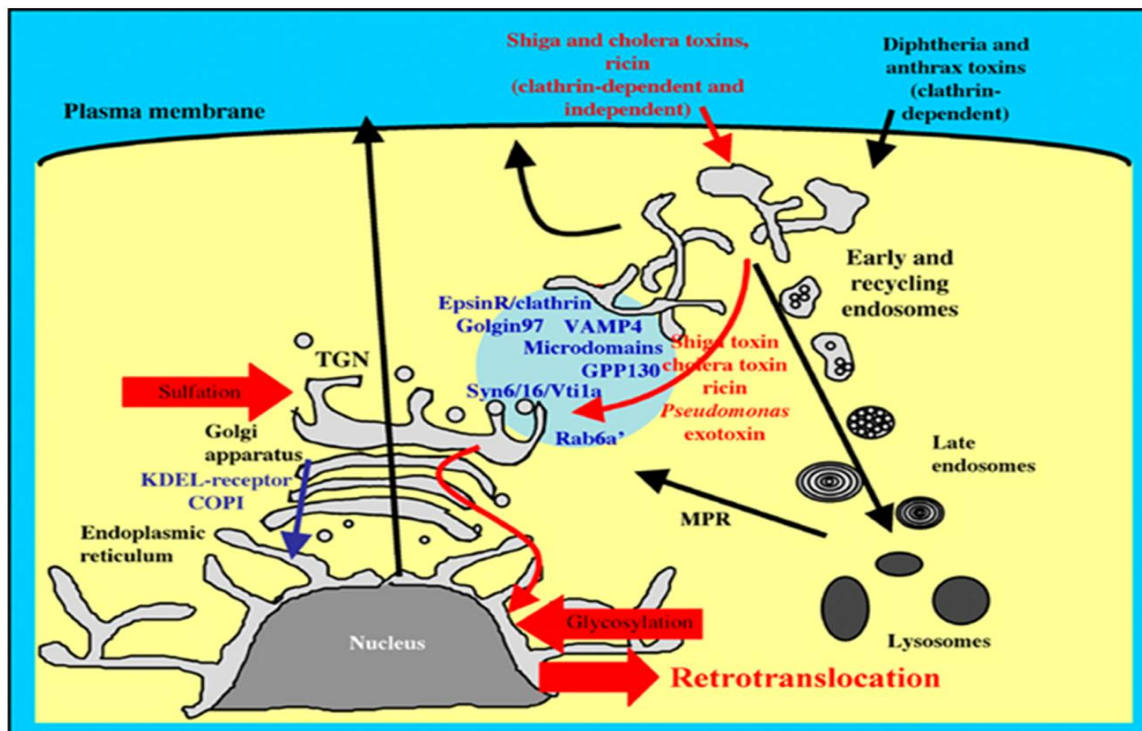
#### 3.2.1.1.- Internación

De los mecanismos endocíticos conocidos hasta el momento, uno de los más estudiados es el dependiente de clatrina; una proteína citosólica ubicua que es reclutada en la membrana y participa en la endocitosis (Brodsky *et al.*, 2001). Diferentes toxinas,

como la diftérica o la toxina del ántrax utilizan esta vía (Abrami *et al.*, 2003). Sin embargo, otras toxinas siguen las vías endocíticas independientes de clatrina, por ejemplo, la toxina colérica, tetánica o la ricina (Tran *et al.*, 1987); Asimismo se ha demostrado que estos dos procesos pueden no ser excluyentes entre sí, pudiendo una misma toxina participar en ambas rutas de entrada dependiendo de diversos factores (Johannes *et al.*, 2005; Kirkham *et al.*, 2005).

### 3.2.1.2.- Tráfico intracelular

Una vez que se produce la internación, el complejo se encuentra en los endosomas tempranos. En algunos casos, la acidificación en estos endosomas puede producir por sí mismo la translocación de la toxina al citosol, como sería el ejemplo comentado anteriormente para la toxina diftérica o del ántrax. La otra ruta, también denominada retrograda, implica al aparato de Golgi y retículo endoplasmático hasta su liberación en el citosol (Lord *et al.*, 2003, De Lorenzo *et al.*, 2007) (**Figura 13**).



**Figura 13:** Rutas de transporte intracelular de proteínas tóxicas. Las flechas negras indican las rutas habituales de transporte intracelular. Las flechas rojas se refieren a la entrada por la vía independiente de clatrina. En el círculo azul se representa la interfaz entre los endosomas y el aparato de Golgi. Se muestran también las rutas denominadas KDEL-receptor/COPI en el retículo endoplásmico, así como la del receptor de manosa-6-fosfato (MPR) en los lisosomas (Pulvirenti *et al.*, 2008).

A este respecto, son muchos los estudios que se han realizado usando subunidades de la toxina de Shiga, la toxina colérica o la proteína inactivante de ribosomas (RIP) ricina, para intentar dilucidar la mayor o menor intervención de la maquinaria COPI/KDEL en el tráfico hacia el retículo endoplasmático y posterior translocación al citosol. Esta maquinaria COPI/KDEL es parte del sistema de transporte entre el Golgi y el retículo endoplasmático (Pulvirenti *et al.*, 2008). KDEL es una secuencia aminoacídica que mantiene la proteína en el retículo endoplasmático y que ha de ser procesada para que la proteína pueda ser secretada hacia el citosol (Yamamoto *et al.*, 2001). Si bien en algunos casos estos estudios mostraron la posibilidad de aumentar la acción citotóxica incorporando esta señalización para favorecer esta ruta de procesamiento intracelular, otros mostraron que ésta permanece invariante incluso añadiendo la señal KDEL a la subunidad (Chen *et al.*, 2002; 2003).

Aún en la actualidad, es elevado el número de laboratorios que sigue investigando acerca de la ruta intracelular de las toxinas, con el ánimo de conocer y entender mejor estos procesos, y, buscando una mejora de la eficacia citotóxica, y por ende, antitumoral, de las inmunotoxinas (Johannes *et al.*, 2005).

En este sentido, hay que destacar que el mecanismo global de estos inmunoconjugados implica que entren en juego los dos dominios. Así, la internación, tras la unión al receptor celular, dependerá del tipo de endocitosis desencadenada por la activación del complejo antígeno-anticuerpo que se forme en cada caso; y en un segundo paso, la naturaleza del dominio toxico implicará una/s u otra/s rutas intracelulares. Se ha comprobado cómo una toxina unida a diferentes dominios variables produce la misma activación de vías apoptóticas, pero presenta una mayor o menor eficacia en cuanto a la entrada, en función de los dominios variables. Por otro lado, los mismos dominios variables, unidos a diferentes toxinas, presentan la misma vía de entrada, pero distinta eficacia citotóxica, según la naturaleza del dominio toxico (Byers *et al.*, 1991; He *et al.*, 2005). Este hecho justifica la existencia de numerosos estudios dirigidos a la optimización de la actividad del tándem anticuerpo-toxina (Onda *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2007; Asano *et al.*, 2011).

### **3.2.1.3.- Péptido de unión**

Por último, pero no por ello menos importante, hay que tener en cuenta el papel que puede desempeñar el péptido de unión entre los dos dominios en la eficacia de las inmunotoxinas recombinantes. Las características de este péptido de unión, tanto en

cuanto a su longitud, como a su composición, se relaciona directamente no sólo con la estabilidad estructural de estas proteínas de fusión, sino también con la liberación de la toxina (Dosio *et al.*, 2011). Uno de los péptidos de unión más utilizados consiste en una repetición de glicocola y serina ((G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>) que dota de la flexibilidad requerida para favorecer el plegamiento independiente de ambos dominios y mantiene la estabilidad estructural (Kreitman *et al.*, 2001). Este péptido permanece estable en los ensayos *in vivo*, y es susceptible de su rotura en el medio ácido de los endosomas, dando lugar a la liberación de la toxina.

Una vez comprobado que el péptido de unión desempeñaba una función importante en la liberación de la toxina, se empezaron a diseñar nuevos péptidos de unión que incluyesen sitios de reconocimiento para proteasas intracelulares presentes en las diferentes rutas de procesamiento intracelular. Un ejemplo sería el de la furina, una proteasa de mamíferos presente en las vías del trans-Golgi-RE (Vey *et al.*, 1994), cuya secuencia de reconocimiento de proteólisis era conocida. Utilizando esta proteasa como ayuda, se empezaron a diseñar nuevos péptidos de unión que contenían esta secuencia para favorecer la liberación de la toxina al medio (Goyal y Batra *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2009; Weldon *et al.*, 2011)

Con este apartado se ha pretendido no solo explicar brevemente los distintos aspectos que competen al mecanismo de acción de una inmunotoxina, sino también intentar mostrar que son varios los puntos clave para que la inmunotoxina despliegue toda su capacidad citotóxica. Se justifica así, que sean objeto de estudio para conseguir la máxima optimización de la capacidad citotóxica específica de las inmunotoxinas.

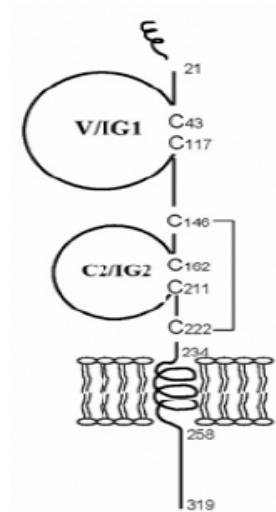
## **4.- GPA33 Y mAbA33: UNA PAREJA MODELO**

### **4.1.- El antígeno GPA33.**

El antígeno A33 (GPA33) es una glicoproteína de membrana sobreexpresada en el 95% de los tumores de colon y ausente en otros tipos de tumores o tejidos no transformados. Este hecho le convierte en un antígeno específico de tumor, y por tanto un potencial candidato como marcador tumoral (Catimel *et al.*, 1996; 1997; Ritter *et al.*, 1997).

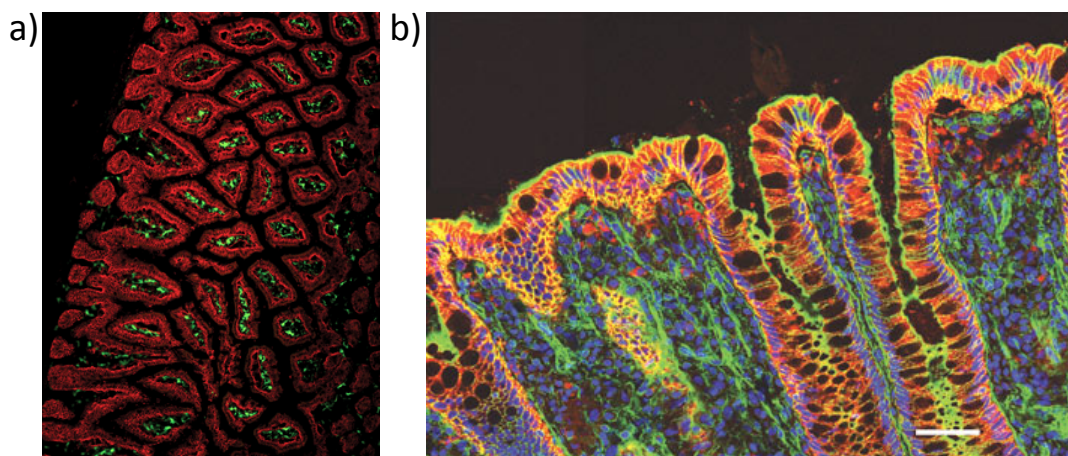
Esta proteína, de 298 aminoácidos, presenta una región N-terminal extracelular con dos dominios tipo inmunoglobulina (de 213 aminoácidos), una región transmembrana (de 22 aminoácidos) y una región C-terminal intracelular (de 61 aminoácidos) rica en aminoácidos ácidos (Johnstone *et al.*, 2000). La proteína presenta tres sitios susceptibles de N-glicosilación (Heath *et al.*, 1997) (**Figura 14**).

El antígeno fue purificado y caracterizado inicialmente a partir de dos líneas celulares de cáncer de colon, LIM1215 y SW1222, obtenidas en el Ludwig Cancer Institute (NY) (Catimel *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1997) y más tarde, tras la identificación y clonación del gen que lo codifica, se pudo llevar a cabo su expresión en baculovirus (Joosten *et al.*, 2004).



**Figura 14:** Esquema de la estructura del antígeno GPA33, mostrándose los distintos dominios que lo componen.

La distribución de GPA33 en el tejido está claramente diferenciada, sobreexpresándose únicamente en la región basolateral del intestino, sin que se detecte expresión en la región apical (Johnstone *et al.*, 2000; 2002) (**Figura 15**). Las células GPA33 positivas llegan a expresar hasta 800.000 moléculas/célula. Por otro lado GPA33 no se secreta al medio extracelular, permaneciendo anclado a la membrana y expuesto al medio extracelular de manera constante (Ackerman *et al.*, 2008a y b).



**Figura 15:** Dos visiones del antígeno GPA33. a) Criosección de las vellosidades del intestino delgado. Se muestran células epiteliales expresando el GPA33 en la membrana basolateral (rojo), en verde células dendríticas en la lámina propia (Adaptado de Lee *et al.*, 2006). b) Criosección de tejido de colon teñido para el marcaje de actina (verde) y del GPA33 (rojo). Los núcleos se marcan en azul (Imagen tomada del Ludwig Cancer Research Institute).

Si bien, la función de GPA33 es desconocida por el momento, la identificación, estudio y regulación del gen que lo codifica permite sugerir una posible función en el intestino. Así por ejemplo, un estudio realizado con ratones deficientes en el gen que codifica la GPA33, mostró que estos ratones presentan serias deficiencias en la reparación de la mucosa gastrointestinal, encontrándose que el antígeno podría tener un papel clave en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, así como en la regulación de la respuesta inmune en la mucosa intestinal (Pereira-Fantini *et al.*, 2010). Además, considerando los factores que afectan a su regulación génica se ha descrito que esta proteína estaría involucrada en procesos de adhesión y tráfico intracelular (Heath *et al.*, 1997; Johnstone *et al.*, 2000; 2002; Mao *et al.*, 2003; Rageul *et al.*, 2009; Pereira-Fantini *et al.*, 2010).

Estudios recientes han mostrado la presencia de exosomas derivados de células madre en las criptas del intestino (Mathivanvan *et al.*, 2009) posiblemente involucrados en la regulación inmune en el intestino, así como en la regulación de la expresión del antígeno mediante el factor de transcripción GKLf (*gut-enriched Krüppel-like factor*) (Mao *et al.*, 2003) que apoyaría la hipótesis de una función relacionada con el crecimiento y proliferación celular (Welt *et al.*, 1994, 1996; Antoniwi *et al.*, 1996). Por último, se ha descrito que su expresión depende del ciclo celular y de la densidad de cultivo y que está regulada a su vez por el tráfico intracelular (Frey *et al.*, 2008). Estos aspectos explicarían los posibles mecanismos por el que las células tumorales escapan de los sistemas de control en el crecimiento celular.

El conjunto de las características que definen al antígeno GPA33 son las que animaron al estudio de este antígeno con mayor profundidad, al ser considerado como un marcador específico de cáncer de colon que puede ser utilizado para el diagnóstico y terapia (Welt *et al.*, 1994, 1996; King *et al.*, 1995; Antoniwi *et al.*, 1996; Johnstone *et al.*, 2000; Ritter *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2006; Barendswaard *et al.*, 1998)

#### **4.1.- El anticuerpo monoclonal mAbA33.**

El anticuerpo monoclonal A33 (mAbA33) ha sido desarrollado en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (NY) con la colaboración del Ludwig Institute for Cancer. En un primer momento, el anticuerpo, obtenido en ratón, se utilizó en estudios *in vitro* e *in vivo* con resultados muy prometedores, observándose que se unía específicamente al

antígeno GPA33 y que el complejo antígeno-anticuerpo se internaba rápidamente (Catimel *et al.*, 1996). Esto supuso el punto de partida para el diseño de distintos tipos de inmunoconjugados basados en el mAbA33 que se utilizarán en ensayos clínicos. Concretamente se realizaron estudios de fase clínica I y II de radioinmunoterapia, con el anticuerpo marcado con radionúclidos (Welt *et al.*, 1994; Daghighian *et al.*, 1996) y radioinmunoterapia conjugada con quimioterapia. (Tschmelitsch *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos parecían indicar que este par antígeno GPA33-anticuerpo mAbA33 constituían un buen modelo de marcador tumoral-agente terapéutico contra el cáncer de colon. Además, los radioinmunoconjugados utilizados,  $^{125}\text{I}$ -mAb33 o  $^{131}\text{I}$ -mAb33, no sólo mostraron una marcada actividad antitumoral sino que esta actividad permanecía en el tumor durante 5-6 semanas, mientras que en tejido normal el marcaje había desaparecido completamente en 6 días (Welt *et al.*, 1994; 2003a y b). Sin embargo, en estos primeros ensayos clínicos la utilización de estos radioinmunoconjugados produjo una respuesta inmune anticuerpo humano anti-anticuerpo murino (HAMA, de sus siglas en inglés), que impedía prolongar el tratamiento, disminuyendo así su eficacia y su aplicación a largo plazo. Debido a esto se hizo necesario humanizar el anticuerpo para evitar esta respuesta secundaria no deseada.

De este modo, mediante inmunización de conejos con el antígeno y mediante “phage-display”, se obtuvo una variante parcialmente humanizada del anticuerpo (huA33) (Rader *et al.*, 2000), y con ello la posibilidad de estudiar el comportamiento del anticuerpo completo, de la región Fab o de los dominios variables (scFv) en nuevos ensayos clínicos.

Los primeros ensayos clínicos que se realizaron con esta variante parcialmente humanizada del mAbA33 se llevaron a cabo con el anticuerpo solo, centrándose principalmente en la aparición o no de una respuesta inmunogénica. Así, y a pesar de que se observó una reducción del tumor en muchos pacientes, apareció nuevamente una respuesta inmune asociada, en este caso del tipo anticuerpo humano-anti anticuerpo humano (HAAA, de sus siglas en inglés) (Ritter *et al.*, 2001; Welt *et al.*, 2003) que obligaba a un tratamiento combinado con inmunosupresores.

Debido a ello, y mediante *CDR-grafting*, se obtuvo una variante completamente humanizada, en la que sólo se mantenía el origen murino de los residuos que forman parte de los CDR (huA33) (Joosten *et al.*, 2004). Esta variante abrió la puerta a la obtención de nuevos inmunoconjugados con radionúclidos para su uso en diagnóstico mediante inmuno-PET (tecnología de emisión de positrones), mostrando su localización

en el tumor (Lee *et al.*, 2001, 2006; Höglund *et al.*, 2006). Así, el inmunoconjugado  $^{177}\text{Lu}$ -huA33 se estudió en ensayos *in vitro* e *in vivo* obteniéndose datos esperanzadores en cuanto a su biodistribución e internación (Almqvist *et al.*, 2006; 2007). Del mismo modo, los inmunoconjugados,  $^{125}\text{I}$ -huA33 o  $^{131}\text{I}$ -huA33, se ensayaron en fase clínica I, observándose una rápida y selectiva localización del anticuerpo en el tumor, y con una significativamente menor incidencia de aparición de respuesta HAHA (Chong *et al.*, 2005).

Esta variante humanizada, huA33, también se utilizó como punto de partida para la obtención de variantes más pequeñas que pudieran penetrar más fácilmente en tumores sólidos, obteniéndose así, por ejemplo, los scFvA33 (de sus siglas en inglés), que pueden producirse de forma recombinante con gran rendimiento en un sistema heterólogo como el basado en la levadura metilotrónica *P. pastoris* (Damasceno *et al.*, 2004, 2007 y 2009). Los scFvA33 se han estudiado tanto para diagnóstico como para terapia. Así, la construcción scFvA33-GFP (Petrausch *et al.*, 2007) permitió visualizar y seguir la unión de los dominios variables al antígeno GPA33, y su posterior internación. También se llevó a cabo la producción de los scFvA33 unidos a la citosinadeaminasa (CD, de sus siglas en inglés), para su posible utilización en ADEPT (Deckert *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito la obtención de una variante de scFvA33 que incluye esta proenzima y un radionúclido,  $^{131}\text{I}$ -scFvA33-CD (Pandijeh *et al.*, 2008) combinando así dos terapias diferentes para aumentar su efectividad. Otra estrategia consistió en inmunoconjugados con partículas de oro, destinada a fototerapia (Kirui *et al.*, 2010).

Sin embargo, aunque los resultados obtenidos hasta el momento tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando los scFvA33 son muy positivos, no se han descrito inmunotoxinas basadas en ellos comprobándose la especificidad de unión de la proteína a las células presentadoras del antígeno GPA33, produciéndose después la muerte de las células tumorales.

## 5.- RIBONUCLEASAS EXTRACELULARES FÚNGICAS

Como se ha comentado anteriormente, algunas de las inmunotoxinas descritas en la literatura contenían en su dominio tóxico, una ribotoxina, o una RNasa no tóxica en el caso de las inmunorribonucleasas. El grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral, lleva más de dos décadas profundizando en el

conocimiento de los mecanismos moleculares de actuación de esta familia de ribonucleasas extracelulares fúngicas. El conocimiento adquirido a lo largo de estos años acerca de estas ribonucleasas, junto con el desarrollo de las técnicas y metodología asociadas a la ingeniería de proteínas, nos permitió iniciar hace unos años una línea de investigación dirigida a su aplicación en la obtención de inmunotoxinas.

Las RNasas son un conjunto de enzimas cuyos miembros presentan una diversidad enorme a nivel de función y estructura (Aravind y Koonin, 2001), y cuya característica común es su capacidad para romper enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos. Estas enzimas participan en gran variedad de procesos como la degradación y maduración del RNA celular, el silenciamiento génico o la traducción génica, entre otros (D'Alessio *et al.*, 1997; Beintema *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Carmell *et al.*, 2004).

Las RNasas presentan diferentes localizaciones, pudiendo ser intracelulares o extracelulares, siendo estas últimas secretadas por el organismo productor. Así, su función está íntimamente relacionada con su localización, pudiendo participar en la defensa del organismo productor o en la degradación de RNA exógeno para la obtención de bases nitrogenadas y fosfato (Macintosh *et al.*, 2001, Deshpande *et al.*, 2002). De estos dos grupos, las RNasas extracelulares son las menos numerosas y se clasifican en tres superfamilias (Aravind y Koonin, 2001), siendo la superfamilia de la barnasa (el miembro principal) la que nos interesa, pues en ella se incluyen las RNasas microbianas objeto de estudio en esta Memoria (Yoshida, 2001; Wool, 1997).

Las RNasas extracelulares microbianas, en general, están formadas por una única cadena polipeptídica de pequeño tamaño y de origen bacteriano o fúngico. Todas ellas tienen en común un patrón de plegamiento homólogo: una lamina  $\beta$  antiparalela de cuatro hebras y un centro activo compuesto, principalmente, por la triada catalítica E-R-H. Otra característica común, y además relevante para su implicación en el diseño de inmunotoxinas, es que su actividad no se ve inhibida por la presencia del inhibidor intracelular de RNasas (RI, de sus siglas en inglés) debido a su incapacidad para interaccionar con las RNasas microbianas extracelulares (Kim *et al.*, 1995; Hofsteenge, 1997).

El carácter citotóxico o no de las RNasas que componen esta familia, permite dividir las en dos familias: la familia de RNasas no tóxicas, cuyo máximo exponente es la RNasa T1, producida por el hongo *Aspergillus oryzae*, y la familia de las RNasas tóxicas

o ribotoxinas, cuyo miembro más destacado y mejor estudiado es la  $\alpha$ -sarcina, producida por el hongo *Aspergillus giganteus*.

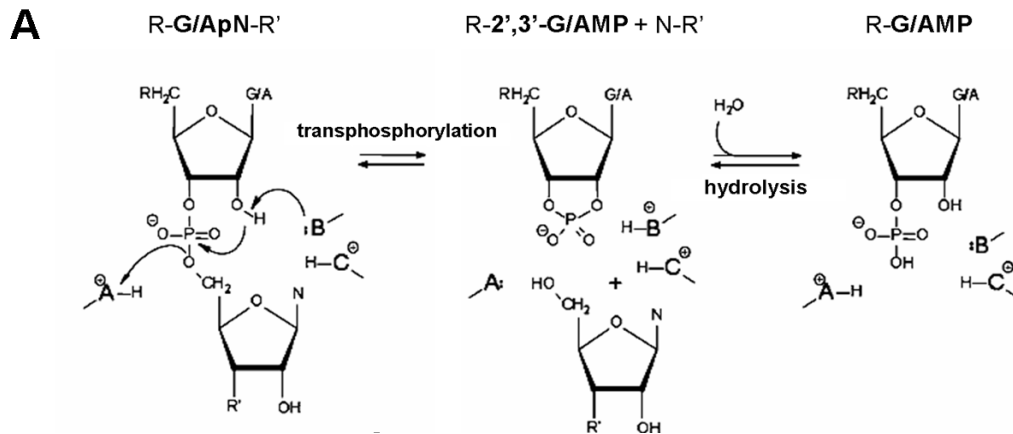
### 5.1.- La RNasa T1

La RNasa T1 es el miembro más representativo de la familia de ribonucleasas extracelulares fúngicas no tóxicas, y junto con la RNasa A y la lisozima, es una de las enzimas más exhaustivamente estudiada (Steyaert, 1997; Raines, 1998). Es producida por el hongo *Aspergillus oryzae*, y fue aislada por primera vez en 1957 en el grupo de los doctores Sato y Egami, en 1957 (Sato y Egami, 1957). Aunque la función biológica de las RNasas de esta familia permanece aún desconocida, hay estudios que las relacionan con cambios en la superficie celular, que se relacionarían con variaciones en la permeabilidad iónica, estimulando así el crecimiento microbiano (Makarov e Ilinskaya, 2003).

La RNasa T1 es una proteína pequeña de 114 aminoácidos con un marcado carácter ácido, que conforma una estructura tridimensional consistente en una lámina  $\beta$  antiparalela compuesta por cinco hebras  $\beta$ , estabilizada por una hélice  $\alpha$  acoplada. El resto de la secuencia conforma cinco bucles de estructura no ordenada y una pequeña lámina  $\beta$  de dos hebras en el extremo amino terminal (Arni *et al.*, 1988).

Su actividad ribonucleolítica implica la hidrólisis de RNA de cadena simple de manera inespecífica, aunque presenta preferencia por guaninas, en una secuencia GpN (Egami *et al.*, 1980). Su preferencia por guanina viene dada por interacciones con residuos del entorno del centro activo (Loverix *et al.*, 1997), siendo la eficacia catalítica frente a sustratos GpN unas  $10^6$  veces mayor que frente a ApN. Esta eficacia también varía C, siendo el sustrato ideal GpC (Osterman *et al.*, 1978).

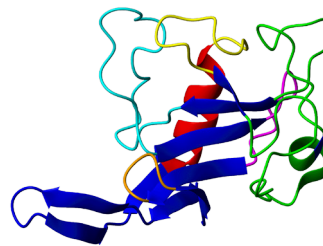
El mecanismo enzimático de la RNasa T1 está perfectamente establecido, con los residuos que forman parte del centro activo asignados (Steyaert, 1997; Loverix y Steyaert, 2001; Yoshida, 2001), entre los que se encuentran dos histidinas y un glutámico. Sigue un mecanismo general ácido-base, en dos etapas, que implica la formación de un intermedio cíclico, clasificándose así como RNasa ciclante (**Figura16**)



**Figura 16:** Mecanismo catalítico propuesto para la RNAsas ciclantes. El tipo de sustrato (dinucleótido, homo- o heteronucleótido) viene determinado por R y R'. A y B son el par catalítico ácido-base general, y C, estabiliza el intermedio de la reacción, siendo los tres residuos esenciales en las RNAsas microbianas, para la catálisis.

## 5.2.- Las ribotoxinas

Dentro de la superfamilia de la barnasa, las ribotoxinas constituyen una familia de ribonucleasas secretadas por hongos, que inactivan los ribosomas mediante la hidrólisis específica de un único enlace en el RNA mayor del ribosoma, provocando la inhibición de la biosíntesis de proteínas y consecuentemente la muerte celular por apoptosis (Gasset *et al.*, 1994; Kao *et al.*, 2001; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001; Lacadena *et al.*, 2007). Su descubrimiento se realizó en 1963, durante un programa de búsqueda de agentes antitumorales y antibióticos organizado por el Departamento de Salud de Michigan, encontrándose una actividad inhibitoria de sarcoma 180 y carcinoma 755 inducidos en ratón (Olson y Goerner, 1965), que se relacionó posteriormente con una proteína a la que se denominó  $\alpha$ -sarcina (**Figura 17**) (Olson y Goerner, 1965).

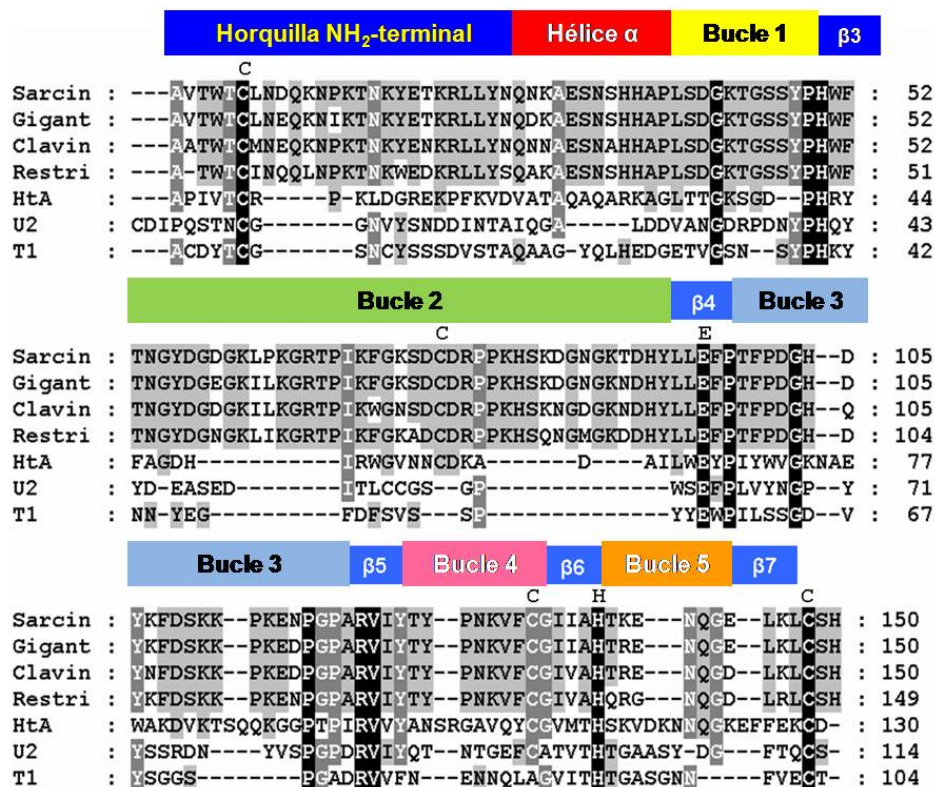


**Figura 17:** Estructura tridimensional de la  $\alpha$ -sarcina (PDB 1DE3). Diagrama generado con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

Posteriormente, se identificaron otras proteínas con actividades similares, producidas también por otras cepas de *Aspergillus*, como la restrictocina y mitogilina (*A. restrictus*), o la Asp f 1 (*A. fumigatus*) (Arruda *et al.*, 1992; Gasset *et al.*, 1994; Wool, 1997; Kao *et al.*, 2001; García-Ortega *et al.*, 2005); o por otras especies fúngicas, que también han sido caracterizadas, al menos parcialmente, como la hirsutelina A, gigantina o clavina, entre otras (Lin *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 1997; Martínez-Ruiz *et al.*,

1999a y b; Lacadena *et al.*, 2007; Herrero-Galan *et al.*, 2008, 2012a y b). Todas ellas muestran un alto nivel de conservación, exhibiendo una similitud de secuencia de más del 85 % (Figura 18).

La única excepción corresponde a la hirsutelina A, producida por un hongo patógeno de invertebrados, *Hirsutella thompsonii*, que ha sido incluida recientemente en la familia de las ribotoxinas, a pesar de que sólo muestra un 25% de identidad de secuencia (Herrero-Galán *et al.*, 2008, 2012a y b).



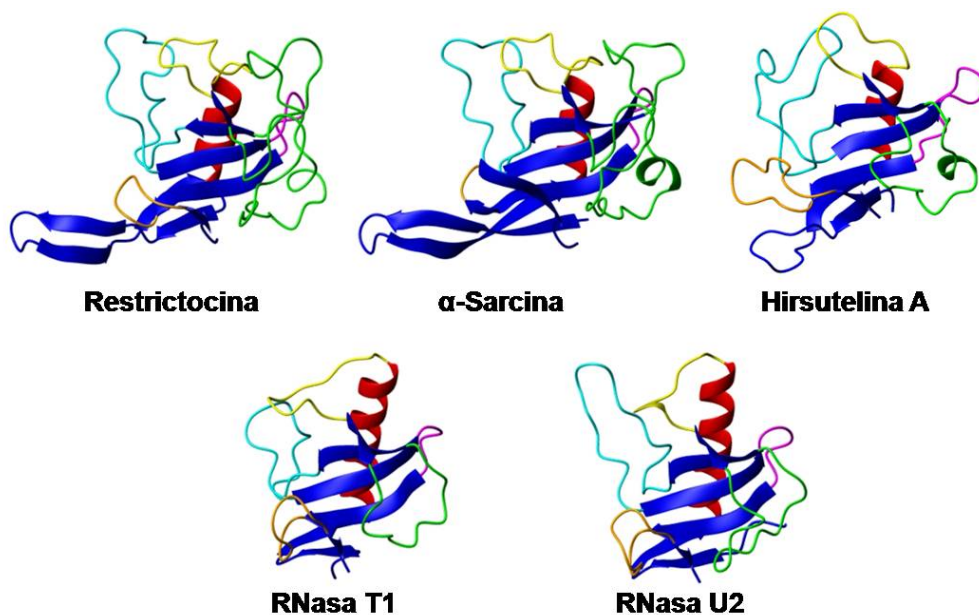
**Figura 18:** Alineamiento de secuencia de algunas de las ribotoxinas, junto con las RNasas T1 y U2. Se indican los residuos de cisteína de las ribotoxinas, así como los tres residuos catalíticos.

### 5.2.1.- Características estructurales

Las ribotoxinas son proteínas básicas de unos 150 aminoácidos, a excepción de HtA que presenta un número menor, que presentan un elevado grado de identidad, incluyendo dos puentes disulfuro, conservados en toda la familia (Rodríguez *et al.*, 1982, Sacco *et al.*, 1983; López-Otín *et al.*, 1984; Arruda *et al.*, 1990; Wirth *et al.*, 1997; Martínez-Ruiz *et al.*, 1999b; Lacadena *et al.*, 2007; Carreras-Sangrà *et al.*, 2008).

Las principales diferencias en la secuencia se centran en los bucles de estructura no ordenada, que a su vez difieren de los de las RNAsas microbianas no fúngicas.

Se ha determinado la estructura tridimensional correspondiente a la restrictocina (Yang y Moffat, 1996; Yang *et al.*, 2001),  $\alpha$ -sarcina (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000 y 2002; García-Mayoral *et al.*, 2005a y b) e hirsutelina (Viegas *et al.*, 2009). El plegamiento de la  $\alpha$ -sarcina implica una estructura  $\alpha+\beta$  con una lámina central antiparalela constituida por 5 hebras y una hélice de algo más de dos vueltas (**Figuras 17 y 19**) (Campos-Olivas *et al.*, 1996a y b; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Esta lámina, muy alabeada, define una cara convexa que se encuentra interaccionando con la hélice  $\alpha$ , quedando localizados en la cara cóncava los residuos que forman parte del centro activo, Tyr 48, His50, Glu96, Arg121, His137, e Leu 145, dirigiéndose sus cadenas laterales hacia el exterior de la cavidad. Otro elemento destacable es la existencia de una horquilla  $\beta$  en el extremo amino terminal, formada por los residuos 1 a 26, que es también diferente en el caso de la hirsutelina A. (**Figura 19**).



**Figura 19:** Estructuras tridimensionales de la restrictocina,  $\alpha$ -sarcina, hirsutelina A y las RNAsas T1 y U2. Las estructuras se han ajustado con las coordenadas atómicas de los residuos del centro activo y con los puentes disulfuro comunes a las tres proteínas. Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

El extremo final de la horquilla, muy expuesto al disolvente, le confiere un papel relevante en la funcionalidad de la proteína, siendo responsable de establecer

interacciones específicas con algunas proteínas ribosomales para dirigir la ribotoxina a la región del SRL (García-Ortega *et al.*, 2002; García-Mayoral *et al.*, 2005b).

Entre los diferentes bucles, el bucle 2, que es de los que muestran más diferencias con la RNasa T1, es esencial por sus implicaciones funcionales. Tiene un alto contenido en Lys y Gly, se encuentra muy expuesto al disolvente y presenta una elevada movilidad, a pesar de tener una conformación bien definida. La secuencia comprendida entre los residuos 52 y 54 se encuentra fijada al armazón estructural a través de la Asn 54 que aparece conservada en todas las RNasas fúngicas extracelulares (Mancheño *et al.*, 1995; Hebert *et al.*, 1998; Siemer *et al.*, 2003). Por otro lado, esta misma secuencia, implicando los residuos 51 y 55 interaccionaría específicamente con el SRL, en las proximidades del enlace que es hidrolizado, interaccionando con el nucleótido de guanina prominente, que es el elemento más significativo del SRL (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

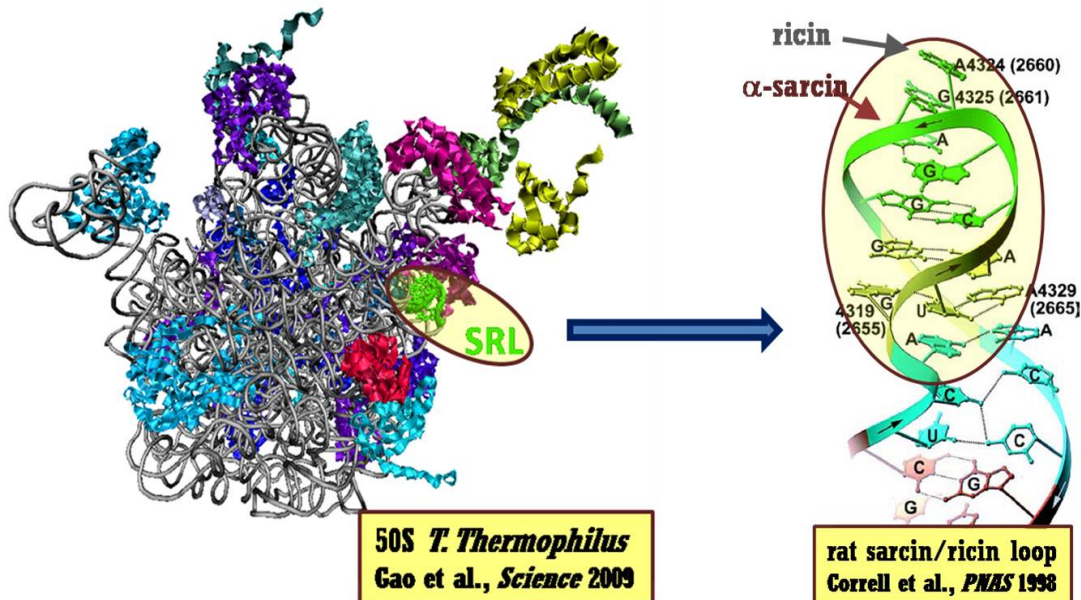
Por último, y desde un punto de vista estructural hay que hacer mención a alguna de las características asociadas a los residuos del centro activo. De ellos sólo tres están directamente implicados en la transferencia de electrones durante la catálisis ácido-base, His 50, Glu 96 e His 137 (Lacadena *et al.*, 1999; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001). Éstos presentan unos valores de pKa inusuales, y formas tautoméricas de las His igualmente poco frecuentes, pero comunes a todas las RNasas microbianas. Además la His 137 establece un puente de hidrógeno esencial con el bucle 5.

### **5.2.2.- Características de su actividad ribonucleolítica**

El descubrimiento de su capacidad para inhibir la biosíntesis de proteínas, recuperó el interés por este grupo de proteínas, que habían sido aparcadas debido a su citotoxicidad inespecífica, y que en principio las incapacitarían para su aplicación en tratamientos o terapias antitumorales (Roga *et al.*, 1971).

Esta actividad inhibidora de la biosíntesis de proteínas es debida a su actividad ribonucleolítica sobre un único enlace (Schindler y Davies, 1977; Endo y Wool, 1982, Endo *et al.*, 1983), que se encuentra localizado en el RNA ribosomal de mayor tamaño, en una secuencia universalmente conservada y que desempeña un papel importante en la función ribosomal, ya que está implicada en procesos asociados a los factores de elongación EF-1 y EF-2 (Wool *et al.*, 1992). Este sitio funcional es conocido como el

lazo sarcina-ricina (SRL) (**Figura 20**), ya que sobre él actúan la  $\alpha$ -sarcina y la ricina, que son los dos miembros más representativos y mejor estudiados de las ribotoxinas y las proteínas inactivantes de ribosomas (RIPs), respectivamente (Nielsen y Boston, 2001; Peumans *et al.*, 2001).



**Figura 20:** A) Diagrama en el que se muestra la posición del SRL en la estructura de la subunidad mayor del ribosoma de *T. Thermophilus*. B) Estructura del SRL destacándose la G prominente y los dos nucleótidos flanqueantes del enlace que es cortado.

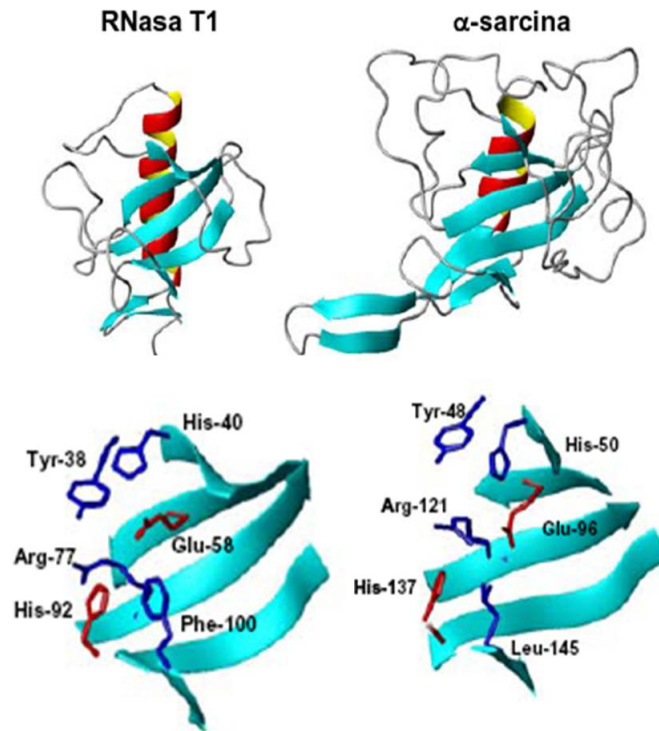
A diferencia de lo comentado anteriormente para la RNasa T1, las ribotoxinas se comportan como RNasas altamente específicas cuando se ensayan frente a su sustrato, el ribosoma. Esta actividad puede detectarse y cuantificarse como consecuencia de la producción o liberación de un fragmento característico de unos 490 pares de bases (en ribosomas de rata) denominado fragmento  $\alpha$ . De hecho, esta especificidad de acción se mantiene cuando se ensaya frente a un oligonucleótido sintético que mimetiza la estructura del SRL.

En cuanto a su mecanismo catalítico, al igual que las RNasas de la familia de la RNasa T1, las ribotoxinas siguen un mecanismo tipo ácido-base general, a través de un intermedio cíclico, siendo por tanto RNasas ciclantes (Lacadena *et al.*, 1998). En el caso concreto de la  $\alpha$ -sarcina, durante la primera parte de la reacción el Glu 96 actúa como base general y la His 137 como ácido general. En la hidrólisis del intermedio cíclico participan los mismos residuos pero que con funciones invertidas (Lacadena *et al.*, 1998, 1999). Esta combinación Glu/His es muy común como par catalítico en las ribonucleasas microbianas (Yoshida, 2001). La His 50 desempeña un papel importante

en la estabilización del intermedio de la reacción (Lacadena *et al.*, 1999). La producción de diferentes mutantes con modificaciones en el resto de residuos del centro activo, y su posterior caracterización, han permitido asignarles funciones importantes dentro de la actividad ribonucleolítica de las ribotoxinas. Así, la Arg 121 participa en la orientación correcta del sustrato en el centro activo, y desempeña además un papel esencial en la interacción con membranas lipídicas (Masip *et al.*, 2001); la Leu 145 es imprescindible para mantener el pKa anormalmente bajo de la His 137 y participa en la orientación del bucle 5 para evitar el acceso del disolvente al centro activo (Masip *et al.*, 2003); La sustitución de la Tyr 48 por Phe produce una inhibición completa de la actividad frente a ribosomas y otros sustratos poliméricos, indicando el importante papel de ese grupo OH (Álvarez-García *et al.*, 2006).

Al comparar la estructura tridimensional de la RNasa T1 y de la  $\alpha$ -sarcina en cuanto a la localización y orientación de los residuos que conforman sus correspondientes centros activos (**Figura 21**), se observa cómo estos son prácticamente idénticos, con muy pequeñas variaciones. Esto justificaría que compartan residuos catalíticos equivalentes y que su mecanismo ribonucleolítico sea similar. Sin embargo, no justificaría el comportamiento absolutamente distinto en cuanto a su especificidad y que debe relacionarse con la capacidad para reconocer e interactuar de manera específica el SRL y su entorno proteico (Lacadena *et al.*, 2007).

Así, en cuanto al reconocimiento del SRL por parte de las ribotoxina, éste depende principalmente de interacciones entre la proteína, el tetrabucle GAGA y la G prominente (Glück y Wool, 1996; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000), siendo además determinante la conformación global del SRL (Correll *et al.*, 2003, 2004). Sin embargo, estas interacciones con el SRL no explicarían por sí solas la exquisita especificidad de las ribotoxinas sobre el ribosoma, sino que esta se debería a la interacción entre los bucles de las ribotoxinas con algunas de las proteínas ribosomales. En este sentido, la horquilla amino terminal y el bucle 2, interactuarían con las proteínas ribosomales L14 y L6, respectivamente (García-Mayoral *et al.*, 2004 y 2005b). Las variaciones de secuencia en estas proteínas explicarían la diferencia de especificidad encontrada frente a ribosomas de diferentes especies (Schindler y Davies, 1977; Endo y Wool, 1982; Uchiumi *et al.*, 2002; García-Mayoral *et al.*, 2005b).



**Figura 21:** Estructuras tridimensionales de la RNasa T1 y la  $\alpha$ -Sarcina. Los diagramas se generaron con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996). En la parte inferior se muestra en detalle la disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos implicados en la catálisis ácido-base general.

### 5.2.3.- Interacción con membranas y citotoxicidad

Junto con su actividad ribonucleolítica, las ribotoxinas son capaces de atravesar membranas lipídicas, sin que se haya descrito hasta la fecha ningún receptor de naturaleza proteica (Gasset *et al.*, 1994; Kao *et al.*, 2001). Así, se ha descrito su actividad frente a células transformadas o infectadas por virus (Olson *et al.*, 1965; Fernández-Puentes y Carrasco, 1980; Olmo *et al.*, 2001), como consecuencia de la alteración de la permeabilidad en estas membranas, así como por la capacidad de las ribotoxinas para interactuar con fosfolípidos ácidos. Esta habilidad se relaciona con el carácter antitumoral que presentan y que llevó a su descubrimiento (Lacadena *et al.*, 2007). Los estudios realizados con vesículas modelo de diferente composición lipídica han mostrado como la  $\alpha$ -sarcina inicialmente produce agregación de las mismas, que evolucionan mediante un proceso de fusión hacia la formación de estructuras mayores, produciéndose su translocación al interior de las mismas (Gasset *et al.*, 1994). En este proceso de interacción con membranas desempeña un papel fundamental el carácter básico de algunos de los bucles de estructura no ordenada. Así, la presencia de un mayor contenido de fosfolípidos ácidos en las membranas de las células transformadas

explicaría esa citotoxicidad preferencial por ese tipo de células (Gasset *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1989; Turnay *et al.*, 1993).

La acción citotóxica de las ribotoxinas implica dos acciones secuenciales. Inicialmente se produce el paso a través de la membrana celular, siendo ésta la etapa limitante, y posteriormente se producirá la muerte celular como consecuencia de la actividad ribonucleolítica, que inactivaría el ribosoma inhibiendo la biosíntesis de proteínas, produciéndose la muerte por apoptosis (Turnay *et al.*, 1993; Olmo *et al.*, 2001).

Las ribotoxinas comparten con las RNAsas de la familia de la T1 el núcleo estructural central, diferenciándose principalmente en el número, longitud y composición de los bucles, que son más largos en las ribotoxinas y de carácter básico. Se sugiere así una función esencial de estos bucles en la toxicidad específica de las ribotoxinas (Martínez del Pozo, *et al.*, 1988 y 1989). Se abre así además una interesante hipótesis sobre la evolución de las ribotoxinas a partir de una RNasa del tipo de la T1 que hubiese incorporado secuencias de aminoácidos en estos bucles, capacitándolas para interactuar con membranas y aportando una especificidad en su actividad, por el ribosoma (Lamy *et al.*, 1992).

Si bien no se conoce a ciencia cierta cuál es la función biológica de las ribotoxinas, parecen estar diseñadas todas ellas con un objetivo claro de entrada en las células y la posterior inactivación de los ribosomas. Estudios anteriores propusieron una función defensiva de las ribotoxinas como mecanismo de protección de los hongos durante su reproducción, dada su localización en la superficie de los conidióforos fúngicos y su relación con la maduración de los conidios (Brandhorst y Kenealy, 1992). Más recientemente, se ha descrito el carácter insecticida de la hirsutelina A que apoyaría este hecho (Herrero-Galán *et al.*, 2008 y 2009).

Esta capacidad de atravesar membranas podría ser un inconveniente a la hora de plantearse la utilización de las ribotoxinas en el diseño de inmunotoxinas, ya que podría dar cuenta de una cierta citotoxicidad inespecífica. Sin embargo presentan numerosas ventajas que las convierten en buenas candidatas para su inclusión en estas construcciones. De hecho, no puede olvidarse que la acción preferencial de la  $\alpha$ -sarcina se realiza sobre células transformadas. Entre estas ventajas cabe destacar, como ya se ha mencionado anteriormente, su pequeño tamaño, su elevada termoestabilidad, la baja inmunogenicidad descrita para otros miembros de la familia como la restrictocina, su

exquisita y específica actividad ribonucleolítica frente a ribosomas, así como el conocimiento exhaustivo que se tiene de las bases moleculares de la relación estructura-función en estas proteínas y la disponibilidad de variantes de ribotoxinas que puedan tener optimizada su actividad biológica.

Por otro lado, las diferencias existentes entre la RNasa T1 y las ribotoxinas, en cuanto a su capacidad para interaccionar con membranas, y en su actividad ribonucleolítica, pueden ser analizadas y valoradas en cuanto a su repercusión en la obtención de inmunotoxinas o inmunorribonucleasas con mayor o menor eficacia y especificidad antitumoral.



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

A partir del conocimiento adquirido durante las últimas décadas en nuestro grupo de investigación en relación con las ribotoxinas y ribonucleasas de origen microbiano; hace ya unos años comenzamos una línea de investigación dirigida a la aplicación de éstas en el diseño y construcción de inmunotoxinas antitumorales. Los primeros resultados de esta línea de investigación se recogieron en la Tesis Doctoral de Nelson Carreras Sangrà.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral, continuación de esta línea de investigación se ha centrado en el diseño, construcción y caracterización de inmunotoxinas basadas en diferentes RNAsas microbianas y en el anticuerpo monoclonal A33 que reconoce específicamente un antígeno tumoral.

Para llevar a cabo este objetivo se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Caracterización estructural y funcional de inmunotoxinas basadas en los dominios variables scFvA33 como dominio marcador; y las ribotoxinas,  $\alpha$ -sarcina e HtA3 $\Delta$ W, o la RNasa no tóxica, RNasaT1, como dominio tóxico.**
- 2.- Estudio de la relación entre la eficacia citotóxica y las rutas de entrada y procesamiento de las inmunotoxinas en el interior celular.**
- 3.- Caracterización del efecto antitumoral en ensayos preliminares *in vivo*.**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES

### 1. Tipos Celulares y organismos.

#### 1.1.- *E. coli*:

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$ F'. Genotipo: F' *endA1 hsdR17* ( $r_K^- m_K^-$ ) *supE44 thi-1 recA1 gyr A* (NaI<sup>R</sup>) *relA1*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* [ $\theta$ 80 *dlac*  $\Delta$ (*lacZ*) M15]. Esta cepa es utilizada para la amplificación y propagación de los plásmidos; así como para su aislamiento. El genotipo *endA1* de esta cepa mejora la eficacia de la purificación del plásmido. El genotipo F' indica la presencia en el citoplasma del factor F' o factor de fertilidad, en el que radica la capacidad de transferir DNA por conjugación. El factor F es un elemento pequeño de DNA circular que funciona como un minicromosoma con alrededor de cien genes, que le confieren capacidad para replicar su DNA de forma independiente y codificar para el *pili* bacteriano. Estas células se preparan mediante el método de Hanahan, con una modificación que implica el empleo de RbCl (Hanahan *et al.* 1983).

#### 1.2.- *P. pastoris*:

Se utilizó la cepa KM71 de *P. pastoris*. Genotipo: *aox1: ARG4*. Fenotipo: His-, MutS. Esta cepa tiene interrumpido el gen de la enzima Alcohol oxidasa I, siendo la Alcohol oxidasa II la única responsable del metabolismo del metanol. Como el 80% de la actividad total del metabolismo del metanol es llevada a cabo por el gen *aox1* y éste se ve interrumpido, el metanol se metaboliza lentamente. De ahí que la cepa sea MutS (Methanol Utilization Slow), creciendo lentamente en presencia de metanol.

#### 1.3.- Líneas celulares de mamífero

##### RD86a

Células de rabdomiosarcoma humano. Estas células se han utilizado como antígeno negativas, por no presentar el antígeno GPA33 en su membrana. Su utilización

es de especial interés en el caso de la  $\alpha$ -sarcina, al ser una línea celular muy sensible a la acción de la  $\alpha$ -sarcina, lo cual ha sido ampliamente caracterizado (Olmo *et al.*, 2001). Se crecen en DMEM suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300  $\mu$ g/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50  $\mu$ g/ml). El cultivo celular se incuba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). El mantenimiento y propagación de las células se lleva a cabo mediante tripsinización.

#### **A431**

Células de carcinoma epidérmico humano. Estas células se han utilizado como antígeno negativas, por no presentar el antígeno GPA33 en su membrana. Se crecen en DMEM suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300  $\mu$ g/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50  $\mu$ g/ml). El cultivo celular se incuba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). Su mantenimiento y propagación se lleva a cabo mediante tripsinización

#### **MCF7**

Células de adenocarcinoma de mama humano. Estas células se han utilizado como antígeno negativas, por no presentar el antígeno GPA33 en su membrana. Se crecen en DMEM suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300  $\mu$ g/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50  $\mu$ g/ml). El cultivo celular se incuba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). El mantenimiento y propagación de las células se lleva a cabo mediante tripsinización.

#### **HT29**

Células de adenocarcinoma de colon humano. Estas células se han utilizado como antígeno negativas, por no presentar el antígeno GPA33 en su membrana. Su utilización es interesante al ser células de colon, al igual que las células antígeno-positivas usadas en este ensayo. Se crecen en DMEM suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300  $\mu$ g/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50  $\mu$ g/ml). El cultivo celular se incuba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). Su mantenimiento y propagación se lleva a cabo mediante tripsinización.

**SW1222**

Células de carcinoma de colon humano. Estas células se han utilizado como antígeno positivas, al presentar el antígeno GPA33 en su membrana, en grandes cantidades (Heath *et al.* 1997). Las células presentan diferenciación espontánea y crecen en forma de domos. Se obtuvieron a través de una estancia realizada en la Universidad de Cornell (NY) en el laboratorio del Dr. Carl Batt, a través del Ludwig Cancer Institute. Se crecen en RPMI 1640 suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300 µg/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). El cultivo celular se incubaba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). El mantenimiento y propagación de las células se llevan a cabo mediante tripsinización

**LIM1215**

Células de carcinoma de colon humano. Estas células se han utilizado como antígeno positivas, al presentar el antígeno GPA33 en su membrana. Es la línea celular más utilizada en lo que al antígeno GPA33 se refiere, ya que fue la utilizada inicialmente para la caracterización del antígeno GPA33. Se obtuvieron a través de una estancia realizada en la Universidad de Cornell (NY) en el laboratorio del Dr. Carl Batt, a través del Ludwig Cancer Institute. Se crecen en RPMI 1640 suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300 µg/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). El cultivo celular se incubaba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). Su mantenimiento y propagación se lleva a cabo mediante tripsinización

**AsPC-1**

Células pancreáticas derivadas de metástasis de cáncer de colon. Estas células se han utilizado como antígeno positivas, al presentar el antígeno GPA33 en su membrana. Su utilización es interesante al ser antígeno positivas, pero de origen metastático lo que permite estudiar diferencias en cuanto a la densidad de antígeno. Se crecen en RPMI 1640 suplementado con suero al 10%, conteniendo glutamina (300 µg/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 µg/ml). El cultivo celular se incubaba a 37°C en atmosfera húmeda (CO<sub>2</sub>/aire, 1:19 v/v). El mantenimiento y propagación de las células se llevan a cabo mediante tripsinización

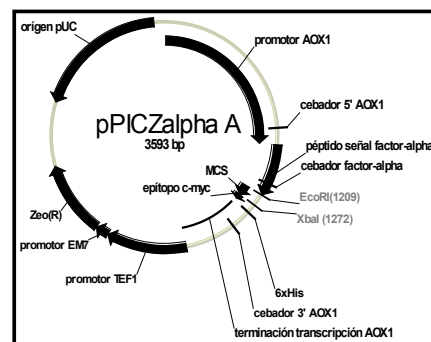
### 1.4.- Organismos: Ratones *nude*

Para los estudios *in vivo* se utilizan ratones *nude*. Esta cepa de ratón se caracteriza por presentar una mutación génica en el gen FOXP1 que conlleva un deterioro o ausencia del timo, siendo por tanto ratones inmunodeficientes. Esta característica permite el injerto de tejido tumoral sin causar rechazo, y el posterior estudio de posibles tratamientos o métodos de diagnóstico. El apelativo *nude* viene referido a que estos ratones presentan fenotípicamente la carencia total de vello corporal.

## 2.- Vector de clonación y producción en *P. pastoris*:

### pPICZαA (Invitrogen)

Este plásmido contiene regiones homólogas a la secuencia del gen AOX1' de *P. pastoris* que permiten la integración, por recombinación, del cDNA de interés en el genoma de la levadura. Además, anterior al sitio de multiclونación, se encuentra la secuencia codificante del péptido señal del factor alfa que permite la secreción al medio extracelular de la proteína recombinante. Asimismo se incluye la secuencia codificante para una extensión de 6 histidinas que facilitan la purificación de la proteína. Contiene también una región que confiere resistencia a zeocina que permitirá la selección de cepas recombinantes, en función del número de copias integradas en el genoma (**Figura 1**). La expresión de la proteína está sujeta a la expresión del gen AOX1' inducible por metanol. El plásmido ha de estar en forma lineal para su recombinación en el genoma de la levadura. Para ello se utiliza uno de los tres sitios que presenta: *Sac I*, *Pme I* o *Bst XI*.



**Figura 1:** Esquema del plásmido pPICZαA. Se muestran las distintas secuencias que forman parte del plásmido.

### 3.- Medios de cultivo

#### 3.1.- Medios de cultivo para *P. pastoris*

**YPD:** Medio compuesto por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de dextrosa. En el caso de la preparación de placas se añade un 2% de agar. Además se puede añadir zeocina a distintas concentraciones para la selección de recombinantes con gran número de copias. En nuestro caso se utilizan unas concentraciones de zeocina entre 100 y 750 µg/ml.

**YPDS:** Este medio tiene la misma composición que el medio YPD añadiendo además sorbitol hasta una concentración 1M. Utilizado para la obtención de colonias después de la electroporación.

**BMGY:** Medio compuesto por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100mM de tampón fosfato potásico pH 6.0, 1.34% de YNB,  $4 \times 10^{-5}$  de Biotina y 1 % de glicerol. Es el medio de crecimiento de *P.pastoris*.

**BMMY:** Medio con la misma composición al BMGY sustituyendo el 1% de glicerol por 1 % de metanol. Es el medio de inducción de la expresión de proteína recombinante de *P.pastoris*.

**Medio Suplemento:** Medio compuesto por extracto de levadura (1%, p/v), PMSF (1mM), metanol (0.5%, v/v) y glicerol (0.125%, v/v).

### 4.- Tampones

#### 4.1.- Tampones de uso general

##### 4.1.1.- Antibióticos:

Zeocina: Se prepara en H<sub>2</sub>O milliQ. Se esteriliza por filtración. Se utiliza a una concentración final de 100, 400 o 750 µg/ml, para la selección de colonias con múltiples copias de plásmido y por tanto superproductoras.

#### 4.1.2.- Electroforesis de ácidos nucleicos:

**TAE 1x:** Tris-acetato 0.04 M (484 g/l de Tris-base y 1.14 ml/l de ácido acético glacial), EDTA 1mM.

**Tampón de aplicación 6x** (electroforesis de DNA): azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

#### 4.1.3.- Electroforesis de proteínas:

**Azul de Coomassie:** Azul de Coomassie R-250 0.26% (p/v), Metanol absoluto 45.4% (v/v), AcH glacial 9.2% (v/v), y H<sub>2</sub>O.

**Solución de desteñido:** Metanol absoluto 20% (v/v), AcH glacial 7.5% (v/v) y H<sub>2</sub>O.

**Tampón de aplicación 1x** (electroforesis de proteínas): Tris-HCl 50mM pH 7.6, EDTA 2mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v). Cuando se quisieron reducir las muestras, se añadió 2-mercaptoetanol al 5% (v/v).

**Tampón de desarrollo de electroforesis:** Tris-HCl 25mM, glicocola 0.2M y SDS 0.1% (v/v).

#### 4.1.4.- Inmunodetección (Western Blot):

**PBS** (tampón fosfato salino): NaCl 0.14M, KCl 2.7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1mM, pH 7.4.

**Solución de revelado:** Tetrahidroclorato de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) 0.03% (p/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.016% (v/v) en 50 ml de tampón PBS.

**Tampón de transferencia:** Tris 48mM, Glicocola 39mM, SDS 0.0375% (p/v) y metanol 20% (v/v)

#### 4.2.- Tampones utilizados en la caracterización de inmunotoxinas:

Tampón de lisis para obtener extractos celulares: PBS-Triton 1%, PMSF 1mM, Pepstatina 0.1mM, Leupeptina 0.1mM y Aprotinina 0.1 U/ml

##### 4.2.1.- ELISA

Tampón de bloqueo: PBS- Leche 3%

Tampón de lavado: PBS-Tween 0.5%

Tampón de revelado: Citrato sódico 0.1M, pH 5.0, metanol al 4% (v/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03% (v/v) OPD (cromógeno o-fenilendiamina) (Merck) 0.63 mg/ml.

Tampón de muestras: PBS-Leche 0.1%.

##### 4.2.2.- Citometria

Tampón de muestras y lavado: PBS, BSA (1%, p/v)

##### 4.2.3.- Ensayo de actividad con reticulocitos:

Tampón A: Tris 40mM, KCl 40mM, EDTA 10mM, pH 7.5

Tampón B: Tris 50mM, SDS 5%, pH 7.4

MOPS 10x: MOPS 0.2M, NaAc 50mM, EDTA 10mM, pH 7.0

#### 4.3.- Relación de anticuerpos utilizados:

La **Tabla 1** muestra el elenco de anticuerpos utilizados para la realización de la presente tesis.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	1°	2°	DILUCIÓN			T (°C)	T (hr)	Procedencia	Utilización
				WB	CF	IF				
anti- $\alpha$ -sarcina	$\alpha$ -sarcina			1/3000	1/500	1/500	25	3	UCM	1° de dominio tóxico
anti-Hta	HtA			1/5000			25	3	UCM	
anti-RNasa T1	RNasa T1						25	1	Anticuerpos online.com	
GAR-HRP	IgG conejo			1/3000	-	-	25	1	BioRad	2° de WB y ELISA
GAM-HRP	IgG raton			1/1500	-	-	25	1	Pierce	
Histag-HRP	Tag de His			1/1000	-	-	4	O.N.	Sigma	WB expresión en Pichia
Histag	Tag de His			1/400	1/100	-	4	O.N.	AnaSpec	WB con células
Histag-Alexa 488	Tag de His			-	1/100	1/100	25	1	SantaCruz	Usar en CF, fondo en IF
GAR-FITC	IgG conejo			-	1/100	-	25	1	UCM	2° de CF e IF
GAR-Alexa 488	IgG conejo			-	1/400	1/400	25	1	Invitrogen	
DAM-Alexa 647	IgG ratón			-	-	1/400	25	1	Invitrogen	
Anti-CD44	CD44			-	-	1/1000	25	0.25	BD Pharmigen	Marcador de membrana
Anti-EEA1	EE			1/1000	-	1/1000	25	1	Abcam	Marca Endosoma Temprano
hu-mAbGPA33	GPA33			1/100	1/10	-	25	1	SantaCruz	Control ⊕

**Tabla 1:** Se muestran los anticuerpos utilizados y la dilución empleada en las diferentes técnicas inmunológicas (Western Blot (WB), citometría de flujo (CF) o inmunofluorescencia (IF)).

## MÉTODOS

### 1.- Técnicas de purificación y caracterización de ácidos nucleicos

#### 1.1.- PCR

Las reacciones de PCR se han llevado a cabo en un termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer). Para la amplificación del cDNA de las distintas construcciones de Fv e inmunotoxinas se han utilizado 50  $\mu$ l de una mezcla de reacción conteniendo: dNTPs (200  $\mu$ M cada uno), cebadores (1  $\mu$ M cada uno) y la enzima *Pfu* Polimerasa (Promega) junto con su tampón comercial.

## 1.2.- Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones enzimáticas del DNA se realizaron siguiendo los protocolos propios de cada enzima en lo referente al tampón, temperatura y tiempo óptimo de la misma, cantidad de DNA a digerir, etc. En algún caso se utilizó una mezcla de reacción conteniendo RNasa A (0.5 mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA; 1 mg/ml). El rendimiento de las digestiones se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7-1% (p/v) en TAE 1x.

## 1.3.- Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al 0.7-1% (p/v) en TAE 1x, dependiendo del tamaño del DNA que se quería detectar o purificar. Las electroforesis se desarrollaron a 80-100 V con voltaje constante. Las muestras se aplicaron en tampón de aplicación 6x (ver: Tampones y Soluciones de uso general). Una vez finalizado el proceso electroforético se tiñó el DNA con bromuro de etidio (1 µg/ml), observándose las bandas bajo luz ultravioleta. En los casos en los que se pretendía purificar fragmentos de DNA de elevado tamaño se utilizó una agarosa de bajo punto de fusión.

## 1.4.- Ligación

La reacción de ligación de fragmentos de DNA, necesaria para el clonaje de los insertos correspondientes a los mutantes en los diferentes vectores de expresión y su posterior transformación en cepas de *E. coli*, se realizó utilizando la DNA ligasa del bacteriófago T4. La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y ATP 1 mM, y se mantuvo a 16°C durante 4-16 horas.

## 1.5.- Miniprep

El DNA plasmídico se aisló con el método comercial de Promega “*Wizard minipreps*”. Para ello, se inocularon 5 ml de medio LB (con el antibiótico correspondiente) con una colonia aislada del clon de bacterias transformadas que interesaba. El cultivo se creció durante 16 h a 37°C, transcurridas las cuales, se congeló

una alícuota de 1ml de células a  $-80^{\circ}\text{C}$  (véase Conservación de cepas de *E. coli*) A continuación las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM y RNasa A 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Posteriormente, se lisaron en NaOH 0.2 M, SDS 1%. El pH de la muestra se neutralizó con acetato potásico 1.32 M, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico se puso en contacto con la resina del *kit*, que presenta afinidad por el DNA. Este DNA unido a la resina se lavó con la “solución de lavado” (NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 5 mM) diluida 1:1 en etanol 95%, eluyéndose a continuación por adición de agua. El DNA plasmídico así purificado se analizó por electroforesis, obteniéndose con un grado de pureza suficiente para el posterior análisis de restricción y secuenciación. Cada vez que se preparó un nuevo plásmido, una vez suficientemente caracterizado (análisis con enzimas de restricción, comportamiento en electroforesis de agarosa), se procedió a su purificación a mayor escala. Para ello, se utilizó el *kit* de “*Wizard maxipreps*” que, esencialmente, consiste en un tratamiento prácticamente idéntico al descrito en las líneas anteriores, pero adaptado a 500 ml de cultivo inicial de bacterias y se eluye el DNA por adición de TE.

#### 1.6.- Purificación de fragmentos de DNA

La purificación se realizó con el método comercial de Promega “*Wizard PCR preps*”, similar al utilizado para la purificación de DNA plasmídico. En este caso, se procedió inicialmente a fundir el bloque de agarosa, por incubación durante 5 minutos a  $55-65^{\circ}\text{C}$ , y se añadió rápidamente la resina suministrada en el *kit*. El proceso de unión del DNA a la resina, su posterior lavado y elución se realizó del mismo modo que el descrito para la purificación de DNA plasmídico.

#### 1.7.- Transformación *E. coli*

Se extrajo una alícuota, previamente preparada a partir del vial original, dejándose descongelar a temperatura ambiente, durante unos cuatro minutos y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Se añadió el DNA plasmídico o la mezcla de ligación con los que se deseaba transformar (1-10 ng de DNA), y se mantuvieron otros 30 minutos en hielo. La entrada del DNA al interior de las células se facilitó mediante un choque térmico por incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 30 segundos, y enfriamiento posterior en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 950  $\mu\text{l}$  de LB a temperatura ambiente,

incubándose las células durante una hora a 37°C y agitación constante (250 rpm), en incubador, para permitir la recuperación de la integridad de la membrana y la expresión de los vectores. Por último, se sembraron diferentes volúmenes en placas de LB con el/los antibiótico/s correspondiente/s, incubándose a 37°C hasta la aparición de colonias transformadas.

### **1.8.- Electroporación en *P. pastoris***

Para electroporar se utiliza entre 5-10 µg de DNA (utilizando como máximo 10 µl). Se utilizará este protocolo para la cepa KM71 (Mut<sup>S</sup>). Los diferentes pasos se realizaron en condiciones de esterilidad. Se descongelaron las células en hielo (alícuotas de 100 µl) añadiendo posteriormente el DNA a electroporar. Se mezcla suavemente y se pasó a la cubeta de electroporación. La mezcla se incubó 5 minutos en hielo. Se secó la cubeta y comprobó que el volumen de 100 µl se encuentra bien distribuido. Se dio el pulso y rápidamente se añadió 1 mililitro de sorbitol 1 M mezclándose suavemente y trasvasándose a un tubo corning. La mezcla se mantuvo en hielo durante 2 horas y se añadió 1 mililitro de YPD, incubándose 4 horas a 30°C y 250 rpm. Finalmente, se centrifugaron brevemente para recoger las células en unos 100 µl de la misma mezcla, que se sembraron en placas YPDS-agar con distintas concentraciones de zeocina y se dejaron incubando a 30°C hasta observar la aparición de colonias (entre tres y cinco días).

## **2.- Técnicas de purificación y caracterización estructural de proteínas.**

### **2.1.- Producción de inmunotoxinas**

Se sigue el Manual “EasySelect TM *Pichia* Expression Kit” de Invitrogen. Inicialmente se inocula un precultivo con células de *P. pastoris* conteniendo el vector de expresión para las diferentes construcciones. A partir de este precultivo se inoculan 6 x 350 mL de medio mínimo BMGY. El cultivo se deja en agitación a 30°C durante 20-24 horas hasta que la DO<sub>600</sub> se encuentre entre 10.0-13.0. Los cultivos se centrifugan en condiciones de esterilidad a 4°C/3000rpm/20'. El sedimento celular obtenido se resuspende con medio rico BMMY (4 x 250 mL). Este medio contiene metanol al 0.5% para la inducción del promotor de la alcohol oxidasa. El medio de cultivo de inducción se deja agitando a 25°C y durante el tiempo óptimo de producción, que variará

dependiendo de la proteína que se esté produciendo. Cada 24 horas se recogen alícuotas suplementando el medio de inducción con metanol de manera que la concentración sea del 0.5%. Finalizadas las horas de cultivo se centrifugan a 4°C/7000rpm/30' y se separa el medio de cultivo del sedimento celular.

## 2.2.- Purificación de inmunotoxinas

Los pasos de purificación ahora detallados se llevan a cabo a 4°C para mejor conservación de la proteína. El medio extracelular se dializa frente a tampón fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 0.1 M, de forma exhaustiva. Mediante una columna de afinidad Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarosa (HisTrap™ FF crude, Amersham Bioscience) se purifica la inmunotoxina. El flujo de la columna debe ser lento para la correcta interacción de la proteína con la resina. Tras un lavado con el tampón conteniendo imidazol 20 mM, la proteína se eluye con imidazol 250 mM. Se reúnen las fracciones obtenidas de la elución, y para eliminar la alta concentración de imidazol y se dializa en bolsas de diálisis con tamaño de poro de 25 MW (SpectraPor). Cuando fue necesario se concentraron las muestras de pequeño volumen en tubos Amicon YM-30 MW (Millipore).

## 2.3.- Caracterización de proteínas por electroforesis

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS), para determinar la pureza de muestras proteicas y la masa molecular de las proteínas presentes (Shapiro *et al.*, 1967), utilizándose sistemas de electroforesis en placa de la marca Bio-Rad. Los geles se prepararon con un porcentaje de poliacrilamida:bisacrilamida (30:1) del 15%, en presencia de SDS al 0.1% (p/v). Las muestras fueron disueltas en tampón de aplicación (Ver: Apartado de Materiales y Métodos), conteniendo 2-mercaptoetanol al 5% (v/v), para reducir los puentes disulfuro de las muestras. Posteriormente se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 20 min. En el caso de muestras que no se querían reducir, no se añadió el agente reductor y se calentaron a 80°C durante 20 min, para desnaturalizarlas. Las electroforesis se desarrollaron con una corriente constante de 25 mA por gel hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel, tiñéndose los geles con azul de Coomassie y destiñéndose posteriormente en solución de desteñido (Ver: Apartado de Materiales y Métodos).

## 2.4.- Inmunodetección (Western Blot)

La inmunodetección se llevó a cabo mediante transferencia de las proteínas contenidas en un gel de PAGE-SDS a una membrana Inmobilon (Millipore). La transferencia se realizó con un instrumento de electrotransferencia LKB, durante 1 h a  $0.9 \text{ mA/cm}^2$  de gel, en tampón de transferencia (Ver: Apartado de Materiales y Métodos). Posteriormente, la membrana se saturó en PBS con leche en polvo desnatada al 3% (p/v) durante 2 h o al 0.1% (p/v), si la incubación fue de una noche. A continuación, se incubó con anticuerpos primarios, convenientemente diluidos en PBS-leche al 0.1% (p/v), durante 3 h. Tras un lavado breve con agua destilada, se dio un lavado con 25ml de PBS-Tween al 0.5% (v/v) durante 30 min y con agitación suave, se incubó la membrana con un anticuerpo específico que reconoce la fracción constante de las IgG de conejo (Bio-Rad), diluido 1/3000 en PBS-leche al 0.1% (p/v), durante 1 h a temperatura ambiente. Estos anticuerpos se encuentran combinados con peroxidasa de rábano, lo que permite visualizarlos al añadir el reactivo correspondiente, que se vuelve coloreado bajo la acción de la enzima. Tras la incubación con el segundo anticuerpo, se dio un lavado breve con agua destilada, lavándose a continuación con 25ml de PBS-Tween al 0.5% (v/v) durante 30 min y con agitación suave. El revelado se realizó por adición de la solución de revelado que contiene tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) 0.03% (p/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.016% (v/v) en 50ml de tampón PBS. Una vez aparecidas las bandas coloreadas, la reacción se paró por inmersión en agua destilada. También se procedió al revelado utilizando el kit comercial ECL (*enhanced chemiluminescence*) que permite una detección con menor cantidad de proteína, tomando imágenes de la membrana a distintos tiempos utilizando para tomar las fotografías un LAS-3000 (Fujifilm). Cuando fue necesario las imágenes fueron tratadas con el programa informático Multi-Gauge, que permite entre otras cosas el densitometrado de las bandas, para su cuantificación.

En el caso concreto del anticuerpo anti-Histag, que se encuentra combinado con peroxidasa (**Tabla 1**) se procedió al revelado después del lavado con PBS-Tween, tal cual se indica anteriormente.

## 2.5.- Análisis de aminoácidos

El análisis de la composición aminoácidos se ha llevado a cabo con un analizador automático Beckman Modelo 6300. Las muestras se hidrolizaron en HCl 5.7

N con fenol 0.1% (p/v) y Nor-leucina como estándar interno (Área = 162) (0.2 ml de volumen total) durante 24 horas a 110°C, en tubos Pyrex cerrados a vacío. Posteriormente las muestras se secaron y lavaron tres veces con 0.2 ml de agua destilada. Los hidrolizados secos se disolvieron en 100 µl de tampón Na-S (Beckman) y se aplicaron en el analizador. El número de aminoácidos se ha calculado a partir del área de los picos observados, tomando como referencia la Phe, puesto que es el aminoácido que mejor coincide con el porcentaje de aminoácidos teóricos. A partir de estos análisis se calculó también el coeficiente de extinción ( $E^{0.1\%}$ ).

## 2.6.- Cálculo del coeficiente de extinción

Una vez comprobado que los resultados de composición aminoacídica corresponden con los datos teóricos obtenidos a través del uso del programa ProtParam, se calculó la masa exacta de proteína que se ha usado en el análisis de aminoácidos.

Para ello, se calcula el rendimiento del ensayo mediante el uso del control estándar de Nor-leucina. A continuación teniendo en cuenta el rendimiento y un aminoácido concreto cuya composición se ajuste perfectamente a la teórica se puede calcular la masa exacta de proteína aplicada. Finalmente sabiendo la concentración, paso óptico y absorbancia del espectro inicial de proteína aplicada se ha calculado el coeficiente de extinción ( $E^{0.1\%}$ ).

## 2.7.- Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se han realizado en un dicrógrafo Jasco J-715. Las disoluciones de proteína se han analizado en cubetas de cuarzo de 0.05 a 0.1 cm de paso óptico en la región del UV lejano (250 – 195 nm). La concentración de proteína empleada para las medidas en la región UV lejano se ha mantenido comprendida en el intervalo 0.1-0.5 mg/ml. La concentración de proteína se ha determinado por medidas de absorbancia, o bien mediante el análisis de aminoácidos. Se han llevado a cabo cuatro acumulaciones por espectro.

## 2.8.- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los estudios de calorimetría diferencial de barrido se han efectuado con la ayuda de un calorímetro Microcal VP-DSC. Se ha utilizado este equipo para estudiar la

transición térmica de las inmunotoxinas y determinar sus parámetros termodinámicos por tratamiento posterior de los termogramas con el software Origin Microcal LLC DSC. El intervalo de temperaturas en el que se realizan los barridos es de 10°C a 85°C, con una velocidad de 30°C/hora. Se registran igualmente los barridos inversos para corroborar la reversibilidad del proceso. La disolución de proteína se ha preparado en tampón fosfato sódico 50 mM NaCl 0.1 M a pH 8.0, con el que se ha llevado a cabo el registro de la línea base. Todas las preparaciones utilizadas se han desgasificado a vacío con agitación durante 10 minutos antes de introducirlas en el calorímetro.

### **3.- Metodología referente a la caracterización de la interacción antígeno-anticuerpo**

#### **3.1.- Obtención de extractos celulares**

La recogida de células se realiza por raspado de los cultivos. Las células se lavan con PBS y se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular final se resuspende en el volumen adecuado de tampón de lisis (ver apartado materiales) y se deja incubando con agitación a 4°C durante 30 minutos. La suspensión celular se centrifuga nuevamente durante 15 minutos a 13000 g con el fin de eliminar el material celular no solubilizado. El sedimento se descarta y el sobrenadante se conserva a -20°C hasta su utilización.

#### **3.2.- ELISA utilizando extractos celulares**

Este ensayo está diseñado para el estudio de la unión al antígeno GPA33. Para ello, inicialmente se lleva a cabo una titulación del sustrato de unión en placa mediante el anticuerpo monoclonal mAbA33. Se han incubado 0.01 – 10 µg de extractos celulares de la línea celular SW1222 con distintas concentraciones de mAbA33 (0.001 – 1 µg/µl). A través de la titulación, se comprueba que la cantidad de extracto celular que se debe utilizar es 1 µg de extracto celular de la línea celular SW1222 por pocillo. El desarrollo del ELISA sigue de la siguiente manera: La incubación con extracto celular tiene una duración de 18 horas a 4°C. Se llevan a cabo tres lavados con PBS-Tween 0.5%. A continuación, se bloquea añadiendo PBS-leche molico 3% durante 1 hora a 37°C. Se desecha el sobrenadante y se añaden las cantidades de inmunotoxina (10 pM – 1 µM) o

mAbA33 (1 pM – 0.1  $\mu$ M). Se realizan 3 lavados con tampón de lavado (PBS-Tween 0.5%) y se añaden los anticuerpos secundarios. En el caso de la incubación con inmunotoxina, se añade anticuerpo anti- $\alpha$ -sarcina con una dilución 1/3000, mientras que en el caso del mAb GPA33 se añade anticuerpo-anti Fc de ratón (GAM), ya que el origen del mAbA33 utilizado es murino. Los anticuerpos secundarios se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras los 3 lavados con tampón de lavado respectivos se sigue con el desarrollo del ELISA, en el caso de la inmunotoxina se realiza una tercera incubación con el anticuerpo (GAR) dirigido frente a la región constante del anti- $\alpha$ -sarcina mientras que en el caso de la incubación con mAbA33 se deja incubando con el tampón de muestra. Se dejan incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados durante estas últimas incubaciones están conjugados con la enzima peroxidasa. Tras lavar por triplicado, se revelan los sedimentos mediante el tampón de revelado. Una vez parado el revelado utilizando  $H_2SO_4$  3 N, se toma la medida de  $DO_{492nm}$  en un lector de ELISA Expert 96 (ASYS Hitech) y la medida a 620 nm para restar el fondo producido por los extractos.

### 3.3.- ELISA utilizando células completas

Para el ensayo se siembra en la placa las células de interés. La placa se deja incubando hasta que las células alcancen la confluencia. Se retira el medio de los pocillos y se lava tres veces con tampón de lavado. Se retira el PBS y se fijan las células con tampón de fijación (PBS-PFA 3%), incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Se retira el medio de fijación y se rehidratan las células incubando con PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A partir de este punto el ensayo se lleva a cabo igual que el ELISA con extractos celulares explicado anteriormente, desde la saturación de la placa. Finalmente para la obtención de los datos hay que registrar los valores de absorbancia a 495 nm y a 620 nm, para restar la contribución producida por la dispersión.

### 3.4.- Citometría de Flujo

La suspensión celular se obtiene por tripsinización, se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos y se resuspende en medio de cultivo completo a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml. Se añade en cada tubo de citometría el volumen correspondiente para tener  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  células/tubo. Los tubos se centrifugan a 1500

rpm/10' y se lavan las células con tampón de citometría (PBS-BSA 1%). Tras los lavados se centrifuga nuevamente para resuspender el sedimento celular en tampón con la proteína a ensayar (inmunotoxina o mAbA33) a la concentración deseada y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 30'-1 h. Pasado el tiempo de incubación se hacen tres lavados con tampón y el sedimento celular se resuspende en tampón con los anticuerpos primarios necesarios (anti- $\alpha$ -Sarcina y DAM-FITC) dejándolos 1h a temperatura ambiente. Se repite el mismo proceso de lavado e incubación con los anticuerpos secundarios (GAR-FITC). Finalmente se hacen 3 lavados con tampón y se resuspende el pellet celular en 300  $\mu$ l de tampón, guardándose las muestras a 4°C, bien cubiertas con papel de aluminio o en oscuridad para evitar dañar el FITC, hasta ser llevadas al citómetro.

### **3.5.- Marcaje de inmunotoxinas**

#### **3.5.1.- Con isotiocianato de fluoresceína (FITC)**

Se marcaron las inmunotoxinas con fluoróforos para facilitar su seguimiento y su uso en ensayos de citometría de flujo así como de microscopía de fluorescencia. Antes de marcar las inmunotoxinas se verificó la ausencia de grupos amino primarios en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables, para prevenir modificaciones que pudieran conllevar la pérdida de reconocimiento y unión de los mismos al antígeno GPA33 (King *et al.*, 1995). El marcaje se llevó a cabo según lo descrito previamente (Turnay *et al.*, 1993). La inmunotoxina a 2 mg/ml se dializa frente a tampón fosfato 50 mM pH 8.0 NaCl 0.1 M, pues el pH básico es fundamental para la reacción. Entonces se añade isotiocianato de fluoresceína (FITC; isómero I, Sigma) con un ratio FITC/proteína de 0.05. La reacción se mantiene durante 24 h en oscuridad a 4°C en agitación suave. El FITC que no ha reaccionado se elimina usando una columna PD-10 (GE Healthcare) equilibrada en PBS. El grado de marcaje se determina midiendo la absorbancia a 280 y 495 nm de la proteína conjugada

#### **3.5.2.- Con Alexa 555**

Se ha utilizado el kit "Alexa Fluor 555 Protein Labeling Kit" (Invitrogen). El marcaje se lleva a cabo incubando 100  $\mu$ g de inmunotoxina con 44.6 nmol de

Alexa 555 durante 15 minutos a temperatura ambiente, en tampón bicarbonato 0.1 M, pH 8.3. La proteína conjugada se purifica usando la resina contenida en el kit. Finalmente, el grado de marcaje se mide de acuerdo a las indicaciones del kit.

### 3.6.- Inmunofluorescencia

El ensayo de inmunofluorescencia se realizó con la finalidad de comprobar no sólo la unión de la inmunotoxina a las células SW1222, lo cual se puede comprobar mediante citometría de flujo, sino para comprobar también la internación de la misma. Para llevar a cabo la inmunofluorescencia se sembraron 80.000-100.000 células en un cubreobjetos en una placa. Las células se dejan crecer toda la noche a 37°C. Una vez que las células se encuentran entre 50-70% de confluencia se retira el medio y se añade la proteína en la concentración deseada, diluida en DMEM. Para estudios de unión se incubaba la proteína a RT/30min. Para estudios de internación, tras los 30 min se retira el medio y se añade medio fresco y se incuban las células a 37°C. Una vez incubada la proteína se retira el medio y se lava tres veces con PBS. A continuación se fijan las células con p-formaldehído (PFA) 3% en PBS dejándolo 15' a temperatura ambiente. Se dan otros tres lavados y se *quenchea* el PFA con cloruro de amonio 50mM en PBS, dejándolo otros 15' a temperatura ambiente. Tras 3 lavados se permeabilizan las células con digitonina 0.01% en PBS, incubando 30 min. a temperatura ambiente. Se lava 3 veces y se tapiza con PBS-BSA 1%, que ha de estar al menos una hora a temperatura ambiente. Se sigue con tres lavados con PBS-BSA 1% y se incubaba el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 1% durante el tiempo deseado. Se dan tres lavados con PBS-BSA 1% y se incubaba el anticuerpo secundario durante el tiempo deseado diluido en PBS-BSA 1%. Finalmente se lava 3 ó 4 veces y se fijan los cubres a un porta con ProlongGold (Invitrogen) que contiene DAPI para la tinción de núcleos, y se pegan por los bordes con esmalte de uñas. Las muestras ya preparadas se guardan a 4°C, hasta su utilización en microscopía.

## 4.- Técnicas de caracterización de la actividad ribonucleolítica

### 4.1.- Zimograma

La detección *in situ* de la actividad de enzimas, previamente separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha utilizado desde hace varias décadas

para proteínas muy distintas. Este tipo de ensayos se conocen como “zimogramas”. Este método presenta varias ventajas, pues un solo ensayo puede servir para analizar, además de la cantidad de enzima presente, su homogeneidad o su posible contaminación por actividades similares, aunque estén presentes en muy pequeña proporción. Además, se puede usar tanto para extractos biológicos crudos como para las enzimas purificadas.

Ahora bien, cuando la electroforesis se lleva a cabo en presencia de SDS, en condiciones desnaturalizantes, hay una dificultad añadida para poder realizar este tipo de detección, que es la necesidad de renaturalizar la enzima, lo que no siempre es posible. Sin embargo, en el caso de las ribonucleasas, especialmente las secretadas y consideradas como “digestivas” (p. ej. las de la superfamilia de la RNasa A en mamíferos o las de la T1 y T2 en microorganismos), como suelen ser enzimas muy estables y fácilmente renaturalizables (al menos, si no se reducen sus puentes disulfuro), se han podido desarrollar con cierta facilidad este tipo de ensayos. El método utilizado, consiste en embeber homopolinucleótidos directamente en el gel de poliacrilamida, ya que, dado su gran tamaño, no migra a través del gel durante la electroforesis. La electroforesis se lleva a cabo utilizando muestras no reducidas, para que la desnaturalización inducida por el SDS, sea reversible. En general se aplicaron 0,5-1 $\mu$ g de proteína, aunque el umbral de detección se encuentra en 0,1 $\mu$ g. Posteriormente hay que eliminar el SDS para renaturalizar las proteínas, mediante una serie de lavados con isopropanol, y una vez conseguido esto, llevar cabo la reacción ribonucleolítica propiamente dicha, mediante incubación en un tampón y temperatura adecuados. El RNA no degradado se detecta por tinción con un colorante de ácidos nucleicos, como el azul de toluidina. Sin embargo, allí donde se produce degradación del RNA, no actúa el colorante, impidiendo que esta zona del gel se tiña de color azul. Este método fue descrito en detalle por Blank *et al.*, que utilizaron el isopropanol en disolución acuosa tamponada para eliminar eficazmente el SDS (Blank *et al.*, 1982). Estos autores también utilizaron distintos RNA para detectar RNasas de distinta especificidad (Blank & Dekker, 1975).

Los geles se prepararon como habitualmente para PAGE-SDS, pero añadiendo el homopolinucleótido correspondiente a 0.3 mg/ml en el gel separador. Las muestras se prepararon en el tampón de aplicación de electroforesis habitual, pero sin agente reductor, y se calentaron a 80°C durante 20 min. La aplicación y desarrollo de la electroforesis fueron los usuales. Para la detección de las actividades ribonucleolíticas, el gel se sometió a las siguientes incubaciones, utilizando unos 100 ml de cada solución:

1. 2 x 15min en Tris-HCl 10mM pH 7.5, temperatura ambiente.
2. 2 x 15min en Tris-HCl 10mM pH 7.5, isopropanol 25%, temperatura ambiente.
3. 2 x 15min en Tris-HCl 10mM pH 7.5, temperatura ambiente.
4. 1h 30min en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, temperatura ambiente.
5. 10min en Tris-HCl 10mM pH 7.5, temperatura ambiente
6. 15min en azul de toluidina 0.2% en Tris-HCl 10mM pH 7.5, temperatura ambiente.
7. Lavados con agua para desteñir, hasta conseguir el grado de contraste adecuado.

La cuantificación de las bandas del gel, convenientemente desteñido, se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior, con la única diferencia de que se utilizó luz blanca para su irradiación.

#### 4.2.- Ensayo frente a ribosomas

La actividad ribonucleolítica de la  $\alpha$ -sarcina se determina por la liberación del fragmento  $\alpha$ , característica de la actividad ribonucleolítica específica de las ribotoxinas sobre sus sustratos, tras incubación de la  $\alpha$ -sarcina y la inmunotoxina con un lisado de reticulocitos de conejo libre de células (Promega), (Lamy *et al.*, 1992). Este lisado (50  $\mu$ l) se trata con 20-100 ng de la proteína a ensayar en tampón A (ver Apartado de Materiales y Métodos), durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se para por adición de 0.25 mL de tampón B (Ver Materiales), incubándose la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. La extracción del RNA se realiza en fenol saturado en agua y posteriormente se precipita con alcohol isopropílico.

El análisis del RNA se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.4% (p/v) en tampón MOPS 1x y formaldehído al 16% (v/v), visualizándolo mediante tinción con bromuro de etidio e irradiación del gel con luz UV. La cuantificación de las correspondientes bandas, se realiza mediante la integración del volumen de las mismas, empleando un sistema de fotodocumentación UVI-Tec, con el software UVI-soft UVIband Windows Aplicación V97.04.

### 4.3.- Ensayo frente a RNA de levadura

Este ensayo se utilizó para medir la actividad ribonucleasa frente a RNA de *Torula* (Sigma, tipo VI). Se incubó ribonucleasa a distintas concentraciones durante 15 minutos a 37°C en una mezcla de reacción que contiene BSA (0.1%, p/v) y RNA (2 mg/ml) en Tris-Acetato (50 mM), KCl (0.1 M) y EDTA (5 mM), pH 7.5. La reacción se para añadiendo ácido perclórico (10%, v/v)-acetato de uranilo (0.25% w/v) frío. La mezcla se incubó a 4°C durante 30 min y se centrifugó a 14000g/15'/4°C. Se mide la absorbancia del sobrenadante, diluido 1/10, a 260 nm. Los valores obtenidos son proporcionales a la concentración de oligonucleótidos solubles, debidos a la acción de la ribonucleasa. Además, se llevan en paralelo tubos control sin presencia de ribonucleasa para tener en cuenta la degradación no enzimática del RNA.

## 5.- Técnicas de caracterización de la actividad citotóxica

### 5.1.- *In vitro*

#### 5.1.1.- Ensayo de Leucina Tritiada

Las ribotoxinas ejercen su actividad citotóxica inactivando los ribosomas, conllevando la inhibición de la biosíntesis de proteínas y la muerte celular (Lacadena *et al.*, 2007). Por ello, la medida de la biosíntesis de proteínas es el ensayo utilizado rutinariamente para evaluar la actividad tóxica de esta familia de proteínas (Martínez-Ruiz *et al.*, 2001; Olmo *et al.*, 2001). Por ello, para evaluar el efecto de las inmunotoxinas con ribotoxinas como dominio tóxico, se sembraron células en placas de 96 pocillos a razón de  $5 \times 10^3$  células por pocillo y se cultivaron en la placa durante 24 o 36 horas, dependiendo del ritmo de crecimiento de las células empleadas. Se retira el medio de cada pocillo y se añade medio fresco conteniendo diferentes concentraciones de la inmunotoxina a estudiar. Tras incubar la placa en la estufa durante 72 horas, se añade a cada pocillo 1  $\mu\text{Ci}$  de L-[4,5- $^3\text{H}$ ]-Leucina ( $166 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$ , Amersham, UK). Tras incubar la leucina durante 6 horas, se retira el medio y se fijan las células con TCA (5%, p/v). A continuación se lavan los pocillos con EtOH (-20°C) tres veces. El sedimento resultante se seca incubándolo a 37°C durante 30 minutos y se redisuelve en 0.2 ml de NaOH (0.1 M)-SDS (0.1%, p/v) mezclándolo con 10 ml de líquido de centelleo. La radioactividad de cada muestra se cuenta en un contador de centelleo líquido

Beckman LS3801. El resultado se expresa como porcentaje de la radioactividad incorporada en las muestras control incubadas sin proteína, para calcular el valor  $IC_{50}$  en el ensayo de toxicidad.

### **5.1.2.- Ensayo de MTT**

Utilizamos el kit “Vibrant MTT cell proliferation assay kit” (Invitrogen). El ensayo implica la conversión del MTT, soluble, en formazan, insoluble, que forma cristales. Esta conversión se lleva a cabo mediante la acción de una enzima reductasa mitocondrial. De este modo se correlaciona la absorbancia medida debido a la concentración de cristales de formazan, con el número de células viables en el cultivo.

Para realizar el ensayo las células se tripsinizan, cuentan y siembran en una placa de 96 pocillos. Tras incubarlas 24 h en la estufa, se retira el medio y se añade medio nuevo con inmunotoxina a diferentes concentraciones. La placa se incuba durante el tiempo deseado en la estufa. A continuación el medio se retira y se añade el agente MTT. Las placas se incuban 2-4 h a 37°C. Finalmente, se retira el medio y se redisuelven los cristales de formazan con el tampón del kit. Se registra el valor de absorbancia a 550 nm de los pocillos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor de absorbancia obtenida frente a los pocillos control, incubados en ausencia de proteína.

### **5.1.3.- Ensayo de ATP**

Este ensayo se llevo a cabo para determinar la actividad citotóxica de la immunoRNasa T1. Al presentar la RNasa T1 actividad inespecífica, necesitábamos un ensayo de medida indirecta de su actividad, para poder determinar su acción en el interior celular.

En el ensayo se mide la concentración de ATP intracelular utilizando el kit “CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay” (Promega). Este método usa la luciferasa para medir el ATP como indicador de células metabólicamente activas, células viables. Para realizar el ensayo se tripsinizan, cuentan y siembran células en una placa de 96 pocillos. Tras incubar las células 24 h se retira el medio y se

añade medio nuevo con inmunotoxina a diferentes concentraciones. Teniendo en cuenta la cinética de entrada de los dominios variables descrita anteriormente (Kirui *et al.*, 2010) se añade inmunotoxina diez veces concentrada cada 24 horas. Finalmente el medio se retira y se añade el agente CellTiter-Glo. Las placas se incuban 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la luminiscencia. Los resultados se expresan como porcentaje frente a la luminiscencia obtenida frente a los pocillos control, incubados en ausencia de proteína.

#### **5.1.4.- Ensayo de Anexina-FITC/ IP**

Este ensayo se utiliza para la detección de células en apoptosis y/o necrosis en un cultivo. El ensayo se basa en la medida de la interacción de dos moléculas con las células. Por un lado la Anexina V, que se encuentra marcada con FITC, y que se une a los fosfolípidos ácidos (como la fosfatidilserina) que las células en apoptosis muestran en la cara exterior de la membrana plasmática. De otro lado el IP, ioduro de propidio, que puede penetrar la membrana de aquellas células que se encuentren en un estado de apoptosis tardía/necrosis. De este modo el marcaje positivo o no, con dos, una o ninguna de estas moléculas, es un indicativo del estado celular.

Se utiliza el kit “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” de Abcam. Para realizar el ensayo, se siembran células en una placa de 24 pocillos, y se dejan incubando durante 24 h. Pasado ese tiempo se retira el medio y se añade medio fresco con inmunotoxina a la concentración deseada. Además se realizan pocillos control: positivo, células incubadas sólo con medio; y negativo, células incubadas con un 20% de DMSO. Después de la incubación de la inmunotoxina, se levantan las células y se lavan tres veces con PBS. Las células se cuentan y se preparan alícuotas de  $1 \times 10^5$  células/muestra. Las muestras se centrifugan y se resuspenden en tampón de unión. Se añade Anexina V-FITC y las muestras se incuban 15 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente los tubos se lavan tres veces con tampón de unión y finalmente los sedimentos se resuspenden en tampón de unión (300  $\mu$ l) y se añade el IP. Se prepara además un tubo con células incubadas sin Anexina y sin IP, uno con células incubadas solo con Anexina V-FITC, y otro incubado solo con IP. Con estos tres tubos, más los controles antes mencionados, se determinan los parámetros del citómetro antes de pasar las muestras incubadas con inmunotoxina.

## 5.2 *In vivo*

Células SW1222 en confluencia fueron tripsinizadas y lavadas en PBS tres veces, tras centrifugación. El sedimento se resuspendió en PBS y las células fueron contadas utilizando un hemocitometro. Se prepararon alícuotas de  $1 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS. Esta alícuotas se mezclaron suavemente con 100  $\mu$ l de Matrigel, y mantenidas en frío para su mejor conservación. Las células fueron así inoculadas bajo la piel en el flanco derecho de cada ratón. A los 7 días, tras la inoculación, se comienza a medir el tumor con un calibre. Para calcular el volumen del tumor se utiliza la formula (ancho<sup>2</sup> x largo) x 0.52. Una vez que los tumores alcanzaban un tamaño entre 50 y 100 mm<sup>3</sup> se comenzó el tratamiento. Para ello se inyectaban 100  $\mu$ l de PBS o IMTXA33 $\alpha$ S (a 0.5 mg/ml o 1 mg/ml) por vía intraperitoneal. El tratamiento fue continuado, cada dos días, durante dos semanas, tras las cuales todos los animales fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos y pesados. Los tumores fueron divididos en 4 muestras para su posterior procesamiento. Dos de ellas se congelaron a -80°C para el estudio de la expresión de proteína y RNA en el tumor, otra fue mantenida en formol para estudios histológicos, y la última muestra se congeló en TissueTek para futuros ensayos de inmunofluorescencia.

**RESULTADOS**



## Antecedentes

Al inicio de la presente tesis doctoral el Dr. Nelson Carreras Sangrà se encontraba finalizando sus estudios de doctorado que presentó en su Tesis Doctoral, (Carreras-Sangrà, 2010). En ella, se detallan los primeros pasos y resultados preliminares obtenidos en la producción de la inmunotoxina A33  $\alpha$ -sarcina, una de las inmunotoxinas objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Estos estudios mostraron la capacidad citotóxica específica de la inmunotoxina frente a células de carcinoma de colon que expresaban el antígeno GPA33 en su membrana.

Este es el punto de partida de la presente Tesis, y que ha implicado la puesta a punto de una gran cantidad de ensayos y metodologías diferentes, dirigidas a una caracterización funcional exhaustiva de las distintas inmunotoxinas diseñadas y posteriormente purificadas. Finalmente, y como se presentará en el último bloque de resultados se ha comenzado el estudio de la citotoxicidad *in vivo* de una de ellas.



## BLOQUE 1

### PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INMUNOTOXINAS E INMUNORRIBONUCLEASAS.

En este primer bloque se presentan los ensayos realizados en relación con el diseño, producción, purificación y posterior caracterización estructural y funcional de las diferentes proteínas recombinantes.

Este esquema se ha seguido con cada una de las construcciones estudiadas, y se ha estructurado en cuatro apartados, que corresponden con cada una de las cuatro construcciones estudiadas:

1. scFvA33: Construcción que consta exclusivamente de los dominios variables del mAbA33, unidos mediante un péptido flexible, y que se ha utilizado como control de la funcionalidad de dichos dominios incluidos en las construcciones quiméricas.
2. IMTXA33 $\alpha$ S: Inmunotoxina recombinante de cadena única formada por la unión de los dominios variables de mAbA33 y la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina.
3. scFvA33T1: Inmunorribonucleasa recombinante de cadena única, obtenida en este caso por la unión a la RNasa T1.
4. IMTXA33HtA $\Delta$ 3W: Inmunotoxina recombinante de cadena única obtenida por la unión a una variante de la ribotoxina hirsutelina A (HtA) que presenta tres sustituciones por Phe en los Trp 65, 71 y 78.

## **1.1.- Los dominios variables scFvA33**

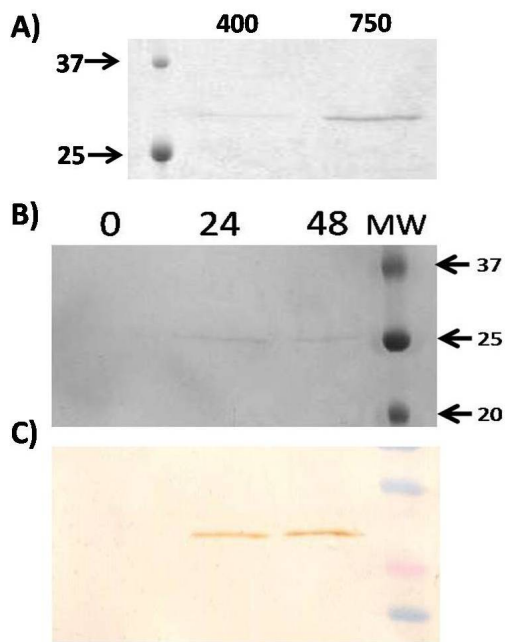
### **1.1.1.- Obtención del plásmido pPICZ $\alpha$ scFvA33**

Como ya se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos, las diferentes construcciones se expresan de forma recombinante, utilizando la levadura metilotrófica *P. pastoris*, como sistema de expresión. En todos los casos se utilizó como vector de expresión el plásmido pPICZ $\alpha$ A que permite la secreción al medio extracelular, al expresar las construcciones de interés fusionadas al péptido señal del factor  $\alpha$ , por su extremo N-terminal. Por otro lado todas las construcciones presentan en su extremo carboxilo terminal una extensión de seis histidinas.

Para la obtención del plásmido pPICZ $\alpha$ A con el cDNA de los scFvA33 se utilizó como molde un plásmido obtenido anteriormente en el laboratorio, en el que se tenía clonado dicho cDNA. Para ello, se realizó una PCR con los oligos 200 y 241 (ver Materiales y Métodos) que amplificaban el cDNA de los scFvA33 creando dos sitios de restricción *Eco* RI y *Sal* I en los extremos 5' y 3' respectivamente. Una vez purificado el cDNA amplificado, se llevó a cabo la correspondiente digestión enzimática del fragmento de PCR obtenido, y del plásmido pPICZ $\alpha$ A. Los dos fragmentos se purificaron tras la ligación, según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Se transformaron células *E. Coli* DH5 $\alpha$ F'. Las colonias obtenidas en presencia de zeocina, se analizaron en relación al plásmido que portaban. A partir de una de las colonias cuyo plásmido presentaba la secuencia se obtuvo la forma lineal del plásmido, mediante digestión con *Pme* I y se electroporaron células *P. pastoris* KM71 según lo descrito en Materiales y Métodos.

### **1.1.2.- Producción y purificación de scFvA33**

La producción de los dominios variables se llevó a cabo utilizando la levadura *P. pastoris* siguiendo unas condiciones de producción similares a las ya descritas por el grupo del Dr. Carl Batt (Pla et al., 2006). Estos autores encuentran diferencias de producción considerables según el pH y concentración de metanol utilizados. Sin embargo, las condiciones puestas a punto por estos autores están optimizadas para la producción de proteína mediante el uso de fermentadores, en las que las condiciones del cultivo en cuanto a oxigenación, pH, agitación, metanol, etc. están constantemente



**Figura 1:** Análisis electroforético en PAGE-SDS (A) de alícuotas recogidas tras 48 de inducción para un cultivo de seleccionado con Zeocina 400 µg/ml y otro seleccionado con Zeocina 750 µg/ml. (B) de alícuotas recogidas cada 24 horas durante la fase de producción de scFvA33. Se muestran a la derecha los valores de masa molecular de los marcadores. C) Western blot de las mismas alícuotas. La inmunodetección está realizada con un anticuerpo anti-Histag y revelado mediante DAB.

controladas. En nuestro caso, la producción se ha llevado a cabo en erlenmeyers, lo que no ha permitido extrapolar completamente estas condiciones. Este hecho ha implicado un menor rendimiento en la producción de los scFvA33 (Damasceno *et al.*, 2009).

De las colonias obtenidas tras la electroporación se seleccionaron cuatro, dos crecidas con Zeocina 400 µg/ml y dos en Zeocina 750 µg/ml, para hacer una expresión piloto (ver Materiales y Métodos). Esta expresión se llevó a cabo según las condiciones ya descritas para la obtención de scFvA33 en *P. pastoris*, a saber, pH 6.0, temperatura de inducción de la producción de 25°C y una inducción con MeOH al 0.5%. El cultivo se tuvo en fase de producción hasta las 96 horas recogiendo una alícuota cada 24 horas,

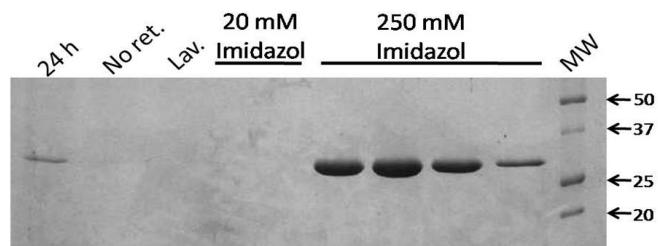
para realizar un análisis electroforético en PAGE-SDS de la expresión de proteína (Figura 1). Como se puede comprobar, las colonias que habían crecido en Zeo 750 µg/ml producen una mayor cantidad de proteína con una producción máxima mantenida a partir de las 48 h, y son las que se utilizaron para la purificación de scFvA33.

A partir de estos datos el escalado para la producción de scFvA33 se hizo siguiendo estas condiciones, con un tiempo de inducción de 48 horas. En la Figura 1B se observa la existencia de una banda de aproximadamente 25 KDa, correspondiente a los scFv en el medio extracelular del cultivo, que además es reconocido por un anticuerpo anti-Histag (Figura 1C) lo que indicaría la síntesis completa de la proteína recombinante, teniendo en cuenta que esta extensión de histidinas se encuentra en el extremo C-terminal.

La purificación de los dominios variables se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA agarosa. Se observó la presencia de los scFvA33 en las fracciones obtenidas de la elución con 250 mM Imidazol (Figura 2).

Estas fracciones se juntaron y se dializaron frente a tampón fosfato para eliminar el imidazol y llevar a cabo posteriormente su caracterización.

Los scFvA33 se purificaron a homogeneidad, de acuerdo con los criterios habituales de movilidad electroforética, composición de aminoácidos e inmunodetección, con un rendimiento de 3-5 mg/L de cultivo.

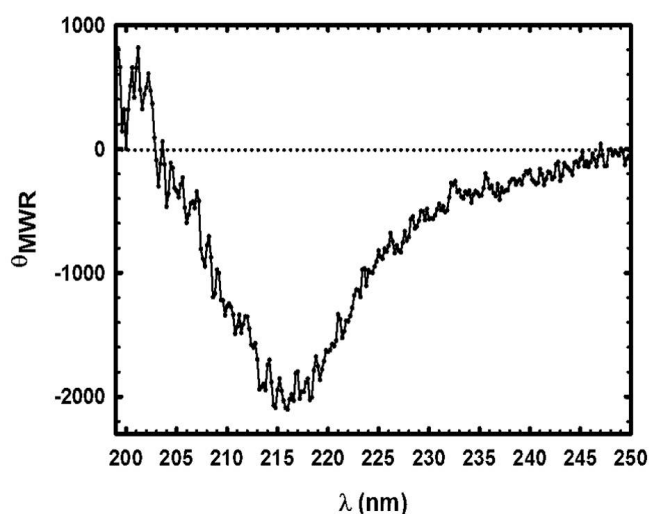


**Figura 2:** Análisis electroforético de diferentes etapas de la purificación de scFvA33. 24 h: medio de cultivo tras 24 h de inducción; No Ret: medio de cultivo dializado después de pasar por la columna Ni-NTA; Lav: lavado de la columna con tampón de lavado (ver Mat. y Met.); Imidazol 20 mM: lavado de la columna con tampón conteniendo imidazol 20 mM.; Imidazol 250 mM: diferentes fracciones obtenidas por elución de la columna con tampón conteniendo imidazol 250 mM.

### 1.1.3.- Caracterización estructural.

Está perfectamente establecido que la función de una proteína esta intrínsecamente relacionada por la estructura tridimensional que presenta, denominada conformación nativa, y que viene determinada por su secuencia de aminoácidos. En este sentido, obtener información acerca de la estructura que presenta y de la estabilidad de la misma parece necesario. Por ello, en primer lugar, y a partir del análisis de aminoácidos y del espectro de absorción de los scFvA33, se calculó el valor del coeficiente de extinción al 0.1% ( $E^{0.1\%}$ ) resultando éste  $1.45 \text{ (cm} \cdot \text{mg/ml)}^{-1}$ .

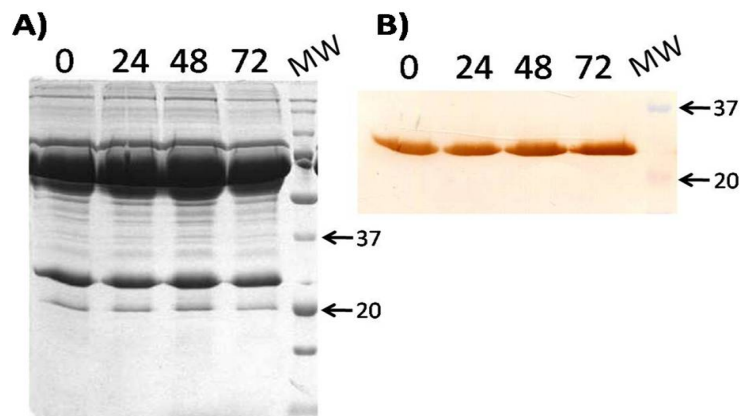
Para obtener información acerca de la estructura secundaria de los scFvA33 se registró su espectro de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano. El resultado, que se muestra en la **Figura 3**, sugiere un plegamiento con una elevada contribución de lámina  $\beta$ , lo cual es concordante con lo esperado para un proteína con plegamiento tipo inmuoglobulina (Carmichael *et al.*, 2003; Wilkinson *et al.*, 2009).



**Figura 3:** Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano correspondiente a los dominios variables scFvA33.

Con vistas a los posteriores ensayos de viabilidad celular que implican tiempos largos de incubación a 37°C, nos planteamos estudiar la estabilidad o posible degradación de los scFvA33 en esas condiciones y con el medio de cultivo en el que se crecen las células. Por ello se prepararon alícuotas de scFvA33 incubadas en DMEM (complementado con suero al 10%), y se incubaron a distintos tiempos a 37°C. El análisis electroforético e inmunodetección mostró que los scFvA33 no se degradaban (**Figura 4**) manteniendo su integridad.

Una vez que se comprobó que los dominios variables parecían estar correctamente plegados y que permanecían estables en las condiciones de ensayo, se llevó a cabo su caracterización funcional.



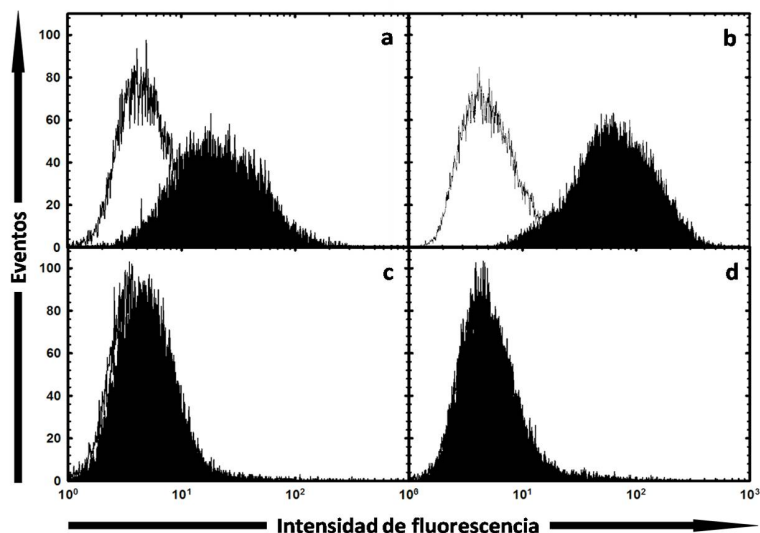
**Figura 4:** Análisis electroforético en PAGE-SDS (A) e inmunodetección (B) de alícuotas de scFvA33 incubadas a 37°C durante diferentes tiempos. La inmunodetección se realizó con un anticuerpo anti-Histag y se reveló mediante DAB. Se indican los valores de masa molecular en kDa de las proteínas patrón).

#### 1.1.4.- Caracterización Funcional

##### 1.1.4.1.- Caracterización de la interacción de los dominios variables

Los scFvA33 serán los encargados de dirigir la actividad de las inmunotoxinas reconociendo e interaccionando específicamente con el marcador tumoral. Por ello, la caracterización funcional implica comprobar que los scFvA33 son capaces de reconocer y unirse al GPA33 específicamente. Si bien esto ya ha sido demostrado por otros grupos que trabajan con los mismos dominios variables (Damasceno *et al.*, 2004), nos pareció necesario y prudente caracterizarlos.

Para ello se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo con diferentes líneas celulares, tanto antígeno positivas como antígeno negativas. El resultado de la citometría, mostrado en la **Figura 5**, corroboró como los scFvA33 purificados presentaban la capacidad de reconocer y unirse específicamente a células que

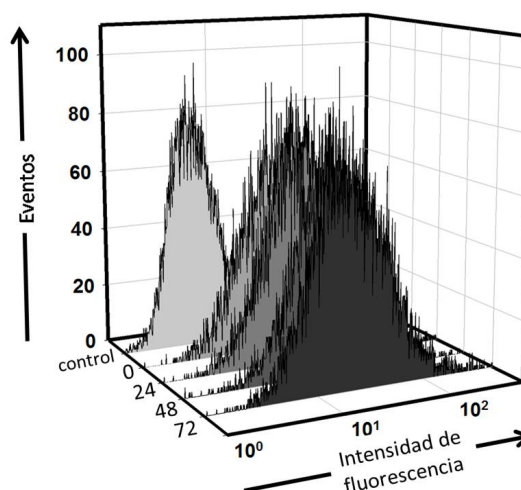


**Figura 5:** Ensayo de unión de los scFvA33 por citometría de flujo. Los paneles superiores muestran dos líneas celulares antígeno-positivas SW1222 (a) y AsPC (b), incubadas con scFvA33, y los paneles inferiores células antígeno-negativas MCF7 (c) y HT29 (d), incubadas con scFvA33.

expresaban GPA33 en su membrana. Se utilizaron dos líneas celulares antígeno positivas, las SW1222 que corresponden con carcinoma de colon primario, y las AspC1 de origen pancreático derivadas de una metástasis de carcinoma de colon.

En ambos casos, se observó un desplazamiento por aumento en la intensidad de fluorescencia, indicando la unión de los scFvA33 a dichas células. Sin embargo, cuando se analizó el comportamiento de los scFvA33 frente a dos líneas celulares antígeno-negativas, como las MCF7 y las HT29 no se observó ningún tipo de interacción, a pesar de que por ejemplo el origen de éstas últimas también es de colon. Cabe destacar la importancia de estos resultados ya que dan idea de la exquisita especificidad por marcador GPA33.

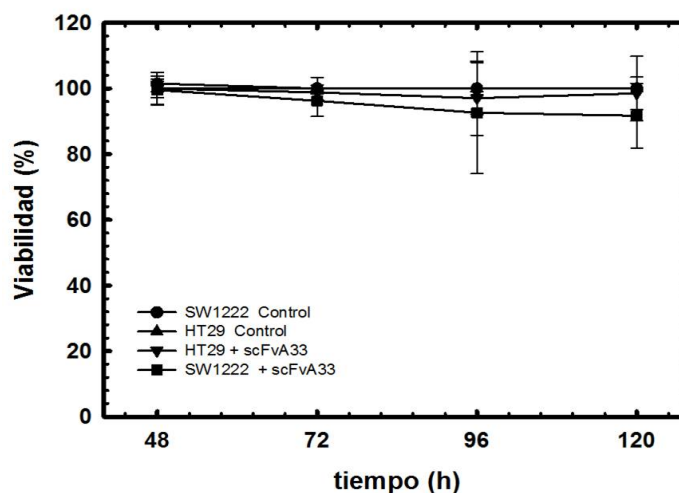
Además, y para estudiar la estabilidad de los scFvA33, en este caso desde un punto de vista funcional, se incubaron distintas alícuotas de scFvA33 en DMEM complementado con suero al 10% a 37°C a diferentes tiempos. Nuevamente se estudió la unión a GPA33 mediante citometría de flujo (**Figura 6**) comprobándose que los dominios variables conservaban la misma capacidad de unión a GPA33.



**Figura 6:** Ensayo de unión de scFvA33 mediante citometría de flujo con células SW1222. Se muestra el control incubado sin proteína, y aquellos con scFvA33, indicando el número de horas incubadas previamente a 37°C.

#### 1.1.4.2.- Ensayos de actividad citotóxica específica

Los dominios variables al formar parte de la inmunotoxina dirigen la acción de la toxina sobre las células diana. Aunque no es de esperar una actividad citotóxica de los mismos *per se*, ya que carecen de las regiones constantes efectoras que podrían desencadenar una respuesta, como sí sucede con la molécula completa del anticuerpo, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad con ellos sobre células antígeno positivas y antígeno negativas, como control. Este ensayo se realizó incubando los dominios variables a distintas concentraciones y diferentes tiempos. El ensayo realizado se basó en la medida de ATP intracelular (ver apartado de Materiales y Métodos) correlacionándose la medida de ATP intracelular con la viabilidad celular. El resultado (Figura 7) mostró que los dominios no eran tóxicos en ninguna de las dos líneas celulares empleadas, SW1222 y HT29, independientemente de que estas fueran antígeno-positivas o negativas.



**Figura 7:** Ensayo de viabilidad con células antígeno-positivas SW1222 y antígeno-negativas HT29, incubadas a diferentes tiempos con scFvA33 (1 $\mu$ M). Se muestra también el porcentaje de viabilidad de las muestras control, incubadas sin proteína.

A la vista de estos resultados se comprobó que los scFvA33 presentaban las características funcionales adecuadas para ser utilizados como dominio marcador de nuestras inmunotoxinas.

#### 1.2.- Inmunotoxina scFvA33 $\alpha$ -sarcina (IMTXA33 $\alpha$ S)

La primera inmunotoxina objeto de estudio en esta Tesis Doctoral fue la basada en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, en cuyos resultados preliminares, aparecidos en la Tesis Doctoral del Dr. Nelson Carreras (Carreras-Sangrà, 2010), participé activamente. Por

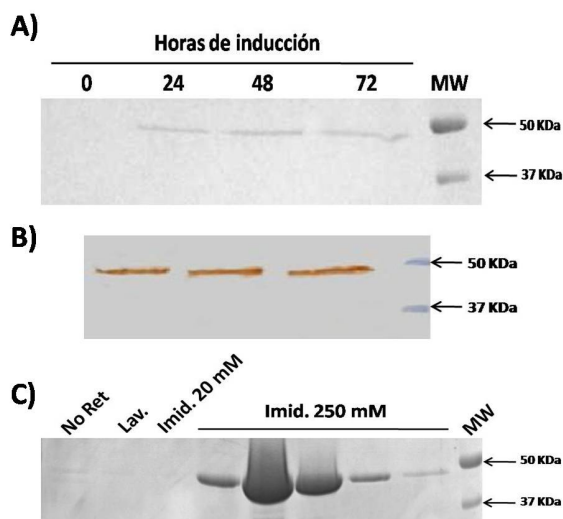
este motivo, no se presentan los experimentos y resultados obtenidos en relación con el diseño y construcción del vector de expresión.

### 1.2.1.- Producción y purificación de la inmunotoxina.

Las condiciones de producción de inmunotoxina se basaron en los resultados obtenidos anteriormente para esta inmunotoxina, así como los de los scFvA33.

En nuestro caso la producción de la inmunotoxina se llevo a cabo según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Inicialmente se hizo una expresión piloto, a baja escala, con un tiempo de inducción de 72 h, para determinar el tiempo optimo de inducción. Se comprobó que el máximo de producción de inmunotoxina se encuentra a partir de las 48 h de inducción, no observándose bandas de degradación de inmunotoxina. Con estos datos, se llevó a cabo un escalado en la producción de inmunotoxina, tal cual está referido en el apartado de Materiales y Métodos. En la **Figura 8** se muestra el análisis electroforético de las alícuotas obtenidas durante la producción de inmunotoxina, en la que se observó una banda de 50 KDa, que corresponde con la masa molecular de la inmunotoxina, no observándose esta banda en el medio antes de la inducción con metanol.

Tras 48 horas de inducción, el medio de cultivo se centrifugó y el sobrenadante se dializó en el tampón de cromatografía para la posterior purificación de la inmunotoxina. El análisis electroforético de las diferentes fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad, mostró la presencia de IMTXA33 $\alpha$ S pura en el eluido con 250 mM imidazol (**Figura 8**) Posteriormente, se eliminó el imidazol del tampón de elución, dializando la inmunotoxina frente a tampón fosfato



**Figura 8:** A) Análisis electroforético en PAGE-SDS de alícuotas tomadas durante la producción de IMTXA33 $\alpha$ S. B) Inmunodetección, con un anticuerpo antiHistag de las alícuotas tomadas durante la inducción. C) Análisis electroforético de alícuotas tomadas durante la purificación de la inmunotoxina. No Ret: medio de cultivo dializado después de pasar por la columna Ni-NTA; Lav: lavado de la columna con tampón de lavado (ver Mat. y Met.); Imid 20 mM: lavado de la columna con tampón conteniendo imidazol 20 mM.; Imid 250 mM: diferentes fracciones obtenidas para la elución de la inmunotoxina con tampón conteniendo imidazol 250 mM.

sódico 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.1 M. El rendimiento medio obtenido para las diferentes purificaciones de IMTXA33 $\alpha$ S realizadas fue de 2-5 mg/l de medio de cultivo.

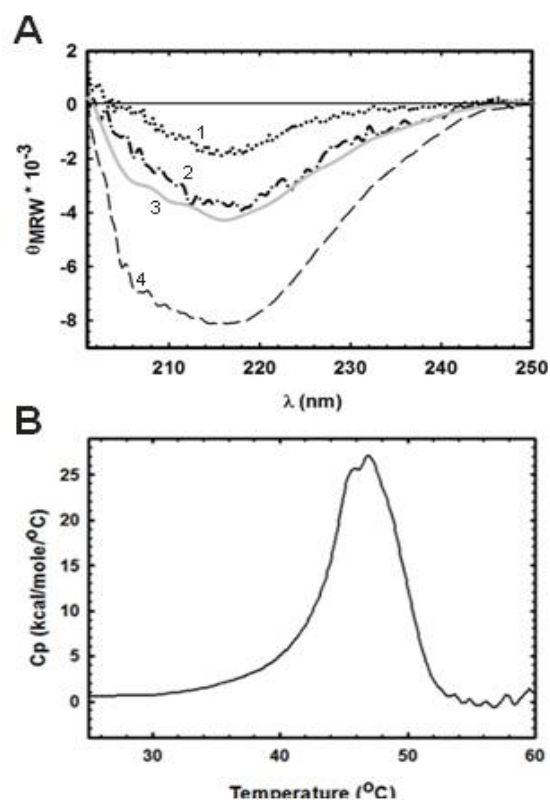
### 1.2.2.- Caracterización estructural

Siguiendo la metodología descrita con los scFvA33, tras la purificación de la inmunotoxina se llevo a cabo el análisis de aminoácidos, para comprobar la pureza de la inmunotoxina, así como para el cálculo de su coeficiente de extinción ( $E^{0.1\%}$ ), que resultó ser  $1.6 \text{ (cm}\cdot\text{mg/ml)}^{-1}$ .

Además, mediante estudios de dicroísmo en el ultravioleta lejano, se determinó el porcentaje de elementos de estructura secundaria en el plegamiento de la inmunotoxina, siendo estos resultados los esperados, mostrando un alto porcentaje de contenido en lamina  $\beta$ . El espectro obtenido es concordante con la suma de los espectros correspondientes a la  $\alpha$ -sarcina y los dominios variables libres, obtenidos también de forma experimental (**Figura 9**).

La caracterización bioquímica de su estructura se completó con el estudio de su estabilidad térmica, mediante DSC, así como del mantenimiento de sus características estructurales tras incubación previa de la inmunotoxina a  $37^\circ\text{C}$ .

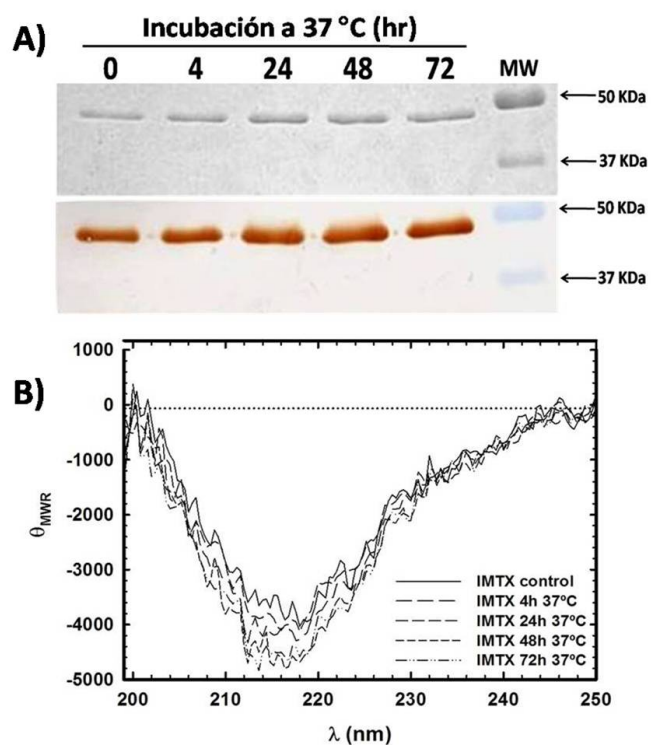
El resultado (**Figura 9**) sugirió una temperatura de desnaturalización de la inmunotoxina entorno a los  $45^\circ\text{C}$ . Sin embargo, el proceso de desnaturalización resultó ser irreversible, como consecuencia de la aparición de agregados insolubles, lo cual no permitió el cálculo de los parámetros de energía asociados al proceso desnaturalización-renaturalización. Debido a la irreversibilidad del proceso, para la



**Figura 9:** A) Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano correspondientes a scFvA33 (1), IMTXA33 $\alpha$ S (2) y  $\alpha$ -sarcina (4). La línea continua gris (3) corresponde con el espectro teórico a partir de la contribución de los espectros 1 y 4 teniendo en cuenta su número de aminoácidos. B) Termograma recogido para el ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la IMTXA33 $\alpha$ S.

estimación de la temperatura de desnaturalización se hizo necesaria la repetición del ensayo de calorimetría repetidas veces, de manera independiente, para verificar los datos obtenidos. A pesar de esto, se puede sugerir un comportamiento en la dinámica de desnaturalización coherente con la presencia de dos estados, inquiriendo incluso un proceso relativamente independiente en la desnaturalización de los dos dominios que constituyen la inmunotoxina. Sin embargo, lo más destacado en relación con la estabilidad de la inmunotoxina radica en la estabilidad de la misma a temperaturas fisiológicamente relevantes, a pesar de una posible mínima contribución de formas desnaturalizadas alrededor de 40°C.

Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de estabilidad registrando los espectros de CD en el UV-lejano tras incubación de la inmunotoxina a 37°C a diferentes tiempos (**Figura 10**). Estos resultados sugieren que la estructura global de la inmunotoxina se mantiene inalterada, aspecto éste crítico para los estudios de citotoxicidad. Estos espectros fueron acompañados del correspondiente análisis electroforético e inmunodetección para cada una de las muestras (**Figura 10**). Este aspecto es importante para comprobar que la proteína no se degrada debido a la incubación a 37°C.



**Figura 10:** Ensayos de estabilidad de IMTXA33 $\alpha$ S. A) Análisis electroforético e inmunodetección de las alícuotas incubadas a 37 °C hasta 72 horas. Para la inmunodetección se ha utilizado anti-Histag. En todos los casos se ha aplicado la misma cantidad de proteína. B) Espectros de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano, obtenidos para las mismas alícuotas.

### 1.2.3.- Caracterización funcional

Considerando la existencia de dos dominios funcionales claramente diferenciados en las inmunotoxinas, un dominio “marcador” que confiere especificidad

de unión a un antígeno y un dominio tóxico responsable de ejercer su actividad en el interior celular produciendo la muerte de las células diana, la caracterización funcional debe tener en cuenta ambos dominios.

Si bien la eficacia funcional real de estas inmunotoxinas debería medirse estudiando la acción conjunta de los dos dominios, y por tanto en términos de su citotoxicidad específica, se ha llevado a cabo el estudio independiente de la funcionalidad de cada uno de los dos dominios incluidos en esta proteína quimérica.

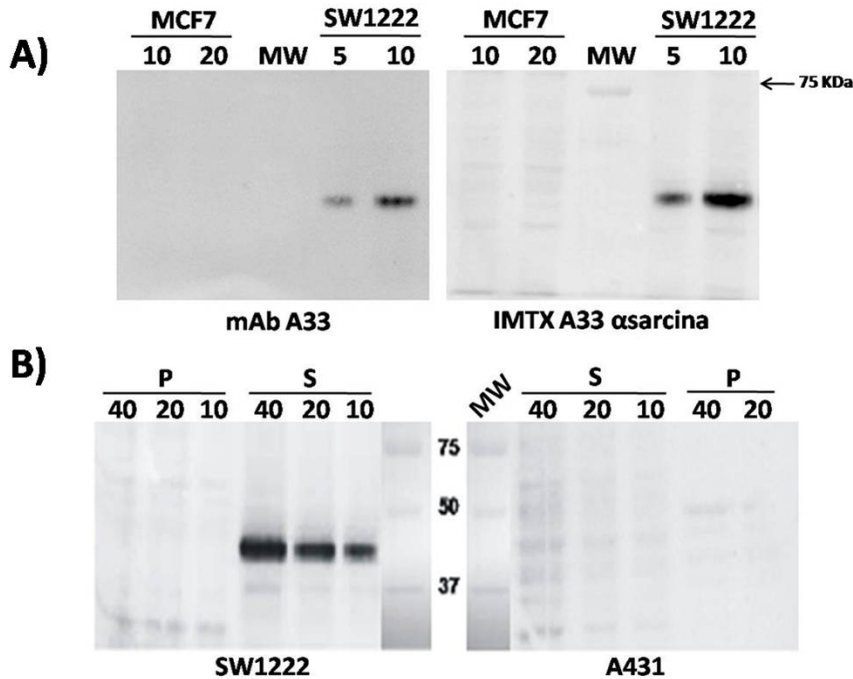
### 1.2.3.1.- Caracterización de la interacción de los dominios variables

La caracterización de la funcionalidad de los dominios variables se basó en el estudio de su capacidad de reconocimiento y unión específica al antígeno GPA33. Para ello, se estudió la capacidad de unión de los dominios variables al antígeno tanto en extractos celulares de células antígeno-positivas y antígeno-negativas, como en células intactas.

Además, para llevar a cabo estos estudios se utilizó también el anticuerpo monoclonal mAbA33 (Abcam) como control. La capacidad de unión específica del anticuerpo monoclonal, así como de sus dominios variables, ya ha sido caracterizada anteriormente (Ritter *et al.*, 2001), lo cual nos permite utilizarlos como control de referencia de la unión en el caso de las inmunotoxinas.

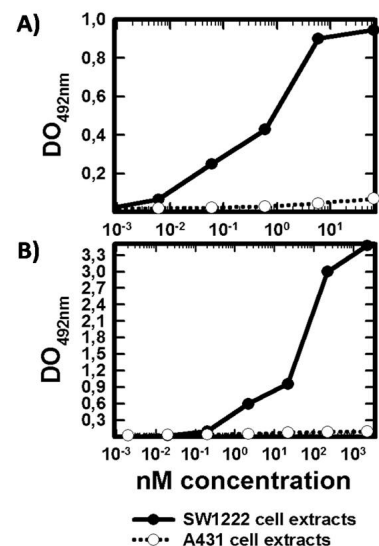
#### A) Ensayos con extractos celulares:

En primer lugar se tomaron células SW1222 (+), A431 (-) y MCF7 (-), y se obtuvieron extractos celulares de ambas líneas, tal y como está descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Estos extractos se aplicaron en PAGE-SDS y se transfirieron a una membrana de Inmobilon. Dicha membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal o con la inmunotoxina, respectivamente. El resultado (**Figura 11**), mostró las bandas de unión, tanto para el anticuerpo completo como para la inmunotoxina, a una proteína de unos 43 KDa, tamaño esperado para el antígeno GPA33 (Ritter *et al.*, 1997). El hecho de que esta banda aparezca tanto con el anticuerpo monoclonal mAbA33 como con la inmunotoxina sólo en el caso de los extractos de células antígeno positivas, demuestra una interacción altamente específica, debida exclusivamente al reconocimiento del GPA33 por parte de las regiones determinantes de complementariedad (CDR).



**Figura11:** Inmunodetección de IMTXA33αS y mAbA33 incubadas con: A) Extractos celulares de las líneas celulares MCF7 (-GPA33) y SW1222 (+GPA33) incubadas con mAb A33 (en la parte izqd) o IMTXA33αS (en la parte dcha.). En la parte superior de cada carril se hace referencia a los microgramos de proteína de extractos celulares aplicados. B) Sobrenadante y sedimento recogidos durante el protocolo de obtención de extractos celulares (ver Mat. y Met.) utilizando las líneas SW1222 (+GPA33) y A431 (-GPA33). Se muestran los microgramos de proteína aplicadas en cada carril. Ambas membranas han sido incubadas con IMTXA33αS.

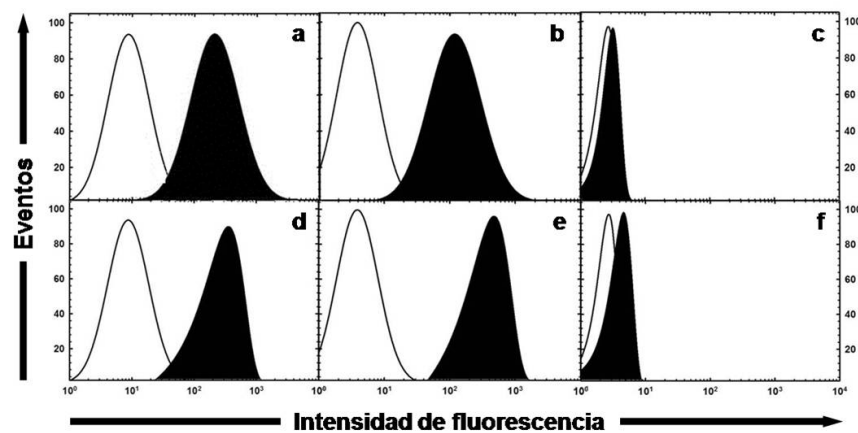
Para tratar de estimar la afinidad de la interacción, los extractos se utilizaron también para realizar un ensayo de ELISA. En primer lugar, tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos se utilizaron distintas cantidades de extracto y el anticuerpo monoclonal completo para encontrar las condiciones optimas para el ensayo de ELISA. Posteriormente se llevó a cabo el ELISA con distintas concentraciones de inmunotoxina en la que no sólo se verificó esa unión de la inmunotoxina, sino que se pudo obtener el valor de ID<sub>50</sub> de dicha unión (**Figura 12**). Este valor, resultó ser además concordante, por su similitud, con los valores obtenidos por otros grupos utilizando la técnica de *surface plasmon resonance* (SPR, de sus sigla en inglés) para estudiar la unión de los dominios variables a la GPA33 (Damasceno *et al.*, 2004).



**Figura 12:** Ensayo de ELISA con el mAbA33 (A) y la IMTXA33αS (B), utilizando extractos de células SW1222 (+GPA33) y A431 (-GPA33).

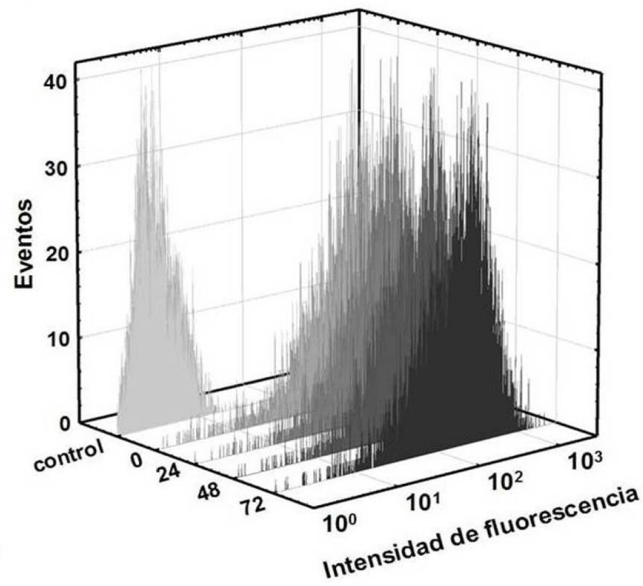
## B) Ensayos con células completas:

Tras los estudios con extractos celulares se llevaron a cabo ensayos de unión al antígeno en células completas mediante citometría de flujo. Los ensayos de citometría de flujo se llevaron a cabo tal y como se ha detallado anteriormente en el apartado de Materiales y Métodos. Para el estudio de unión se utilizaron células antígeno-positivas y antígeno-negativas. El resultado, mostrado en la figura (**Figura 13**), confirmó la capacidad de unión específica de la inmunotoxina a las células antígeno-positivas, SW1222 y LIM1215; no observándose unión en el caso de las células antígeno negativas, A431.



**Figura 13:** Ensayo de unión mediante citometría de flujo. La fila superior corresponde a células incubadas con mAb A33 y la fila inferior a células incubadas IMTXA33αS. Las células utilizadas para el ensayo fueron LIM1215 (a y d) y SW1222 (b y e), como antígeno positivas, y A431 (c y f), como antígeno negativas.

Esta unión se mantenía en las muestras incubadas previamente a 37°C utilizadas en los ensayos de estabilidad, por lo que se conservaba la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno (**Figura 14**).



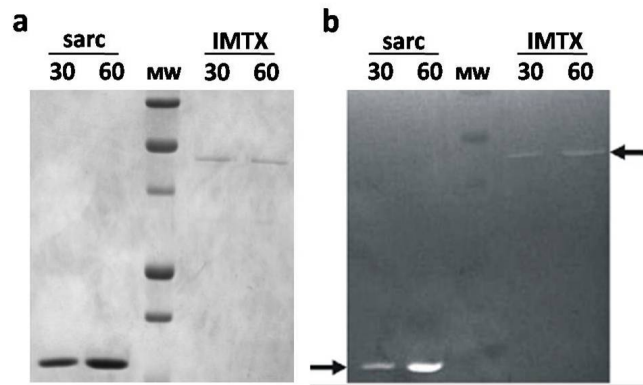
**Figura 14:** Ensayo de estabilidad por citometría de flujo. Se muestran las células incubadas con IMTXA33 $\alpha$ S, previamente incubadas a 37°C a diferentes tiempos. El tubo control está referido a células incubadas con el anticuerpo secundario sin inmunotoxina.

### 1.2.3.2.- Caracterización de la actividad de la $\alpha$ -sarcina

Una vez demostrado el mantenimiento de la funcionalidad del dominio marcador incluido en la inmunotoxina, se estudió la funcionalidad de la ribotoxina. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos utilizados habitualmente para caracterizar la actividad ribonucleolítica de las ribotoxinas, que incluyen ensayos de degradación inespecífica de RNA, así como de actividad específica sobre el ribosoma.

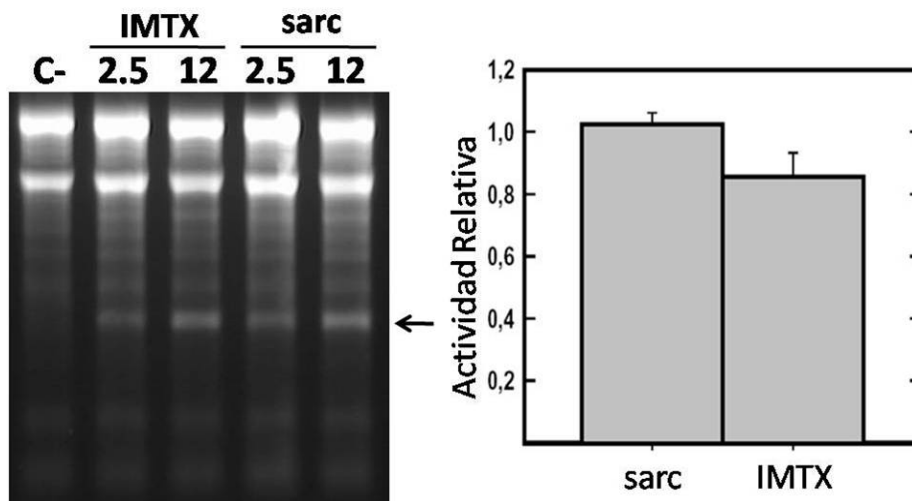
La actividad inespecífica de la  $\alpha$ -sarcina se estudió mediante un zimograma utilizando  $\alpha$ -sarcina libre como control, según se describe en materiales y métodos (**Figura 15**). Este ensayo mostró la existencia de bandas de degradación del poly-A embebido en el gel de poliacrilamida debido a la acción ribonucleolítica de la sarcina tanto incluida en la inmunotoxina, como libre.

En segundo lugar se estudió la actividad específica de la ribotoxina frente a su sustrato, el ribosoma. Para ello, se incubaron reticulocitos libres de células con la IMTXA33 $\alpha$ S y la  $\alpha$ -sarcina libre, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El resultado, (Figura 16), mostró la liberación del fragmento  $\alpha$ , característico de la actividad específica de la  $\alpha$ -sarcina, tanto de ésta libre, como la incluida en la inmunotoxina. Además se pudo cuantificar que la actividad de la sarcina en la inmunotoxina se mantiene por encima de un 85% respecto a la  $\alpha$ -sarcina libre.



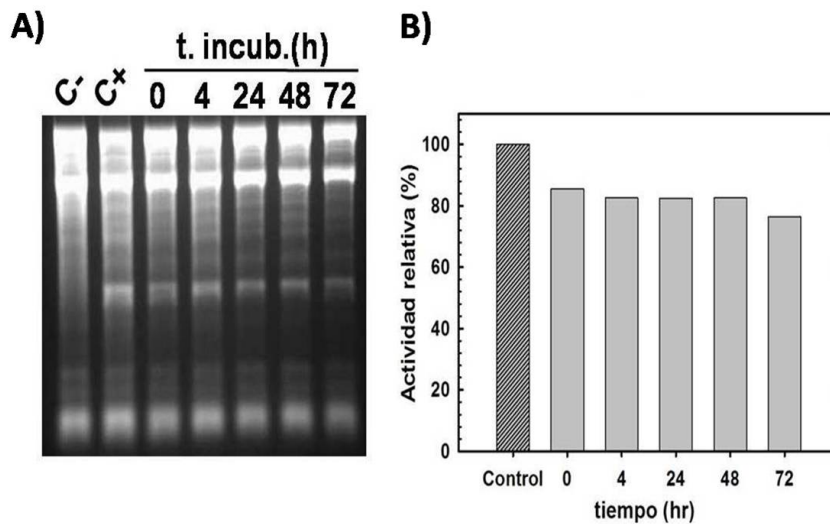
**Figura 15:** Análisis electroforético de la actividad ribonucleolítica inespecífica de la IMTXA33 $\alpha$ S. A) PAGE-SDS en condiciones no reductoras de  $\alpha$ -sarcina e IMTXA33 $\alpha$ S. B) Zimograma frente a poli(A) de  $\alpha$ -sarcina e IMTXA33 $\alpha$ S. Las flechas indican las bandas de degradación del poli(A) para cada proteína. Se indica la cantidad de proteína aplicada en nanomoles.

Este resultado es interesante no sólo por comprobar que se conserva la actividad específica de la  $\alpha$ -sarcina en la inmunotoxina, sino porque es de esperar que una vez en el interior célula se libere al citosol, siendo entonces completamente activa.



**Figura 16:** Ensayo de actividad ribonucleolítica específica con reticulocitos realizado con  $\alpha$ -sarcina e IMTXA33 $\alpha$ S. La figura de la izquierda corresponde al gel del ensayo. La flecha señala la posición correspondiente al fragmento  $\alpha$ , característico de la actividad de la  $\alpha$ -sarcina. Para el ensayo se utilizaron 2.5 y 13 pmoles de cada proteína. El carril marcado como C- corresponde al control en ausencia de proteína. La figura de la derecha corresponde al cálculo de la actividad relativa a partir del densitometrado de las bandas.

Finalmente, se estudió si la actividad ribonucleolítica específica correspondiente al dominio tóxico podría verse afectada como consecuencia de la incubación a 37°C a tiempos largos. Para ello, se realizó el ensayo de actividad frente a ribosomas, con alícuotas de las muestras ensayadas anteriormente para las pruebas de estabilidad. El resultado mostró que se conserva hasta en un 80% la actividad de la sarcina en la inmunotoxina al ser ésta incubada a 37°C durante 72 h (**Figura 17**).



**Figura 17:** Ensayo de actividad específica frente a reticulocitos incubados con inmunotoxina preincubada a 37°C diferentes tiempos. A) Se muestra el resultado obtenido con las alícuotas incubadas entre 0 y 72 horas a 37°C. C- corresponde con reticulocitos incubados en ausencia de proteína. C+ corresponde con reticulocitos incubados con sarcina libre. B) grafica de actividad relativa de la  $\alpha$ -sarcina en la inmunotoxina realizada a partir del densitometrado de las bandas obtenidas en el ensayo de reticulocitos. El 100% de actividad del control corresponde a la de la  $\alpha$ -sarcina libre.

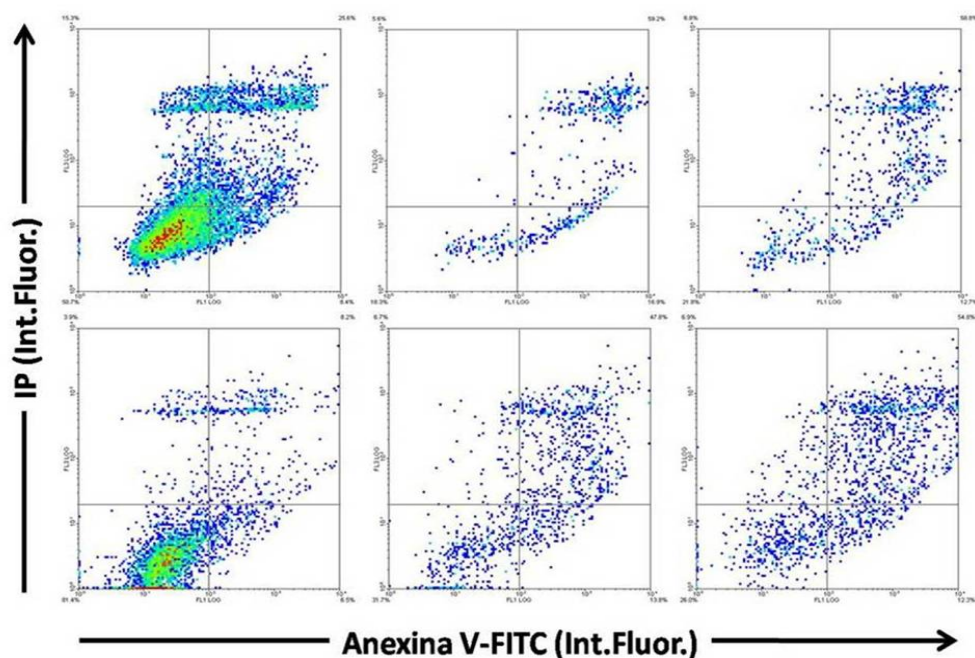
Este hecho, unido a los resultados anteriores sugiere que la inmunotoxina puede ser ensayada frente a células, a tiempos largos sin que su funcionalidad se vea afectada.

### 1.2.3.3.- Ensayos de actividad citotóxica específica

Una vez comprobada la actividad de ambos dominios de manera independiente, así como la conservación de ambas actividades tras incubación a tiempos largos a 37°C, se plantearon los ensayos que, de hecho, definen la eficacia de la actividad de la inmunotoxina como tal, esto es, su citotoxicidad específica frente a células antígeno-positivas.

En este sentido se han llevado a cabo diferentes tipos de ensayos para tratar de obtener la mayor información posible acerca de la eficacia citotóxica de la IMTXA33 $\alpha$ S y de cómo ésta ejerce su acción.

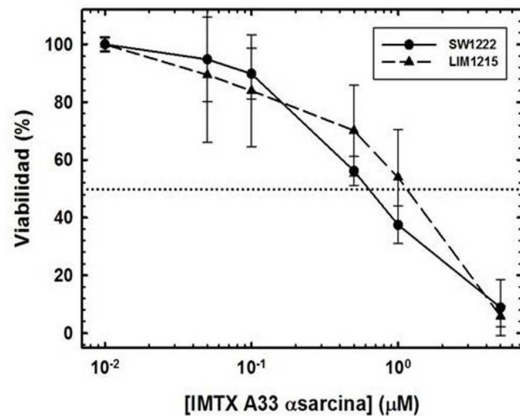
En este sentido, se ha descrito en la bibliografía que la actividad que ejerce la  $\alpha$ -sarcina en el interior de las células conlleva la muerte de las mismas mediante un mecanismo de apoptosis (Olmo *et al*, 2001; Lacadena *et al.*, 2007). Por ello, realizamos un ensayo que nos permitía identificar células en estado apoptótico o necrótico. Este ensayo se realizó utilizando Anexina V-FITC y ioduro de propidio. Las condiciones del ensayo se encuentran descritas en el apartado de materiales y métodos. En la **Figura 18** se observa como la incubación de estas células con inmunotoxina desencadena su muerte sugiriendo una vía apoptótica, como demuestra el aumento de la población de células en los cuadrantes de la derecha de cada figura.



**Figura 18:** Ensayo de viabilidad mediante anexina V-FITC y ioduro de propidio, con células antígeno positivas. La fila superior corresponde a células SW1222 y la fila inferior a células LIM1215. La primera columna corresponde al control de células incubadas en ausencia de proteína. La segunda y tercera columna corresponde a células incubadas con IMTXA33 $\alpha$ S a 1 y 5  $\mu$ M respectivamente.

En segundo lugar se llevo a cabo un ensayo de viabilidad muy estandarizado como es el del MTT, tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Los resultados obtenidos indican que la IMTXA33 $\alpha$ S muestra una actividad citotóxica frente a las líneas celulares SW1222 y LIM1215, ambas antígeno-positivas (**Figura19**). En ambos casos se observó una marcada disminución de la viabilidad celular, referida en

cada punto a los datos obtenidos con los controles, en ausencia de proteína. Así, se puede determinar una  $IC_{50}$ , definida como la concentración de proteína necesaria para obtener una viabilidad celular del 50%, de 0,6 y 1  $\mu$ M para las células SW1222 y LIM1215, respectivamente.



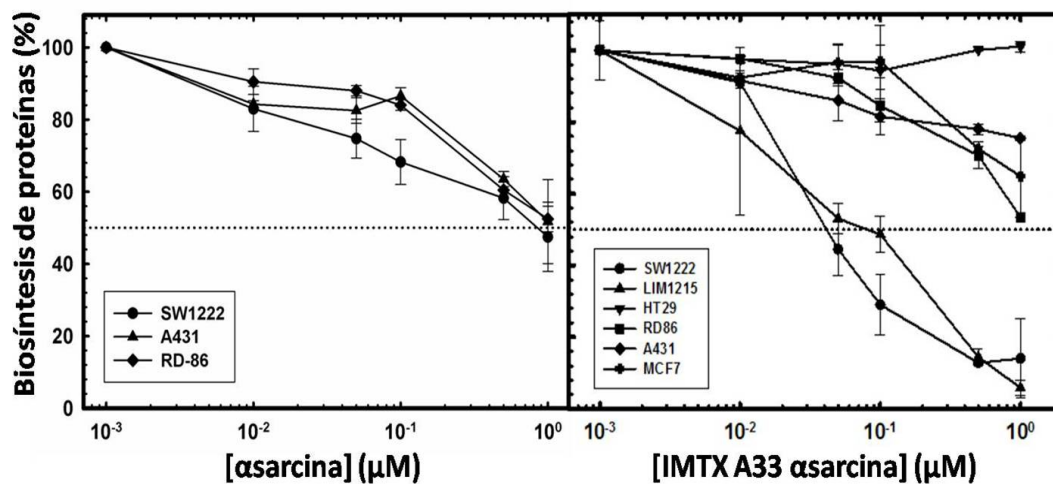
**Figura 19:** Ensayo de viabilidad mediante MTT. Se incubaron células antígeno-positivas SW1222 (línea continua) y LIM1215 (línea discontinua) con distintas concentraciones de IMTXA33 $\alpha$ S, durante 72 horas. La línea de puntos marca el 50% de viabilidad del cultivo.

Por último, y considerando la actividad específica de la sarcina sobre los ribosomas, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la biosíntesis de proteínas, como una medida de su actividad citotóxica específica. Este ensayo es el utilizado habitualmente para cuantificar la citotoxicidad de las ribotoxinas (Lacadena *et al.*, 1999; Olmo *et al.*, 2001). El ensayo se llevó a cabo, según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos, frente a células tanto antígeno-positivas como antígeno-negativas.

El resultado que se presenta en la **Figura 20** muestra una citotoxicidad altamente específica sobre las líneas celulares que presentan el antígeno GPA33 en su superficie (SW1222, LIM1215). Así, los valores de  $IC_{50}$  estarían en el rango nanomolar, siendo 30 nM para las SW1222 y de 70 nM para las LIM1215. Estos valores son sensiblemente menores a los obtenidos en el ensayo de MTT, lo cual es perfectamente explicable, ya que en el primer caso se está midiendo la actividad específica directa sobre el sustrato, mientras que el MTT mide la presencia de células muertas como consecuencia de esta inhibición.

Cabe destacar además que el cálculo de la  $IC_{50}$  mostro una citotoxicidad más de 300 veces mayor en células antígeno-positivas en relación con las antígeno-negativas. Este hecho es importante ya que implicaría la ausencia de toxicidad inespecífica en un posible tratamiento antitumoral con esta inmunotoxina. En este sentido la ligera inhibición de la biosíntesis de proteínas observada en algunas líneas celulares antígeno negativas con concentraciones 1  $\mu$ M o mayores de inmunotoxina, que podría ser atribuida a la citotoxicidad inespecífica intrínseca a la sarcina, es en todo caso menor que la observada con la sarcina libre. Así, la presencia del dominio marcador no solo no

dirige la acción de la sarcina hacia la célula diana, sino que también disminuye la inespecificidad intrínseca de ésta.



**Figura 20:** Ensayo de citotoxicidad midiendo incorporación de Leu-<sup>3</sup>H en las células. Las distintas líneas celulares se incubaron con α-sarcina (panel de la izquierda), o con IMTXA33αS (panel de la derecha) a distintas concentraciones durante 72 h. Se utilizaron líneas celulares antígeno-positivas (SW1222 y LIM1215) y antígeno-negativas (HT29, RD86, A431, MCF7). La línea punteada marca el 50% de viabilidad del cultivo.

### 1.3.- InmunoRNasa basada en la RNasa T1 (IMTXA33T1)

A la vista de los resultados obtenidos con la IMTXA33αS se diseñó una nueva construcción, en este caso utilizando la RNasa T1 como constituyente del dominio tóxico. Como ya se ha comentado en la introducción, la RNasa T1 pertenece a la familia de las RNasas microbianas extracelulares, pero a diferencia de la α-sarcina presenta una actividad ribonucleolítica menos específica, y además no es capaz de interactuar con membranas celulares, lo que la convierte en una RNasa no tóxica.

Así, los resultados obtenidos con esta inmunoRNasa aportarían información sobre las ventajas e inconvenientes respecto a la eficacia citotóxica, de la especificidad o inespecificidad y la actividad ribonucleolítica o en la capacidad o no de interactuar con membranas.

Los resultados obtenidos se presentan siguiendo el esquema desarrollado con las proteínas anteriores.

### 1.3.1.- Diseño y obtención del plásmido de expresión pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33RNasaT1

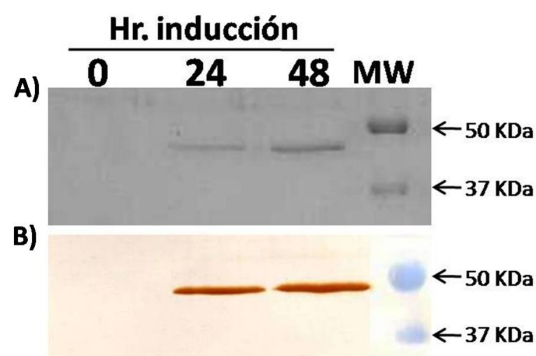
Para la obtención del plásmido pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33RNasaT1 se partió del plásmido pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33  $\alpha$ -sarcina, que había sido obtenido anteriormente en el laboratorio. Para ello se cambió el cDNA de la  $\alpha$ -sarcina por el cDNA de la RNasa T1. Para obtener este último se utilizó un plásmido que se tenía en el laboratorio (pPICZ $\alpha$ A-IMTXB5RNasaT1) del que se amplificó la secuencia del cDNA de la RNasaT1 mediante PCR, utilizando dos oligos que creaban dos sitios de restricción *NotI* y *Sall* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Así, se obtuvo el fragmento de 300 pb esperado que se digirió con las enzimas adecuadas. Los fragmentos digeridos purificados, se ligaron con el correspondiente vector de expresión, digerido con las mismas enzimas, para su transformación en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ F', siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las células transformadas se seleccionaron con zeocina.

De aquellas colonias que resultaron positivas, se purificó el plásmido y se linearizó mediante una digestión con *Pme* I, para electroporar células de *P. pastoris* KM71 electrocompetentes según lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Se seleccionaron las colonias con diferentes concentraciones de zeocina. De las colonias sembradas se escogieron varias para llevar a cabo una expresión piloto, seleccionándose una de las obtenidas con Zeocina 750  $\mu$ g/ml para la producción a media escala, al ser la que mayor cantidad de IMTXA33T1 produjo.

### 1.3.2.- Producción y purificación de la IMTXA33T1.

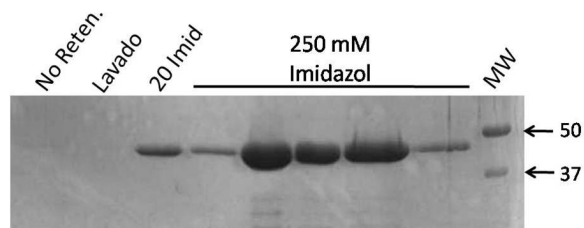
Teniendo en cuenta los antecedentes con la IMTXA33 $\alpha$ S, la producción de la IMTXA33T1 se realizó en base a las mismas condiciones, determinándose que el tiempo óptimo de producción de inmunoRNasa se encuentra entre las 24 y las 48 horas

(Figura 21). La purificación se llevó a cabo en las mismas condiciones según lo descrito



**Figura 21:** A) Análisis electroforético en PAGE-SDS y B) Inmunodetección de alícuotas tomadas cada 24 horas durante la producción de IMTXA33T1.

anteriormente para la IMTXA33 $\alpha$ S. En la **Figura 22** se muestra el análisis electroforético correspondiente a la purificación de la IMTXA33T1.



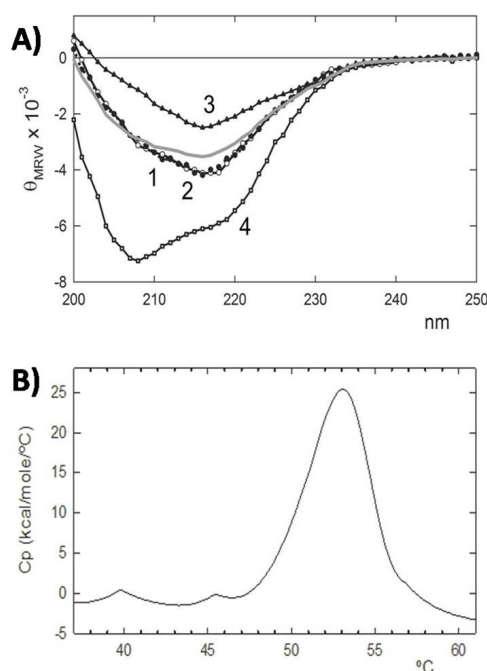
**Figura 22:** Análisis electroforético de la purificación de IMTXA33T1 en la columna de Ni-NTA agarosa. Se muestran dos de los patrones de masa molecular (KDa).

El rendimiento medio obtenido en las distintas producciones de inmunoRNasa fue de 3-7 mg/ml, siendo superior al obtenido por la IMTXA33 $\alpha$ S.

### 1.3.3.- Caracterización estructural

El análisis de aminoácidos realizado con la IMTXA33T1 nos permitió comprobar la integridad de la inmunoRNasa, así como calcular el coeficiente de extinción de la proteína con un valor de 1.6 (cm·mg/ml)<sup>-1</sup>.

Se registraron además los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, mostrando nuevamente un plegamiento de la proteína elevado en lamina  $\beta$  (**Figura 23**). En este caso, este porcentaje es mayor que el de la IMTXA33 $\alpha$ S, lo cual es razonable teniendo en cuenta el menor tamaño de la ribonucleasa T1, así como el hecho del contenido en hélice  $\alpha$  y en estructura no ordenada descrito para la RNasa T1 (Pace *et al.*, 1991).

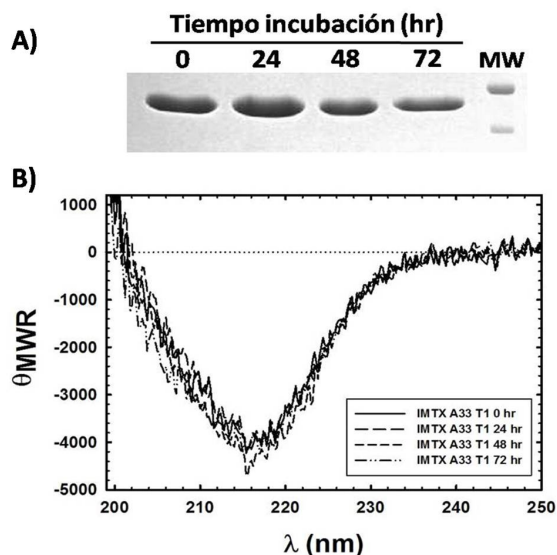


**Figura 23:** A) Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano correspondientes a la IMTX A33 T1 (teórico) (1), IMTX A33 T1 (obtenido) (2), scFvA33 (3), RNasa T1 (3). La línea continua gris corresponde con el espectro teórico obtenido a partir de la contribución de los espectros experimentales 3 y 4 teniendo en cuenta su número de aminoácidos. B) Termograma recogido para el ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la IMTXA33T1.

De igual manera a lo explicado para la IMTXA33 $\alpha$ S, se calculó la temperatura de desnaturalización de la inmunoRNasa. Para ello, se registraron los espectros de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la inmunoRNasa. El resultado (**Figura 23**) mostró una temperatura de desnaturalización de la inmunotoxina entorno a los 50°C, siendo este proceso de desnaturalización irreversible, como ya sucedía con la IMTXA33 $\alpha$ S. En este caso no se observó la existencia de dos máximos.

Este resultado, junto con lo obtenido anteriormente para la IMTXA33 $\alpha$ S parecía anticipar que la IMTXA33T1 sería estable tras su incubación a 37°C durante tiempos largos. Efectivamente, cuando se llevaron a cabo los ensayos de estabilidad se observó que la

inmunorNasa no presentaba degradación significativa, pudiendo detectarse cantidades mínimas de RNasa T1 libre, y que se mantenía su plegamiento (**Figura 24**).

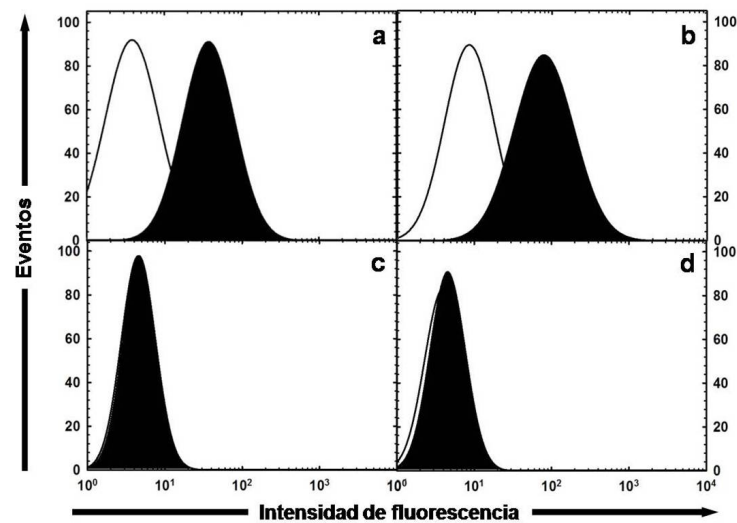


**Figura 24:** Ensayos de estabilidad de IMTXA33T1. A) Análisis electroforético de las alícuotas de IMTXA33T1 incubadas a 37 °C durante diferentes tiempos. En todos los casos se cargó la misma cantidad de proteína. B) Espectros de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano, obtenidos para las mismas alícuotas.

### 1.3.4.- Caracterización funcional

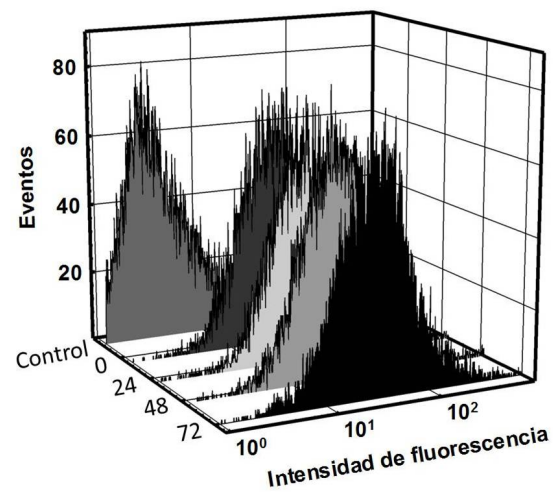
#### 1.3.4.1.- Caracterización de la interacción de los dominios variables

Se siguió la misma metodología que en el bloque anterior para caracterizar la funcionalidad de los dominios. Si bien es de esperar resultados similares, no hay que olvidar que el objetivo de este trabajo es buscar la construcción que resulte más eficaz frente a las células diana. En este sentido la sustitución de la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, por la RNasa T1 de naturaleza no tóxica, menor tamaño y con diferencias significativas en cuanto a su actividad podría resultar en una proteína de fusión con propiedades diferentes, al menos en lo que se refiere al dominio tóxico.



**Figura 25:** Ensayo de unión mediante citometría de flujo. La fila superior corresponde a células antígeno-positivas incubadas con IMTXA33T1 y la fila inferior a células antígeno-negativas incubadas con IMTXA33T1. Las células utilizadas para el ensayo fueron SW1222 (a) y AsPC1 (b), como antígeno positivas; y HT29 (c) y MCF7 (d), como antígeno negativas.

Así, se analizó la capacidad de interacción del dominio marcador en la IMTXA33T1, centrándonos en este caso únicamente en las técnicas que implican ensayos con células completas. El estudio de unión al antígeno GPA33 mediante citometría de flujo (**Figura 25**), se realizó utilizando tanto células antígeno-negativas (HT29 y MCF7), como células antígeno-positivas (SW1222 y AsPC-1), observándose la unión específica de la IMTXA33T1 a las células que presentan el antígeno GPA33 en su membrana.



**Figura 26:** Ensayo de estabilidad mediante citometría de flujo de la IMTXA33T1 con células antígeno-positivas SW1222. La proteína se incubó previamente a 37°C a diferentes tiempos (0 a 72 h). El tubo control corresponde con células incubadas en ausencia de proteína.

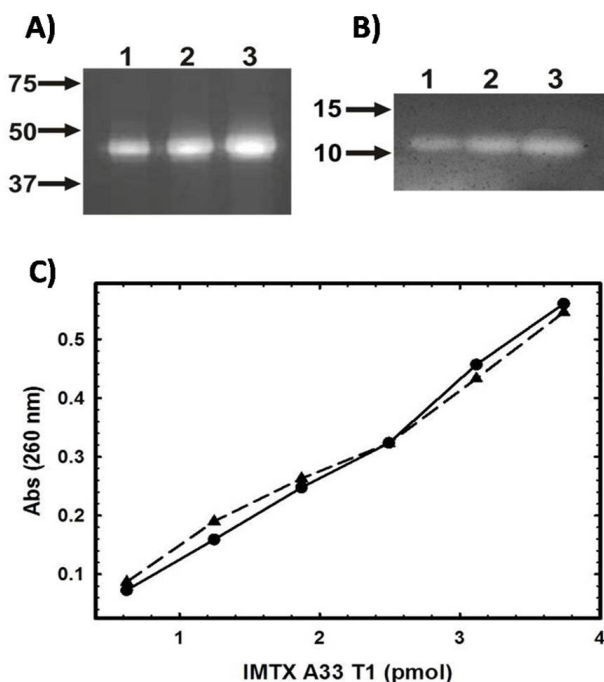
Nuevamente, con la idea de comparar ambos inmunoconjugados, se llevó a cabo el estudio de la conservación de la capacidad de unión de los dominios variables tras ser incubados a 37°C a tiempo largo (**Figura 26**) comprobándose que ésta capacidad permanecía inalterada a todos los tiempo ensayados.

### 1.3.4.2.- Caracterización de la actividad de la RNasa T1

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad ribonucleolítica de RNasa T1 es inespecífica en tanto que no reconoce una secuencia concreta de RNA, sino todo aquel que sea accesible a su actuación, con preferencia por nucleótidos de guanina (Osterman *et al.*, 1978; Steyaert, 1997). Por ello, nos planteamos varios ensayos para medir su actividad ribonucleolítica cuando se encuentra incluida en el inmunoconjugado.

Para ello, en primer lugar, al igual que en el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S, se realizó un zimograma, con las mismas condiciones pero utilizando esta vez poly-G como sustrato, al ser éste el polinucleótido preferente de la RNasa T1 (Martínez-Ruiz *et al.*, 2001). En la **Figura 27** se observan las bandas de degradación del poly-G, debido a la acción de la RNasa T1 tanto formando parte de la inmunoRNasa, como en su forma libre.

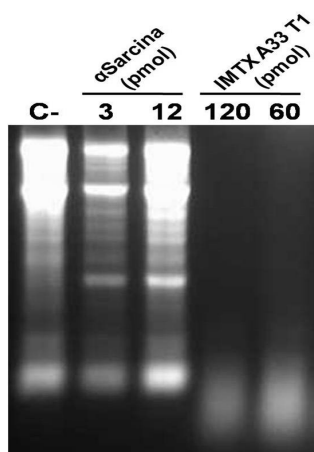
Por otro lado, para poder cuantificar mejor la actividad de la RNasa T1 en la inmunoRNasa se realizó un ensayo de actividad ribonucleasa frente a RNA de levadura (*Torula*), ya utilizado previamente con la RNasa T1 nativa (Steyaert., 1997) en el que se relaciona la actividad ribonucleolítica con un aumento en la absorbancia a 260 nm, característica de los nucleótidos, en este caso debido a la aparición de oligonucleótidos solubles. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de actividad de la ribonucleasa, ya esté ésta libre o formando parte de la inmunoRNasa (**Figura 27**).



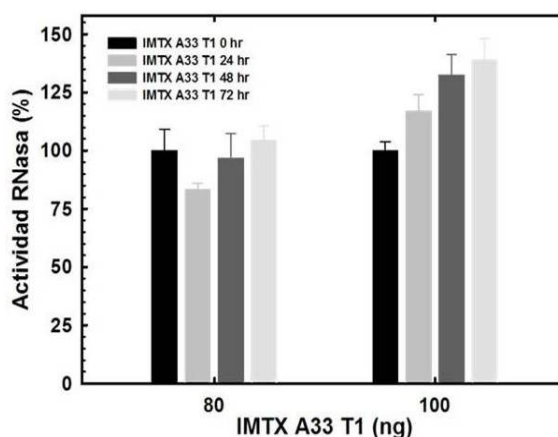
**Figura 27:** Zimograma con IMTXA33T1 (A) y RNasa T1 libre (B) utilizando Poly-G como sustrato en el gel. Se muestra la masa de los patrones (en kDa). En ambos casos se cargaron 3.9 pmol (1), 12.9 pmol (2) y 25.9 pmol (3). C) Ensayo de degradación de RNA de levadura realizado con IMTXA33T1 (línea continua) y RNasa T1 (línea punteada). Se representa la absorbancia a 260 nm como medida de la aparición de los oligonucleótidos solubles producidos por la actividad RNasa sobre el RNA, frente a las diferentes cantidades de proteína.

Aunque la RNasa T1 se describe como una exonucleasa inespecífica, se decidió llevar a cabo el ensayo frente a reticulocitos, utilizado para caracterizar la actividad específica de las ribotoxinas, ya que el RNA ribosomal también es objeto de su acción. Como era de esperar, en este caso, en lugar de la aparición del fragmento  $\alpha$  característico de la actividad específica de las ribotoxinas, se observó la completa degradación de los RNA ribosomales como consecuencia de la actividad exonucleasa de la RNasa T1 (**Figura 28**). Hay que destacar que para obtener la degradación completa del RNA ribosomal fue necesario utilizar cantidades elevadas de inmunoRNasa.

Este ensayo fue el elegido para realizar los estudios de estabilidad de la proteína, en las mismas condiciones que el comentado anteriormente, pero en este caso con las alícuotas incubadas a 37°C. El resultado (**Figura 29**) mostró que la actividad de la inmunoRNasa T1 se mantiene. Se representa el porcentaje de actividad RNasa referida a cada caso a la RNasa T1 libre, que se considera el 100% de actividad.



**Figura 28:** Ensayo de reticulocitos realizado con la IMTXA33T1. Como control negativo se incuban reticulocitos en ausencia de proteína (C-), y como control positivo se utilizan dos concentraciones de  $\alpha$ -sarcina.



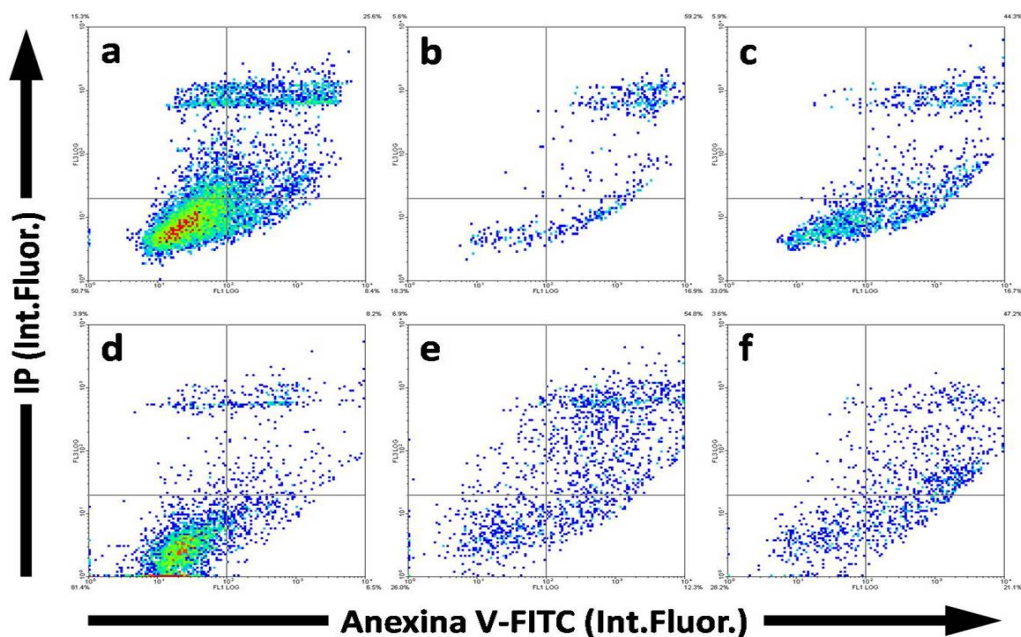
**Figura 29:** Ensayo de estabilidad de la actividad ribonucleolítica. Se incubó previamente la IMTXA33T1 a 37°C durante diferentes tiempos. Se representa el porcentaje de actividad RNasa referida en cada caso a la RNasa T1 libre, que se considera el 100% de actividad.

### 1.3.2.3.- Ensayos de actividad citotóxica específica

En el caso de la inmunoRNasa el planteamiento de cara a los ensayos de citotoxicidad fueron distintos a los de IMTXA33 $\alpha$ S. Si bien en este último caso, el ensayo

de leucina tritiada nos permitía establecer una relación directa entre la actividad ejercida por la proteína y la consiguiente muerte celular, en el caso de la inmunoRNasa no podemos establecer esa relación directa pues no se ejerce ninguna actividad específica sobre un sustrato específico en la célula. Por ello los ensayos realizados sirven para determinar la mayor o menor viabilidad de un cultivo, siendo esto una medida directa de viabilidad, pero no una medida directa de la actividad de la ribonucleasa en la célula.

En primer lugar, al igual que en el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S, se planteó el ensayo basado en la Anexina V-FITC e ioduro de propidio, para verificar si la acción de la inmunoRNasa conllevaba una activación o no de la apoptosis en las células incubadas con la misma. El resultado (**Figura 30**) mostró como las células incubadas con inmunoRNasa se encontraban desplazados hacia los cuadrantes de la derecha en cada caso, correspondientes al proceso de apoptosis. Por tanto, la muerte celular desencadenada por la actividad exonucleasa de la RNasa T1 sigue una vía apoptótica.



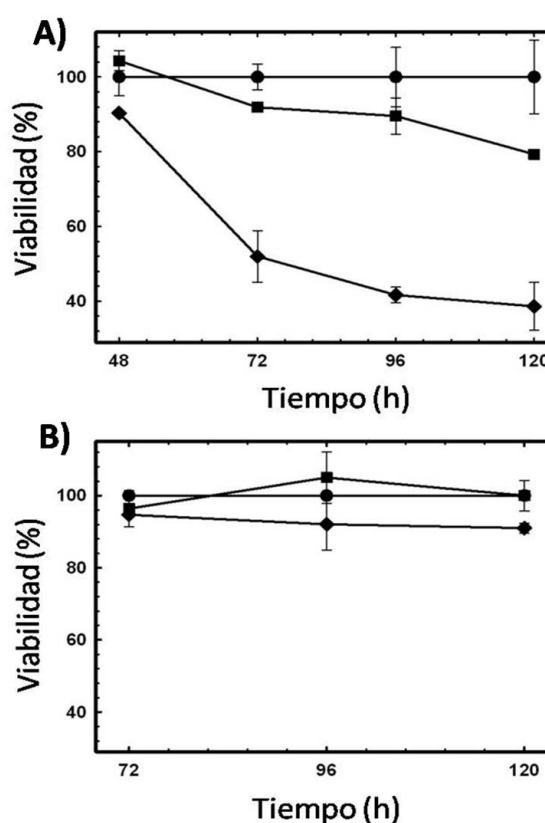
**Figura 30:** Ensayo de viabilidad celular basada en incubación con anexina V-FITC y ioduro de propidio. La fila superior corresponde a células SW1222 y la fila inferior a células LIM1215. La primera columna (a y d) corresponde al control de células incubadas en ausencia de proteína. La segunda y tercera columna corresponden a células incubadas con IMTXA33T1 1  $\mu$ M (b y e) y 5  $\mu$ M (c y f), respectivamente.

Una vez establecida la vía de muerte celular desencadenada por la IMTXA33T1, el siguiente paso fue tratar de cuantificar la eficacia citotóxica de la misma, así como su especificidad frente a las células diana. Para ello, se utilizaron dos ensayos diferentes

de determinación de la viabilidad celular, el primero de ellos basado en las medidas de ATP intracelular y el segundo basado en el MTT, descrito anteriormente. En ambos casos se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de colon, las SW1222, antígeno-positivas, y las HT29, antígeno-negativas.

En primer lugar se determinó la viabilidad celular de los cultivos incubados con IMTXA33T1 mediante medidas de ATP intracelular, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El resultado (**Figura 31**) mostró como la viabilidad del cultivo se ve comprometida al ser incubado con inmunoRNasa solo en el caso de las células antígeno-positivas (SW1222), sin causar cambios en la viabilidad en el caso de la incubación con las células antígeno-negativas (HT-29). En este ensayo se utilizaron dos concentraciones de inmunoRNasa, incubándola a diferentes tiempos, desde 48 a 120 horas. En este caso, y dado el carácter inespecífico de la actividad ribonucleolítica de la RNasa T1 se extendió el tiempo de incubación hasta tiempos más largos de lo habitual.

En primer lugar hay que destacar la absoluta especificidad de activación de la IMTXA33T1 sobre las células diana, ya que no se observan disminuciones significativas de la viabilidad celular en los cultivos de células antígeno-negativas. Por otro lado, los resultados mostraron una disminución de la viabilidad con la concentración más alta de IMTXA33T1.

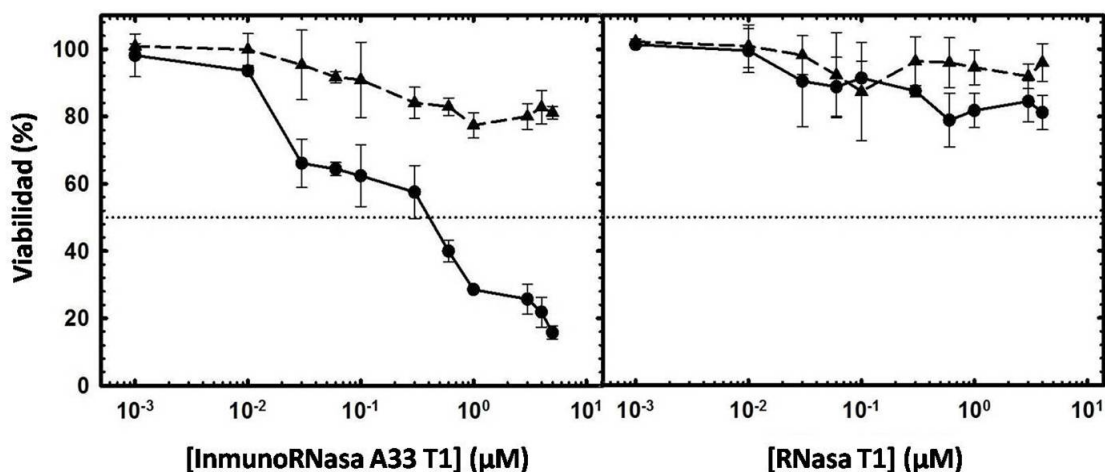


**Figura 31:** Ensayo de viabilidad celular basada en la medida de ATP. A) Células antígeno-positivas SW1222 y B) células antígeno-negativas HT29. En ambos casos se incubaron con IMTXA33T1 1  $\mu$ M (u) y 0.1  $\mu$ M (n). El valor de viabilidad obtenido se refiere al control (I), de células incubadas en ausencia de proteína, considerado como el 100% en cada caso.

A la vista de los resultados se decidió considerar el tiempo de 96 h de incubación para determinar el valor de la IC<sub>50</sub>. Para ello, y para comparar con los resultados

obtenidos con la IMTXA33 $\alpha$ S se realizó el ensayo de MTT, en este caso utilizando diferentes concentraciones, tanto de IMTXA33T1 como de RNasa T1 libre. El resultado confirmó la elevada especificidad citotóxica de la IMTXA33T1 sobre la línea celular antígeno-positiva, SW1222, con una IC<sub>50</sub> alrededor de 0.3  $\mu$ M; mientras que la viabilidad celular de las células HT29 no se ve prácticamente afectada (**Figura 32**).

En este caso adquiere más importancia si cabe al comparar su comportamiento con el de la RNasa T1 libre que no es capaz, como era de esperar al estar caracterizada como RNasa no tóxica (Yuki *et al.*, 2004), de afectar a la viabilidad celular en ninguno de los cultivos celulares ensayados. De este modo se ha conseguido transformar una RNasa no tóxica en una RNasa citotóxica exclusivamente para carcinoma de colon que expresa el antígeno GPA33.



**Figura 32:** Ensayo de viabilidad mediante MTT. Se utilizó la línea celular antígeno-positiva SW1222 (●) y la antígeno-negativa HT29 (▲). Ambas líneas fueron incubadas durante 96 horas con diferentes concentraciones de IMTXA33T1 o RNasa T1 libre.

#### **1.4.- Inmunotoxina basada en la Hirsutelina W68/71/75F (Hta3ΔW)**

Los resultados obtenidos con las dos construcciones estudiadas hasta la fecha, pusieron de manifiesto la eficacia del antígeno GPA33 como marcador tumoral específico, así como la capacidad de la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, y de la RNasa T1, de carácter no tóxico, para eliminar las células diana como constituyentes del dominio tóxico de estos inmunoconjugados.

Si bien la IMTXA33 $\alpha$ S presenta una mayor eficacia citotóxica, asociada a una menor IC<sub>50</sub>, como consecuencia de su actividad ribonucleolítica altamente específica, la IMTXA33T1 presenta una menor citotoxicidad inespecífica, debido a la incapacidad de la RNasa T1 para interaccionar con membranas. Parecería lógico por tanto tratar de obtener una nueva construcción que aunase lo mejor de la IMTXA33 $\alpha$ S e IMTXA33T1, es decir construir una inmunotoxina basada en una RNasa no tóxica, pero con una actividad ribonucleolítica específica como la de las ribotoxinas.

En este sentido la obtención de formas mutantes de ribotoxinas llevada a cabo en nuestro grupo de investigación, desde hace más de una década, dirigidas a estudiar las relaciones estructura-función de las mismas, ha permitido obtener recientemente las primeras variantes no citotóxicas de una ribotoxina, en este caso de la hirsutelina A, pero que conservan su actividad ribonucleolítica específica (Herrero-Galan *et al.*, 2012). Estas variantes, que presentan sustituciones en dos o tres triptófanos que aparecen en esta ribotoxina, ven alterada su capacidad de interaccionar con membranas, impidiéndose así su entrada en las células, y por tanto su carácter citotóxico.

En nuestro caso se utilizó la variante W68/71/75F de la HtA para tratar de obtener una forma optimizada de las inmunotoxinas caracterizadas hasta ese momento.

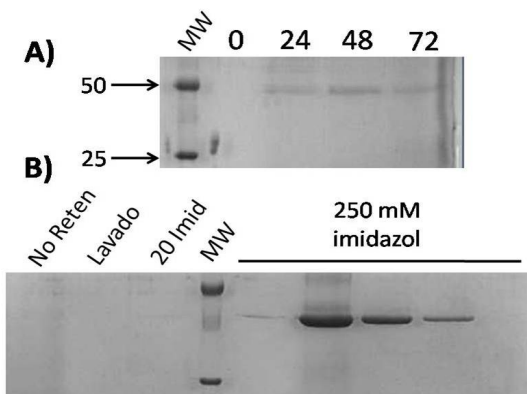
#### **1.4.1 Diseño y obtención del plásmido de expresión pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33-HtA3 $\Delta$ W**

El diseño y obtención del plásmido pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33-HtA3 $\Delta$ W siguió un esquema parecido al empleado para obtener el plásmido de la IMTXA33T1. Para ello se amplificó la secuencia de cDNA de la HtA3 $\Delta$ W, clonada en el plásmido pTacTac, mediante PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes (ver Materiales y Métodos). El fragmento amplificado, incluyendo las secuencias de reconocimiento para *Not I* y *Xho I* en los extremos 5' y 3' respectivamente se purificó y digirió con ambas enzimas, junto con el plásmido pPICZ $\alpha$ A-IMTXA33- $\alpha$ -sarcina. Los fragmentos obtenidos se ligaron y transformaron en la cepa DH5 $\alpha$ F' de *E. coli* para su propagación y producción. Se analizó el plásmido de algunas de las colonias obtenidas y seleccionaron aquellas que tenían la secuencia correcta. A partir de ésta se purificó el plásmido y se linearizó mediante digestión con *Bst XI*, para electroporar células *P. pastoris* KM71.

### 1.4.2.- Producción y purificación de la inmunotoxina.

Para la producción de la inmunotoxina basada en la HtA3 $\Delta$ W (IMTXA33HtA3 $\Delta$ W) se siguió la misma metodología que con las otras dos construcciones. Si se considera que la HtA es la ribotoxina más pequeña descrita hasta la fecha y que además guarda similitudes con la RNasa T1, era de esperar que la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W se produjera en las mismas condiciones, con un rendimiento similar al de las otras construcciones.

Sin embargo, analizada la expresión hasta 120 horas de inducción mediante PAGE-SDS e inmunodetección no se observaron bandas correspondientes a la inmunotoxina. El análisis mediante PAGE-SDS e inmunodetección del contenido intracelular en los cultivos inducidos mostró la presencia de IMTXA33HtA3 $\Delta$ , posiblemente fusionada al péptido señal del factor  $\alpha$ . Este hecho sugería un procesamiento incorrecto de la proteína recombinante, por lo que se llevaron a cabo nuevas pruebas de expresión variando algunas condiciones. En este sentido, y de acuerdo con lo descrito en la literatura para otras inmunotoxinas para tratar de disminuir



**Figura 33:** Análisis electroforético correspondiente a A) Alícuotas tomadas cada 24 h (entre 0 y 72 h) durante la producción de IMTXA33HtA3 $\Delta$ W. Las flechas indican la masa molecular de los patrones en kDa; B) Alícuotas obtenidas durante la purificación de la inmunotoxina. Se muestran varias fracciones correspondientes al pico de elución de la inmunotoxina con 250 mM imidazol.

la producción de inmunotoxina y favorecer su correcto procesamiento, se utilizaron mezclas de MeOH:glicerol (4:1) como inductor, suplementando el medio con extracto de levadura y se disminuyó la temperatura de inducción a 15°C (ver Materiales y Métodos). Con estas condiciones se llevó a cabo una expresión piloto y las alícuotas recogidas cada 24 horas se analizaron mediante PAGE-SDS e inmunodetección, detectándose una banda correspondiente con la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W, con un máximo de producción en torno a las 48 h (**Figura 33**)

De acuerdo con el protocolo de purificación utilizado con las otras construcciones, se purificó a homogeneidad la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA (**Figura 33**) con un rendimiento de 1mg/ml.

### 1.4.3.- Caracterización estructural

Tras la purificación se llevó a cabo el análisis de aminoácidos, para comprobar la correcta biosíntesis de la inmunotoxina, así como para el cálculo del coeficiente de extinción ( $E^{0.1\%}$ ), que resultó ser de  $1.4 \text{ (cm}\cdot\text{mg/ml)}^{-1}$ .

Seguidamente se registró el espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, de la inmunotoxina (**Figura 34**). El espectro, en este caso, resultó ser muy diferente al teórico, contrariamente a lo ocurrido en el caso de la inmunotoxina  $\alpha$ -sarcina y de la inmunorribonucleasa. Si observamos la figura, el espectro obtenido parecería el de una proteína sin plegamiento o desnaturalizada. Esto nos hizo pensar en tres posibles explicaciones: o bien la proteína no estaba totalmente sintetizada, por lo que podía no estar correctamente plegada; o hay una mezcla de proteína desnaturalizada y correctamente plegada; o finalmente, ese es su espectro real, y no hay coincidencia con el teórico, posiblemente por la influencia de la ausencia de los tres triptófanos. La primera opción se descartó pues si hay proteína no sintetizada hasta el final, ésta no se retendría en la columna, al estar la extensión de histidinas en el extremo C-terminal.

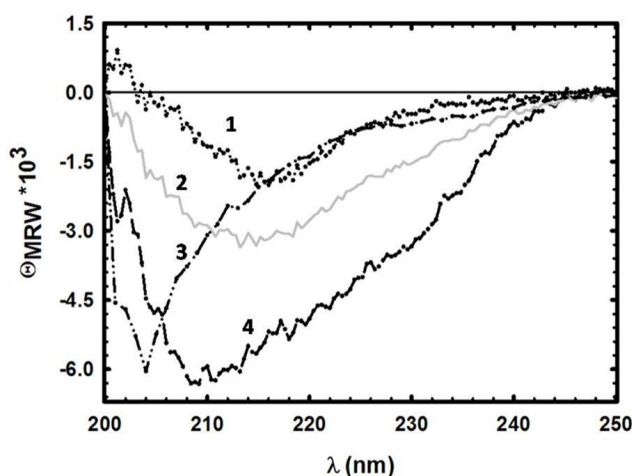


Fig.34: Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano correspondientes a la IMTXA33Hta3 $\Delta$ W (teórico) (2), IMTXA33Hta3 $\Delta$ W (experimental) (3), scFvA33 (1), y Hta 3 $\Delta$ W (4). El espectro teórico se obtiene a partir de la contribución de los espectros 1 y 4 teniendo en cuenta su número de aminoácidos.

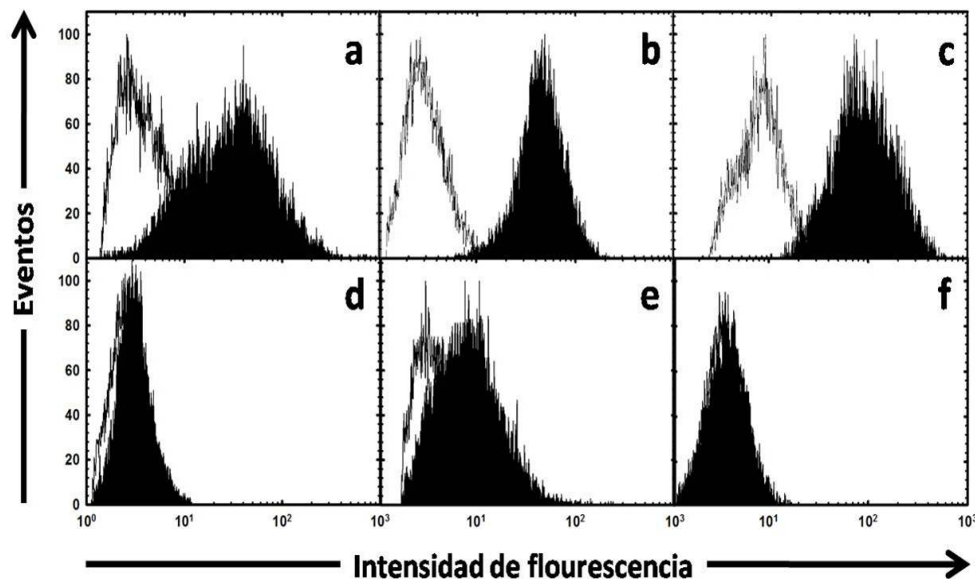
La ausencia de agregados en las disoluciones de la inmunotoxinas no parecía indicar que hubiese una parte de inmunotoxina desnaturalizada, por lo que se decidió continuar con la caracterización funcional de la inmunotoxina.

#### 1.4.4.- Caracterización funcional

##### 1.4.4.1.- Caracterización de la interacción de los dominios variables

Al igual que en los casos anteriores, inicialmente llevamos a cabo la caracterización funcional del dominio marcador, estudiando la unión e interacción con células antígeno-positivas y antígeno-negativas mediante citometría de flujo.

Para ello se utilizaron las líneas celulares antígeno-positivas SW1222, LIM1215 y AsPC-1, y como células antígeno-negativas, las líneas A431, HT29 y MCF7. El resultado, (**Figura 35**), mostró la unión de la IMTXA33HtA3ΔW a todas las células antígeno-positivas, no uniéndose a las otras líneas celulares, que no presentan el antígeno GPA33 en su superficie.

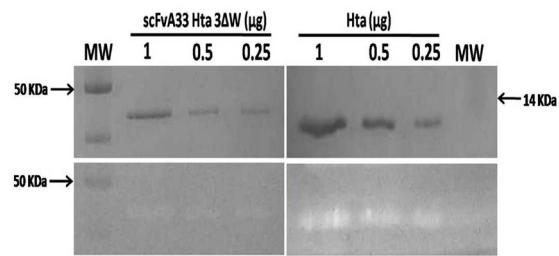


**Figura 35:** Ensayo de unión de IMTXA33HtA3ΔW mediante citometría de flujo. La inmunotoxina fue incubada con células antígeno-positivas AsPC1 (a), LIM1215 (b) y SW1222 (c), así como con células antígeno-negativas A431 (d), HT29 (e) y RD86 (f). En todos los casos se muestra el control correspondiente a células incubadas en ausencia de inmunotoxina (perfil blanco).

##### 1.4.4.2.- Caracterización de la actividad ribonucleolítica de la Hirsutelina 3ΔW

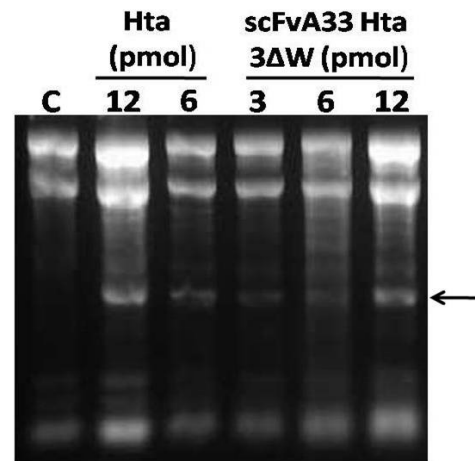
Al igual que en los casos anteriores, se caracterizó la actividad ribonucleolítica tanto inespecífica como específica. Así, en primer lugar se realizó un zimograma. El ensayo se llevó a cabo utilizando poly-G como homopolinucleótido. Se ensayaron tres

cantidades de inmunotoxina y de HtA3ΔW libre, utilizada como control positivo. El resultado, mostrado en la **Figura 36**, si bien permitía ver las bandas de degradación debidas a la actividad de la ribotoxina en ambos casos, mostraba una gran diferencia en cuanto a la intensidad de las bandas en el caso de la inmunotoxina, siendo éstas mucho menos intensas.



**Figura 36:** Análisis electroforético en PAGE-SDS (fila superior) y zimograma (fila inferior) realizado con IMTXA33Hta3ΔW (columna izquierda) y Hta libre (columna derecha). Los geles contienen embebido poly-G. Las flechas muestran el valor de los patrones de masa molecular en kDa.

Finalmente se estudió la actividad específica sobre el ribosoma. Los resultados de este ensayo, que se llevó a cabo según lo descrito en el apartado de materiales y métodos, se muestran en la **Figura 37**. El resultado mostró la actividad habitual de la Hta 3ΔW sobre el ribosoma, liberándose el fragmento α característico de su actividad, que se mantiene en la IMTXA33HtA3ΔW, lo que implicaría la correcta funcionalidad el dominio toxico.

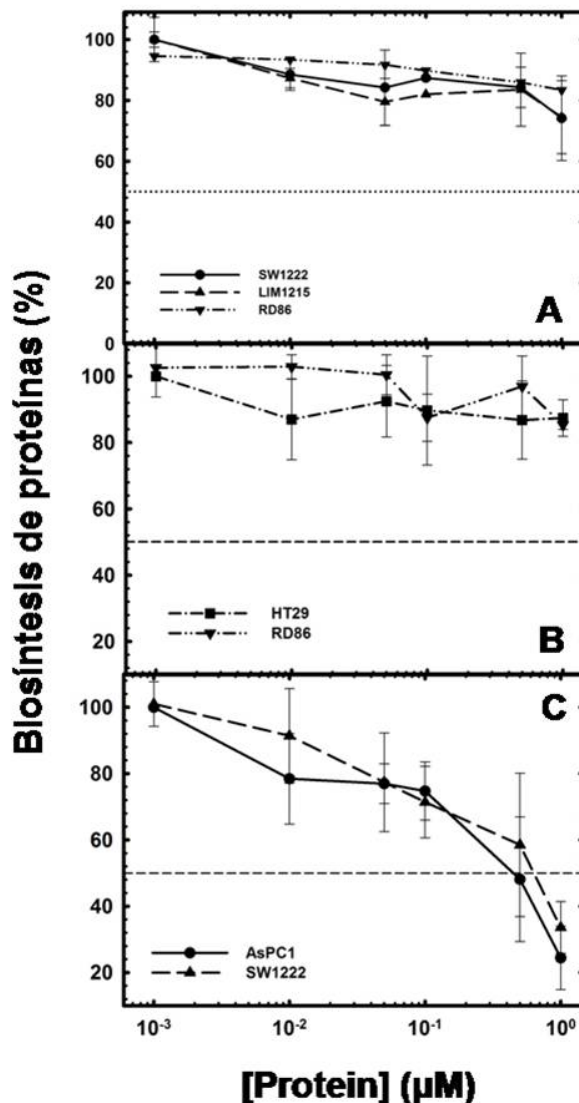


**Fig.37:** Ensayo de actividad ribonucleolítica específica sobre reticulocitos realizado con Hta3ΔW e IMTXA33HtA3ΔW. La flecha señala la posición correspondiente al fragmento α, característico de la actividad ribonucleolítica sobre el SRL. Para el ensayo se utilizaron 6 y 12 pmoles de Hirsutelina, y 3, 6 y 12 pmol en el caso de la inmunotoxina. El carril marcado como C- corresponde al ensayo realizado en ausencia de proteína.

**1.4.4.3.- Ensayos de actividad conjunta de ambos dominios: citotoxicidad específica.**

Una vez comprobado que los dominios analizados independientemente son activos desde un punto de vista funcional, se estudió su acción conjunta mediante la determinación de su actividad citotóxica específica frente a las células diana. En este sentido, conviene recordar la hipótesis inicial de trabajo con estas inmunotoxinas, que sugería una optimización de la actividad observada para las otras dos construcciones, a saber: eficacia citotóxica de la IMTXA33αS y especificidad de acción como la

IMTXA33T1. Para ello se utilizó el ensayo de incorporación de leucina tritiada como medida de su acción citotóxica “*in vitro*”.



**Figura 38:** (A) Ensayo de citotoxicidad de HtA3ΔW libre con células SW1222, LIM1215 y RD86, mediante incorporación de Leu-<sup>3</sup>H. La línea de puntos marca el 50% de viabilidad del cultivo. Los cultivos fueron incubados con diferentes concentraciones de proteína durante 72 h. (B) Ensayo de citotoxicidad de IMTXA33HtA3ΔW con líneas celulares antígeno-negativas HT29 y RD86. Las células se incubaron durante 72 h y (C) en este caso con las líneas antígeno-positivas AsPC1 y SW1222. La línea punteada marca el 50 % de viabilidad del cultivo.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 38**, observándose una absoluta especificidad de acción sobre las células diana, tanto con las SW1222 como con las LIM1215, pudiéndose calcular una IC<sub>50</sub> en torno a 0.5 µM.

Si bien, los resultados obtenidos sobre las células antígeno-negativas son los esperados, ya que la IMTXA33HtA3ΔW no exhibe citotoxicidad inespecífica significativa sobre ellas, sin embargo la eficacia citotóxica, en términos de IC<sub>50</sub>, sobre las células diana a pesar de ser positiva no era la esperada. En este sentido, el resultado obtenido sería más parecido a lo obtenido con la IMTXA33T1 que lo obtenido con IMTXA33αS. Este hecho será objeto de estudio y discusión más adelante.

## BLOQUE 2

### ESTUDIO DE LAS RUTAS INTRACELULARES DE PROCESAMIENTO DE LAS INMUNOTOXINAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

#### “UNA IMAGEN VALE MÁS QUE MIL PALABRAS”

##### ¿Por qué los estudios de *trafficking*?

En la Introducción de la presente Tesis se dedica un apartado a las posibles rutas de internación de las inmunotoxinas. Asimismo, en esta introducción se recalca que estas vías, lejos de ser algo anecdótico o accesorio en la eficacia de las inmunotoxinas, son un punto clave en cuanto a la mayor o menor efectividad citotóxica de éstas.

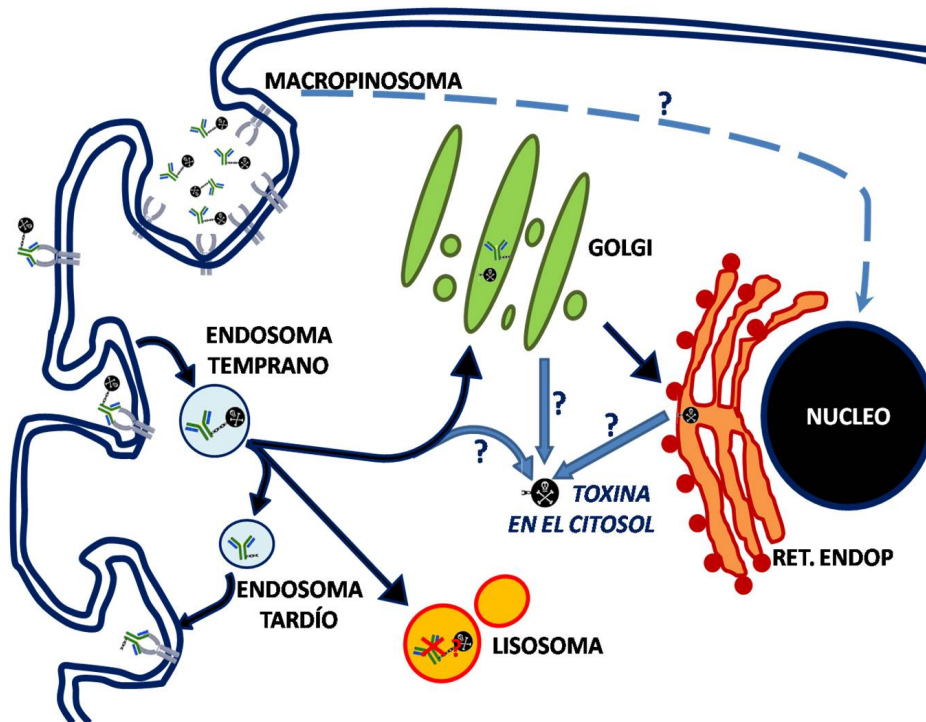
En cuanto a las inmunotoxinas recién descritas, si bien en todas se ha comprobado que la unión se da por igual, y que los dominios variables dirigen la actividad del dominio tóxico hacia las células diana, también se ha visto una eficacia muy distinta en cuanto a su citotoxicidad específica. Esto plantearía dos posibilidades para tratar de explicar estas diferencias. Por un lado las ribotoxinas, la  $\alpha$ -sarcina y la Hta3 $\Delta$ W presentan una actividad ribonucleolítica específica con una elevada eficacia catalítica sobre su sustrato, el ribosoma, que además resulta ser letal para la viabilidad celular, mientras que en el caso de la RNasa T1, al ser su actividad inespecífica, parece lógico pensar que se requeriría más tiempo o más cantidad de RNasa para ejercer una actividad igual de letal. Así podemos imaginar que al entrar una molécula de  $\alpha$ -sarcina, o una de Hta3 $\Delta$ W o una de RNasa T1 en la célula, las dos primeras serían más letales y eficaces a la hora de producir la muerte celular. Según este razonamiento, las diferencias observadas entre la construcción basada en la RNasa T1 y las dos ribotoxinas quedarían *a priori* explicadas. Sin embargo, hay un dato que no se puede perder de vista, y es que la eficacia de las dos inmunotoxinas basadas en estas ribotoxinas no es la misma. De hecho la IMTXA33 $\alpha$ S presenta una IC<sub>50</sub> diez veces menor que la IMTXA33Hta3 $\Delta$ W. ¿Cómo es esto posible según lo razonado anteriormente?

Esto nos llevaría al segundo planteamiento, que no es para nada excluyente con el anterior, y es que no hay que olvidar que la hirsutelina que hemos utilizado en la construcción de la inmunotoxina es una variante no citotóxica, en el que se ha eliminado la capacidad de la HtA para interactuar con membranas, capacidad que si tiene la  $\alpha$ -sarcina. Siguiendo el mismo ejemplo de antes, si suponemos una molécula de IMTXA33 $\alpha$ S y una de IMTXA33Hta3 $\Delta$ W en la célula, podemos imaginar los siguientes pasos: los dominios variables reconocen y se unen a su antígeno produciéndose la internación del complejo inmunotoxina-antígeno. Bien mediante la vía endosomas tardíos-lisosomas o endosomas-golgi, en algún momento se produciría la liberación de la toxina.

Así, la  $\alpha$ -sarcina libre podría interactuar con la membrana del orgánulo subcelular y traslocarse al citosol donde ejercerá su actividad letal; mientras que la Hta3 $\Delta$ W, que tiene truncada esta capacidad, necesita de la maquinaria celular para poder traslocarse al citosol. Esta maquinaria actuará por igual para ambas toxinas, pero la  $\alpha$ -sarcina podría traslocarse al citosol gracias también a su capacidad intrínseca para interactuar con membranas.

Este planteamiento intentaría explicar las diferencias en cuanto a la eficacia de las inmunotoxinas, de manera que la  $\alpha$ -sarcina sería la más eficaz por ser la más “rápida” en alcanzar el citosol celular, ejerciéndose su actividad específica frente al ribosoma. En el caso de la hirsutelina triple mutante y la RNasa T1, ambas necesitaran de la maquinaria celular para ser trasladadas al citosol, aunque una vez estén en él, la Hta3 $\Delta$ W sería más eficaz que la RNasa T1, considerando las diferencias en la especificidad de su actividad ribonucleolítica.

Por tanto, parece razonable estudiar las posibles vías de internación y rutas intracelulares que seguirían las inmunotoxinas construidas, considerando por un lado la influencia de los dominios variables A33 y por otro lado las características de nuestras ribonucleasas. Estas posibles vías aparecen reflejadas en la figura 39.



**Figura 39:** Esquema de múltiples rutas intracelulares. Se muestran las distintas vías que puede seguir una inmunotoxina una vez alcanzado el interior celular hasta la liberación de la toxina en el citosol.

Así, nos planteamos estudiar la ruta seguida por nuestras inmunotoxinas con el fin de comprobar si la diferente eficacia de las mismas se debe a la primera hipótesis expuesta, a la segunda, o, lo más probable, a las dos simultáneamente.

Por ello, en este bloque vamos a utilizar técnicas de inmunofluorescencia junto con microscopía confocal de fluorescencia como la herramienta que nos permita observar, en cierta medida, “donde” están nuestras inmunotoxinas, y poder dibujar un mapa de su “viaje” por el interior celular una vez que reconocen y se unen al antígeno GPA33. Para ello se ha utilizado una amplia batería de marcadores tanto de membrana celular, lisosomas, endosomas, como de anticuerpos secundarios y terciarios marcados con fluoróforos.

### 2.1.- Obtención y caracterización de inmunotoxinas marcadas.

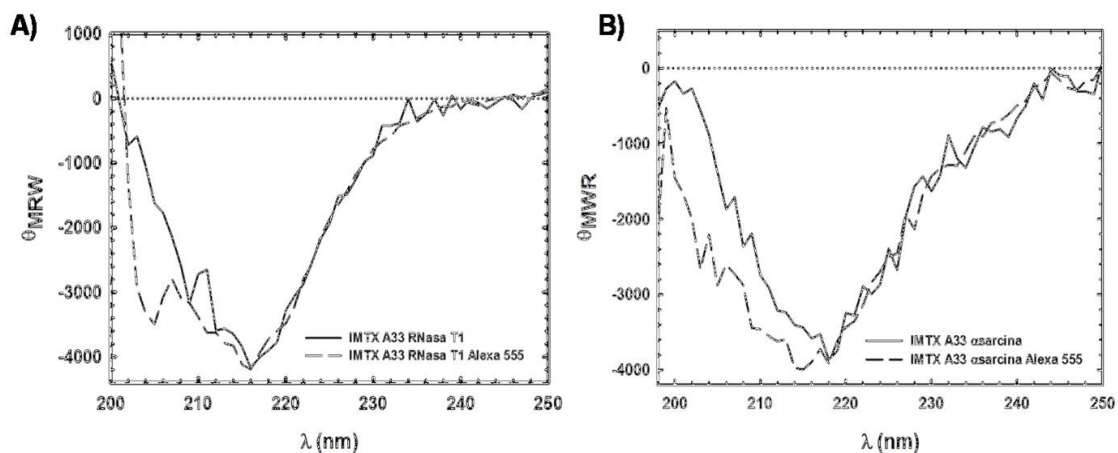
Los ensayos de inmunofluorescencia implican la visualización de las diferentes proteínas estudiadas o de los distintos componentes celulares mediante fluoróforos unidos directamente a las moléculas de interés o bien a través de la utilización de anticuerpos primarios o secundarios marcados. La utilización de estas últimas podría ser responsable en muchos casos de la aparición de una señal de fondo de origen inespecífico, por lo que el marcaje directo de las inmunotoxinas podría reducir este posible inconveniente.

Sin embargo, el marcaje directo de las inmunotoxinas podría implicar una alteración de su funcionalidad ya que este marcaje se produce en aminoácidos básicos, normalmente lisina, que puede ser importante en la función. En este sentido se comprobó que en las regiones determinantes de complementariedad (CDR's) de los dominios variables, scFvA33, no existen lisinas, por lo que previsiblemente no debería verse afectada la capacidad de unión al antígeno (King *et al.*, 1995).

Por otro lado se adaptaron las condiciones del marcaje a la estabilidad de las inmunotoxinas en función del pH, ya que la  $\alpha$ -sarcina y la HtA se desnaturalizan a partir de valores de pH alrededor de 9 (Herrero-Galán *et al.*, 2008).

Se llevaron a cabo marcajes de las inmunotoxinas con distintos fluoróforos como FITC o Alexa 555, de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez confirmado el marcaje de las inmunotoxinas mediante espectroscopía, se llevó a cabo la caracterización estructural y funcional de estas, para asegurar que su actividad no se había visto comprometida por dicho marcaje.

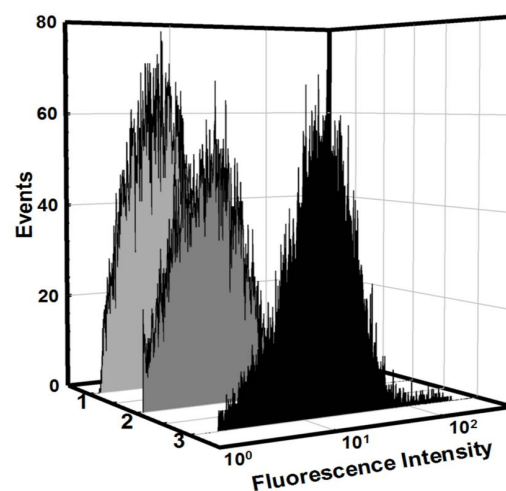
Inicialmente se llevó a cabo la caracterización estructural mediante el registro del espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano. Los espectros obtenidos se compararon con los de proteína sin marcar para estudiar la presencia de cambios importantes en el plegamiento de la proteína, que afectarían a la estructura secundaria. En la **Figura 40** se muestran los espectros obtenidos para las inmunotoxinas basadas en la  $\alpha$ -sarcina y en la RNasa T1. El resultado mostró que ambas inmunotoxinas conservaban su plegamiento tras el marcaje.



**Figura 40:** Espectros de dicroísmo en el UV-lejano obtenidos para la IMTXA33 $\alpha$ S marcada con Alexa 555 y sin marcar (A); y para la IMTXA33T1 marcada con Alexa 555 y sin marcar (B).

Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo para comprobar si los dominios variables mantenían su capacidad de reconocer y unirse al antígeno. La citometría se llevó a cabo con IMTXA33T1 marcada con Alexa 555 y células SW1222 antígeno-positivas. El resultado se muestra en la **Figura 41**. Según lo observado la IMTXA33T1-Alexa555 mantiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno. Este hecho es importante ya que el caso de la IMTXA33T1 prácticamente todo el marcaje se realiza en los dominios variables, ya que la RNasa T1 prácticamente no tiene lisinas. Por tanto se aseguró la funcionalidad del dominio marcador, imprescindible para llevar a cabo los estudios de inmunofluorescencia.

La diferencia en cuanto al número de lisinas presentes en el dominio tóxico, mucho más abundantes en la sarcina, y la diferencia de estabilidad con el pH, resulto en diferentes eficacias de marcaje, que se considera a la hora de obtener e interpretar las imágenes de inmunofluorescencia.



**Figura 41:** Citometría de flujo realizada con IMTXA33T1-Alexa 555. (1) Células control, (2) células incubadas con antiHistag-488 y (3) células incubadas con IMTXA33T1-Alexa 555 y el antiHistag-488. El citómetro no dispone de filtro para el Alexa-555, lo que requería utilizar un antihistag-Alexa 488.

## 2.2.- Estudio de la unión y rutas intracelulares

El estudio de las rutas seguidas por las inmunotoxinas para llevar a cabo su efecto citotóxico implicó la incubación de éstas con células SW1222 antígeno-positivas a diferentes tiempos de incubación, para tratar de visualizar, en la medida de lo posible, las diferentes etapas de su procesamiento y actividad.

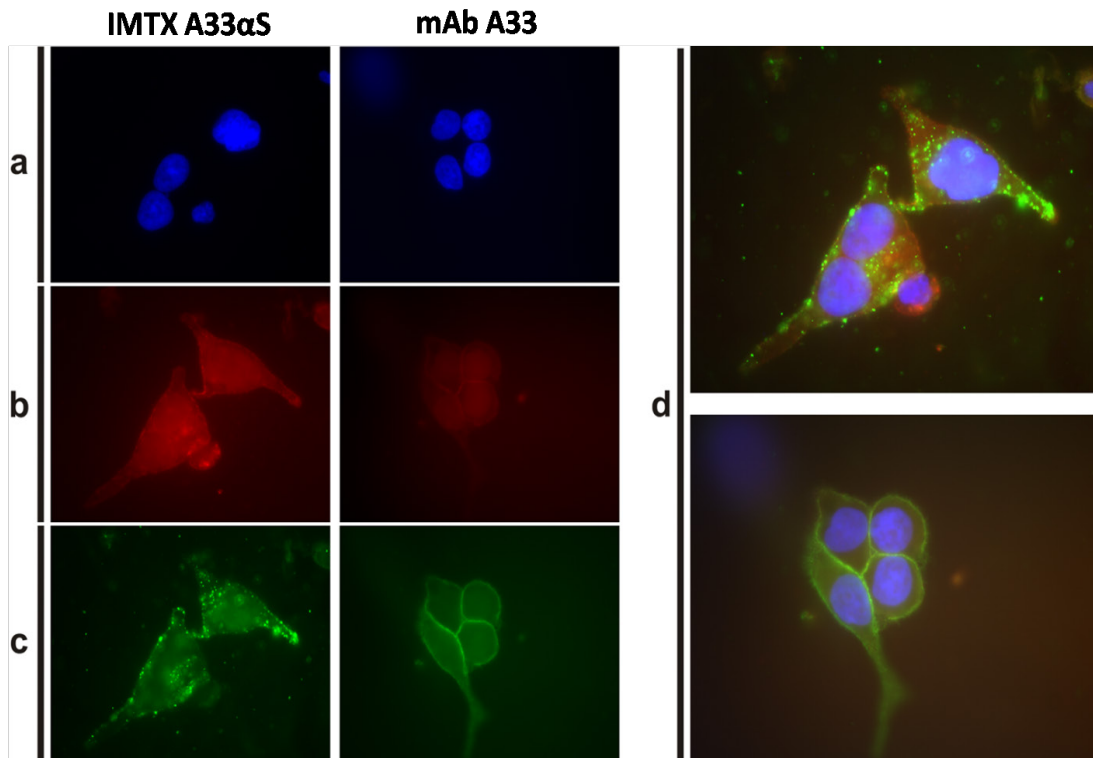
Así, en todos los casos, se trató de comprobar la unión e internación de las inmunotoxinas mediante inmunofluorescencia en microscopia confocal. Además, para visualizar las rutas intracelulares, y en combinación con los tiempos de incubación se utilizaron marcadores específicos de orgánulos celulares, como endosomas tempranos, lisosomas o Golgi.

### 2.2.1.- IMTX A33 $\alpha$ sarcina-Alexa 555 (IMTXA33 $\alpha$ S-555)

#### a) Unión e internación

La caracterización funcional del dominio marcador de las inmunotoxinas se llevó a cabo entre otros métodos, mediante citometría de flujo, comprobándose la unión específica de estas a las células antígeno-positivas. Por ello, en este bloque solo se muestra la caracterización y seguimiento de las inmunotoxinas con las células SW1222.

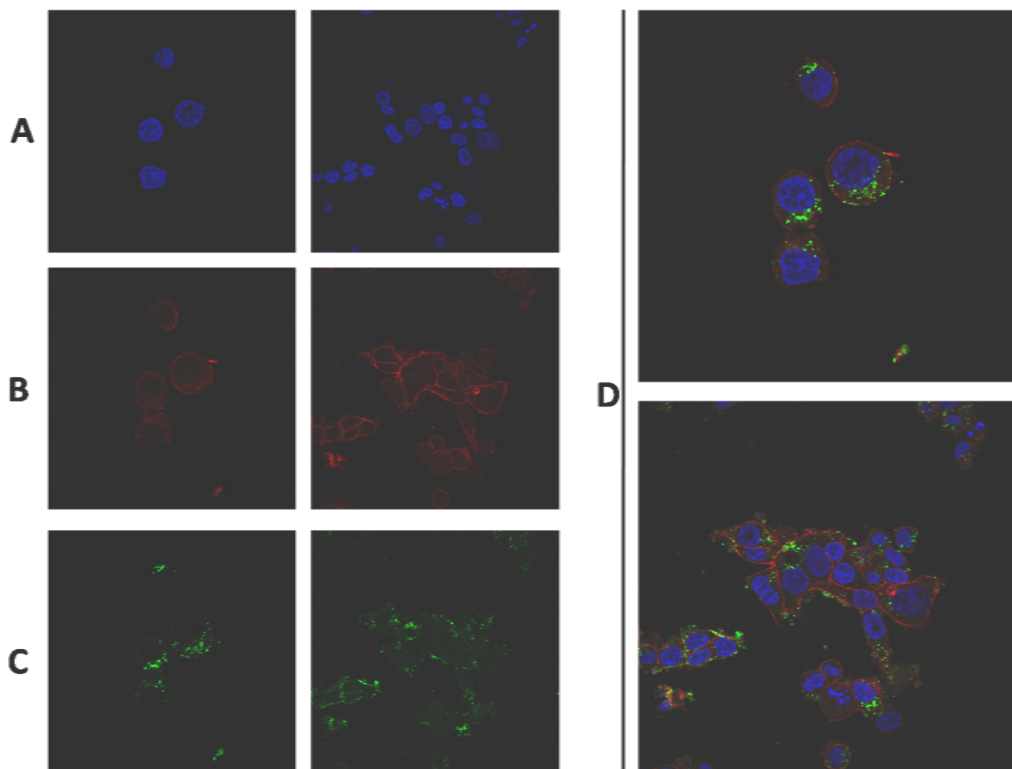
En primer lugar se realizaron ensayos de unión mediante 1 h de incubación de SW1222 con IMTXA33 $\alpha$ S marcada con Alexa 555. Como se observa en la **Figura 42**, donde también se marca el núcleo y la membrana celulares, la IMTXA33 $\alpha$ S se une a las células SW1222 apareciendo distribuida no sólo en la membrana, sino que también parece observarse la internación de la misma. Esta distribución es significativamente diferente a la observada con el mAbA33, utilizado como control de unión, que aparece localizado casi exclusivamente en la membrana celular. Este hecho es coherente con lo descrito en la bibliografía, y ya comentado en la introducción de esta Memoria.



**Figura 42:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células SW1222 incubadas con IMTXA33αS-555 a 25 µg/ml durante 1 h para visualizar la unión de proteína a la membrana celular. Se utilizó mAbA33 como control. (a) Tinción de núcleos con DAPI, (b) tinción de membranas utilizando antiCD44 y GAM-Alexa 647, (c) fluorescencia correspondiente a la IMTXA33αS-555. (d) imágenes correspondientes a la mezcla de los tres canales.

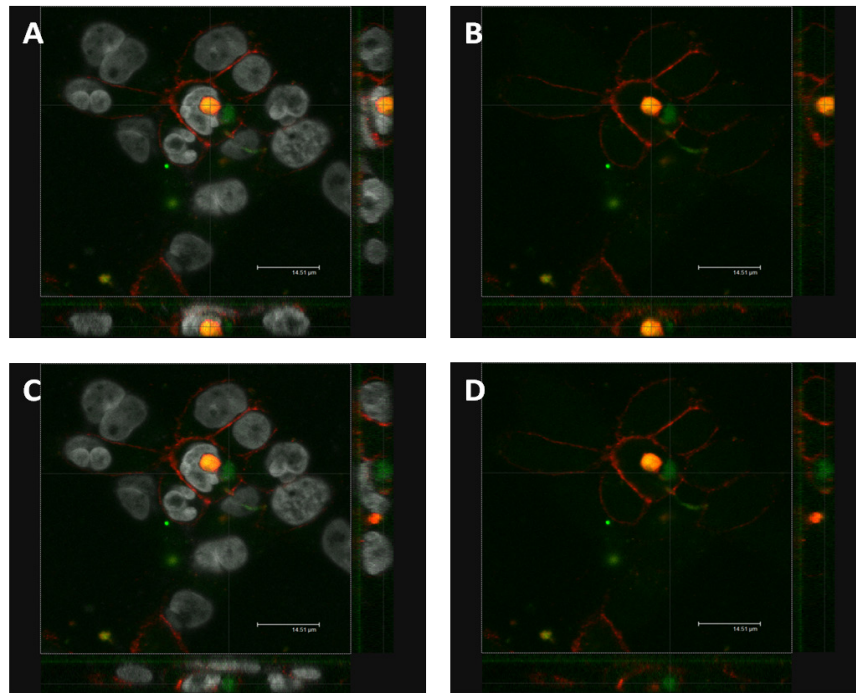
Para comprobar la internación de la inmunotoxina se aumentó el tiempo de incubación y se obtuvieron imágenes por microscopía confocal de inmunofluorescencia. Los cortes que se muestran en las figuras corresponden en la mayor parte de los casos al plano medio de la célula. De este modo se asegura que estamos en el interior celular, y que lo que se observa es representativo.

En la figura 43 se observa la localización intracelular de la inmunotoxina en las células SW1222 tras incubación 24 h. Así, la IMTXA33αS una vez que reconoce y se une al antígeno GPA33 se interna en la célula como era de esperar.



**Figura 43:** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. Las imágenes fueron tomadas con células tratadas en las mismas condiciones que las mostradas en la figura 42 pero 24 h de incubación. Los marcajes son idénticos a los utilizados en la figura 42.

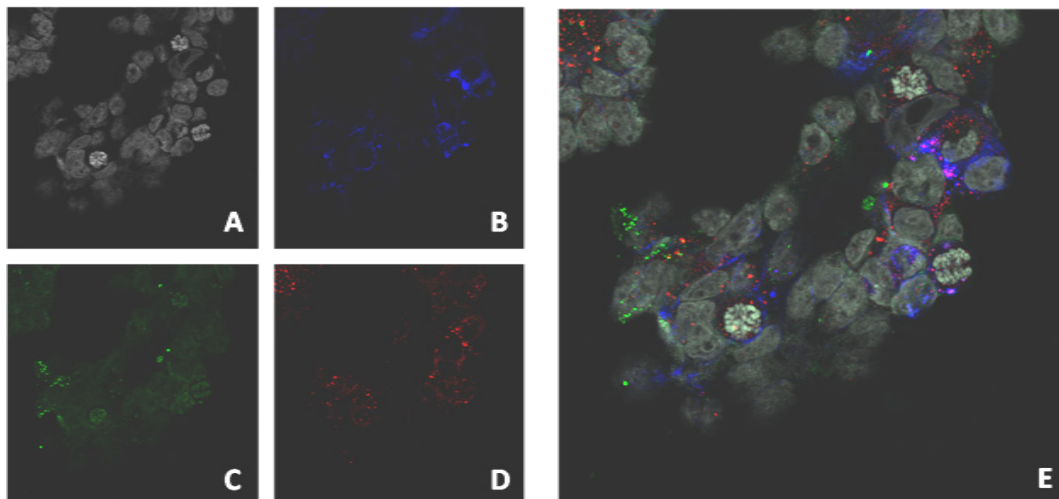
Si bien, como se ha comentado en la Introducción, no se conoce con certeza el papel del antígeno GPA33, así como su vía de internación, sí que se ha descrito que una de las posibles vías de internación sería mediante macropinosomas (Daghighian *et al.*, 2007). Estos macropinosomas son vesículas de gran tamaño que transportan contenido del exterior celular hasta localizarse en la proximidad del núcleo celular. En el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S, parece que podría ser una de las vías de internación, tal y como se observa en las imágenes mostradas en la **Figura 44**. En ellas se muestra una vesícula de gran tamaño conteniendo la inmunotoxina. Esta localización de la IMTXA33 $\alpha$ S en macropinosomas se repitió en algunos de los ensayos realizados, si bien no parecería ser la ruta intracelular más utilizada. De hecho, como se comentará posteriormente, este tipo de vesículas no aparecen con las otras construcciones.



**Figura 44:** Microscopía confocal de células SW1222 incubadas con IMTXA33 $\alpha$ S-555 durante 4 h. Se mantiene el marcaje de las figuras anteriores. En las figuras A y B se observa la imagen y las proyecciones en los ejes X e Y de una vesícula de gran tamaño. En las figuras C y D se representan las mismas proyecciones de otra zona para ver las diferencias en cuanto a la colocalización con el marcaje de membrana. Las figuras A y C muestran los núcleos para obtener una mejor idea de la localización de la vesícula.

## b) Localización intracelular

Para poder determinar las posibles vías de internación de la inmunotoxina, aparte de los macropinosomas observados, se decidió hacer ensayos marcando otras vías de entrada. Una de las vías de entrada más comunes implica la formación de endosomas a partir de la internación del complejo antígeno-anticuerpo. En los endosomas tempranos se encuentra el antígeno-1, EEA-1 (*Early Endosome Antigen 1*, de sus siglas en inglés) (Lawe *et al.*, 2002), ampliamente utilizado en microscopía para estudios de trafficking. Por ello, se utilizó un anticuerpo que reconoce esta proteína para marcar los endosomas tempranos y hacer estudios de colocalización con la inmunotoxina. Los ensayos se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos, con un tiempo de incubación de 2 h. Las imágenes obtenidas, mostradas en la **Figura 45**, mostraron una colocalización parcial de la IMTXA33 $\alpha$ S con endosomas tempranos. Este resultado, unido a lo comentado anteriormente sobre los macropinosomas, sugiere la posibilidad de la existencia de varias vías de entrada.



**Figura 45:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas durante 2 h con IMTXA33 $\alpha$ S- 555. A) Marcaje de núcleos con DAPI, B) marcaje de membrana con antiCD44 y GAM-Alexa 647, C) Marcaje de endosomas tempranos con antiEEA1 y GAR-Alexa 488 y D) IMTXA33 $\alpha$ S-555. La imagen E corresponde con la mezcla de los cuatro canales anteriores.

Independientemente de estas vías de internación, el procesamiento de la inmunotoxina una vez localizada en endosomas puede dirigirse hacia la formación de lisosomas, o bien hacia la vía del Golgi.

Para estudiar y discriminar entre estas posibilidades se utilizaron marcadores para ambos compartimentos celulares. Como marcador del lisosoma se utilizó una sonda (LysoTracker, Invitrogen) que fluoresce al encontrarse en un medio muy ácido (por debajo de pH 4), por lo que su fluorescencia será producida si esta se encuentra en endosomas tardíos-lisosomas. Para marcar el golgi se utilizó una lectina (marcada con Alexa 647) que reconoce ácido siálico, muy abundante en la membrana del golgi, aunque no exclusivo de ésta (Zhao *et al.*, 2006)

Estos ensayos implican cuatro marcadores, con sus correspondientes espectros de emisión y excitación: el DAPI (marcador de núcleo), LysoTracker (marcador de lisosomas), y Alexa 555 (unido a la inmunotoxina) y del fluoróforo unido al marcador de Golgi, por lo que nos pareció que el utilizar un marcador de membrana podía producir ciertas ambigüedades en la interpretación de los resultados, al no disponer de un fluoróforo fuera del intervalo de longitudes de onda, ya copado por los fluoróforos recién comentados. Por ello, se decidió que en primer lugar se obtendría una imagen mediante luz transmitida para delimitar donde se encuentra la membrana celular y a partir de ella se obtendrían las distintas imágenes para estudiar la posible colocalización de la

inmunotoxina con estos orgánulos. Estos ensayos se realizaron con dos tiempos de incubación diferentes, 2 y 16 h, para tratar de obtener información en dos situaciones bien diferenciadas. Por un lado, un tiempo corto similar al utilizado en el marcaje de endosomas tempranos, y por otro, un tiempo de incubación largo que ya daría cuenta de las etapas finales de la actividad citotóxica de las inmunotoxinas.

Las imágenes obtenidas (**Figura 46**) muestran colocalización parcial de la inmunotoxina y el Golgi. Sin embargo, esta colocalización es inexistente cuando se analizó el marcaje con los lisosomas. Esto parece indicar que la IMTXA33 $\alpha$ S seguiría una vía de entrada que implica una ruta endosoma-Golgi, mayoritariamente. Este resultado es interesante, ya que esta vía se ha descrito como la más eficaz en la actividad citotóxica de inmunotoxinas (Jansen *et al.*, 1992).

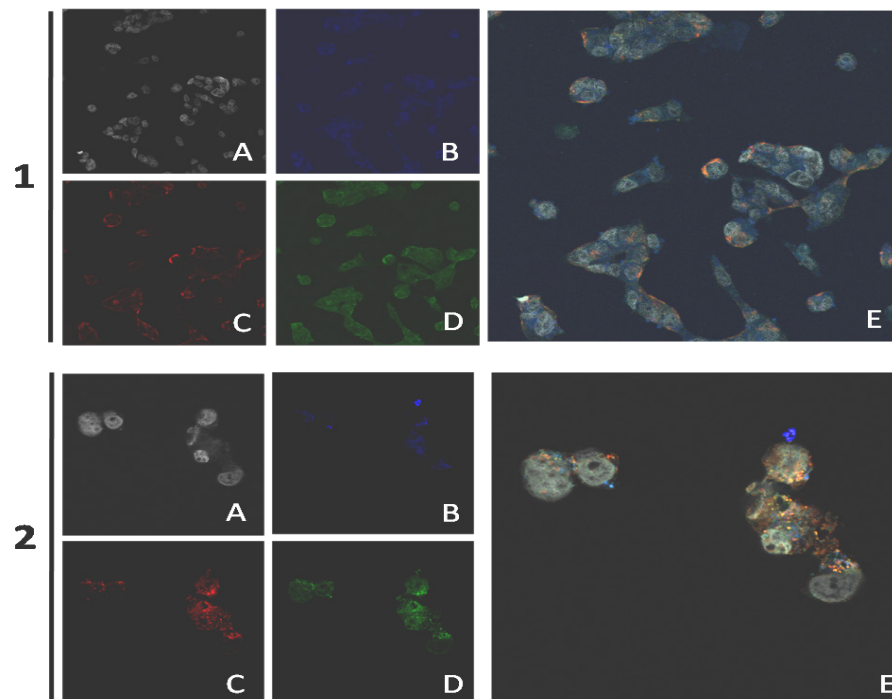


Fig.46: Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas durante 2 h (1) y 16 h (2) con IMTXA33 $\alpha$ S-555. A) Marcaje de núcleos con DAPI, b) Marcaje de lisosomas con Lysotracker, c) Marcaje de Golgi con aglutinina y D) IMTXA33 $\alpha$ S-555. E) Corresponde con la mezcla de los cuatro canales anteriores.

Recopilando la información obtenida a través de las imágenes de inmunofluorescencia para la IMTXA33 $\alpha$ S, parece que esta inmunotoxina puede seguir, al menos, dos vías de entrada, bien mediante la formación de macropinosomas o bien mediante la formación de endosomas, siendo estas vías no excluyentes entre sí, y no necesariamente por ello las únicas existentes. Una vez en el interior celular, la ruta

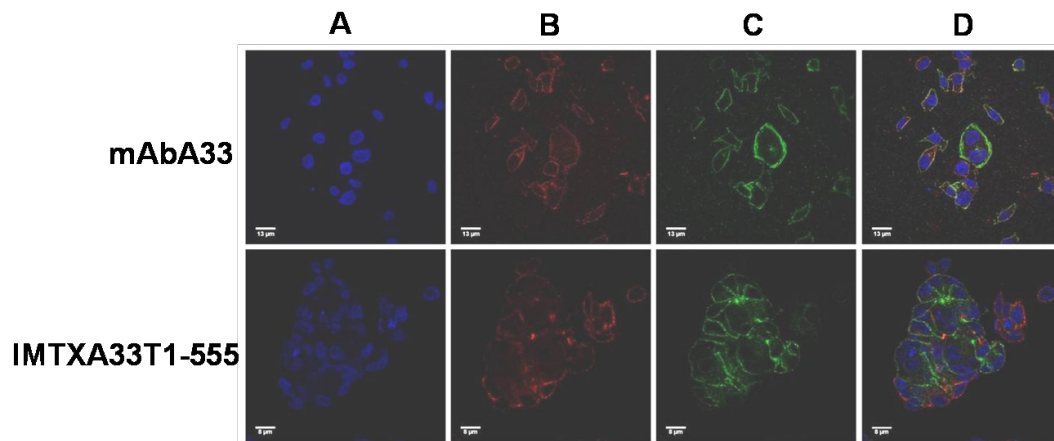
principal implicaría su paso por el aparato de Golgi, no viéndose una localización en lisosomas. Es de suponer que en este punto se produciría la liberación de la toxina al citosol donde ejercería su acción ribonucleolítica. Cabe destacar que a tiempos largos la inmunotoxina parece encontrarse en regiones perinucleares, lo cual puede estar correlacionado con el hecho de que su sustrato, el ribosoma, se encuentre en mayor concentración en dicha localización celular.

## 2.2.2.- InmunoRNasaA33 T1-Alexa 555 (IMTXA33T1-555)

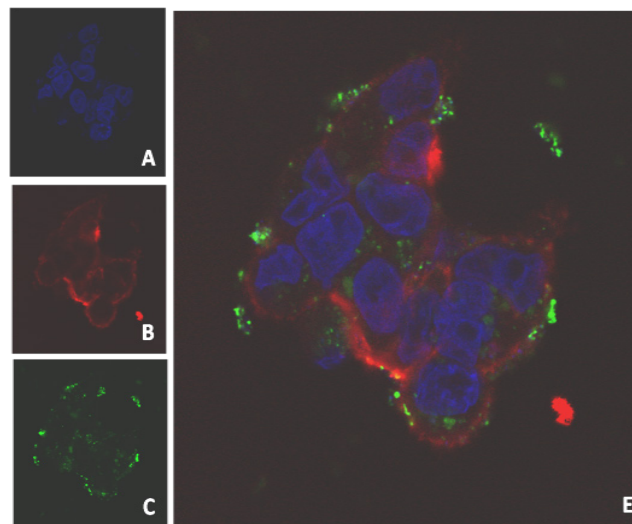
### a) Unión e internación

Siguiendo la misma metodología que con la IMTXA33 $\alpha$ S, la IMTXA33T1 también se marcó con Alexa 555. La diferencia existente en cuanto al número de lisinas presentes en ambas inmunotoxinas debido al dominio toxico es muy grande, ya que mientras que la  $\alpha$ -sarcina presenta 20 lisinas en su secuencia, la RNasa T1 presenta únicamente 2. Este hecho no solo repercute en un menor marcaje en el caso de la inmunoRNasa T1, sino que podría ser interesante a tiempo largo, para, una vez liberada la toxina, observar un patrón diferente para cada dominio, y diferente al obtenido con al IMTXA33 $\alpha$ S-555, utilizando para ello anticuerpos secundarios marcados.

Al igual que en al caso anterior los primeros ensayos realizados consistieron en ensayos de unión e internación, a tiempos cortos y largos para comprobar que la inmunorribonucleasa reconocía y se unía al antígeno GPA33 y su posterior internación en las células. Las imágenes obtenidas (**Figuras 47 y 48**) muestran la localización, principalmente en membrana, de la inmunoRNasaT1-Alexa 555 en incubaciones a tiempos cortos. Así, en este caso se apreció que el marcaje a tiempo largo también parecía verse con más intensidad en la membrana que en el interior celular a diferencia de lo observado con la IMTXA33 $\alpha$ S. Esto podría estar relacionado con lo explicado anteriormente en cuanto al número de lisinas susceptibles de marcaje en la RNasa T1 frente a los dominios variables, lo que disminuiría la intensidad del marcaje en la RNasa T1 libre.



**Figura 47:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas durante 1 hora con mAbA33 o IMTXA33T1-555. El mAbA33 fue utilizado como control. (A) Tinción de núcleos con DAPI, (B) tinción de membranas utilizando antiCD44 y GAM-Alexa 647, (C) fluorescencia correspondiente a la IMTXA33T1-555. (D) imágenes correspondientes a la mezcla de los tres canales.

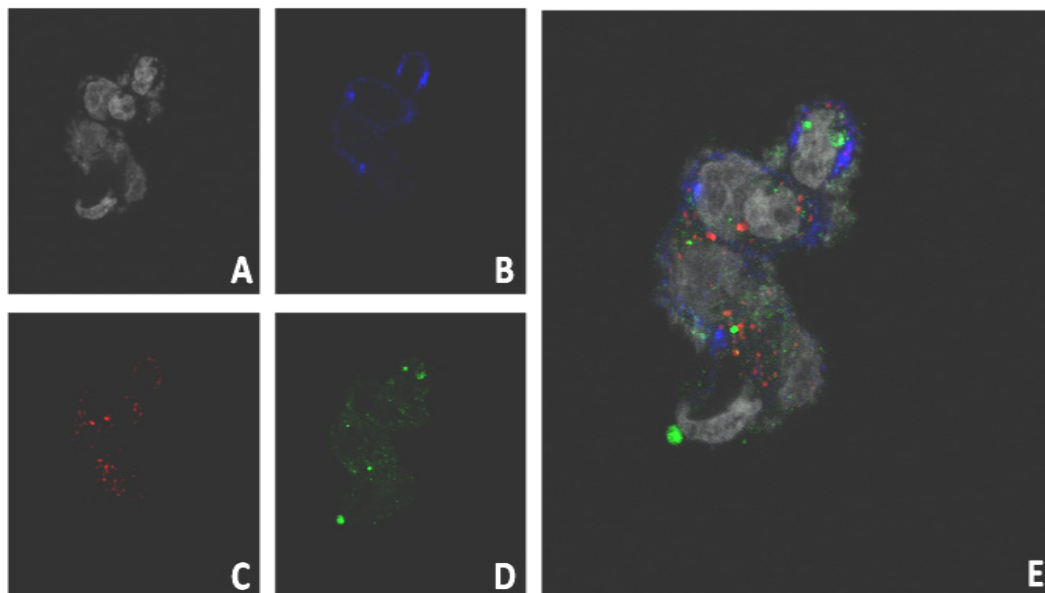


**Figura 48:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas con IMTXA33T1-555 durante 24 h. La distribución de paneles y marcajes es similar a la descrita en la figura anterior.

### b) localización intracelular

Al igual que en el caso anterior, para los estudios de la ruta intracelular seguida por la IMTXA33T1, llevamos a cabo estudios de colocalización con endosomas tempranos. El ensayo se realizó en las mismas condiciones que con la IMTXA33 $\alpha$ S-555.

Las imágenes obtenidas, mostraron colocalización parcial de la inmunoRNasa en los endosomas tempranos (**Figura 49**). Sin embargo, en este caso, en ninguno de los ensayos realizados, se observó la aparición de vesículas de gran tamaño, tipo macropinosomas, como se vieron con la IMTXA33 $\alpha$ S-555.

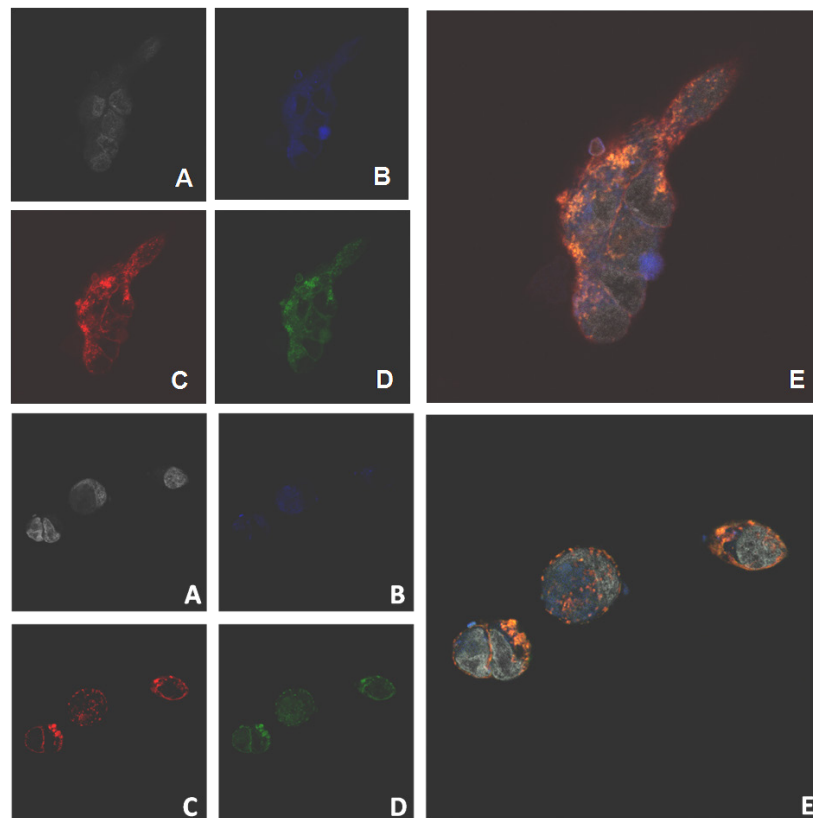


**Figura 49:** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células SW1222 incubadas durante 2 h con la IMTXA33T1-555. A) Marcaje de núcleos con DAPI, B) Marcaje de membrana con antiCD44 y GAM-Alexa 647, C) Marcaje de endosomas tempranos con antiEEA1 y GAR-Alexa 488 y D) IMTXA33T1-555. E) Mezcla de los cuatro canales anteriores.

El seguimiento de la ruta intracelular utilizada a partir de la localización de la IMTXA33T1 en los endosomas tempranos, mostró en este caso diferencias significativas respecto a lo observado con la inmunotoxina basada en la  $\alpha$ -sarcina. Así, y utilizando los mismos marcadores, y las mismas condiciones de ensayo se estudió la presencia de IMTXA33T1 en lisosomas y Golgi.

Las imágenes obtenidas (**Figura 50**), mostraron una colocación de la inmunotoxina tanto con los lisosomas como con el Golgi, de lo que daría cuenta la aparición de un color azul claro o amarillo, respectivamente. La IMTXA33T1, especialmente a tiempo largo, aparece mayoritariamente en Golgi, con un marcaje más intenso que el que se observó para la IMTXA33 $\alpha$ S, lo que podría implicar que la RNasa T1 permaneciese confinada en el Golgi sin acceder al citosol.

Por otro lado, y aunque con menor intensidad, se apreció colocalización en los lisosomas.

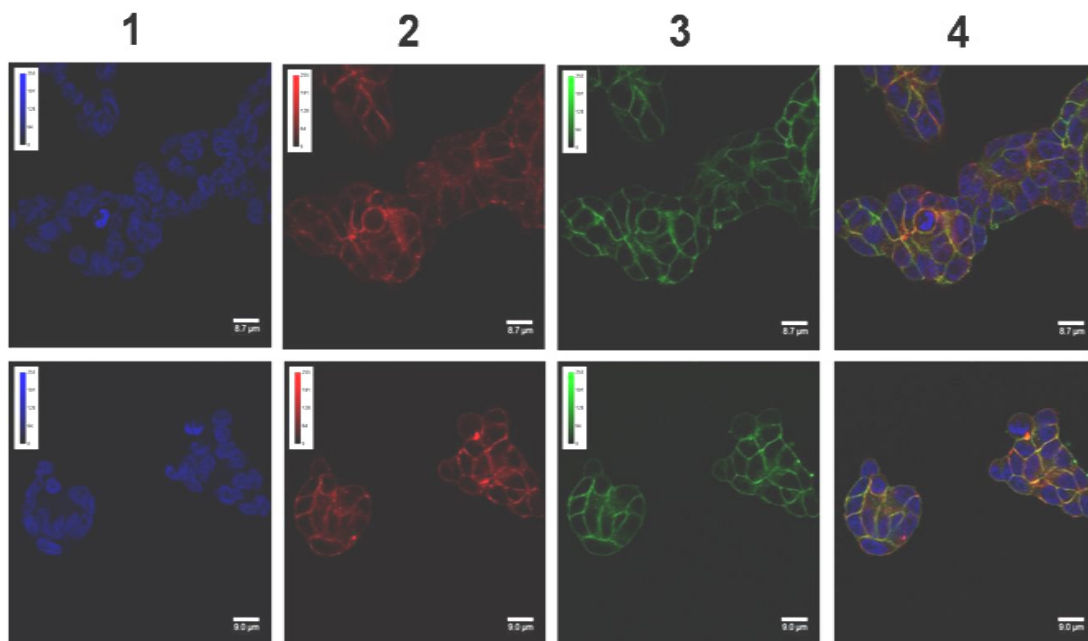


**Figura 50:** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células SW1222 incubadas durante 2h (1) y 16 h (2) con IMTXA33T1-555. A) Marcaje de núcleos con DAPI, B) Marcaje de lisosomas con Lysotracker, C) Marcaje de Golgi con aglutinina y D) IMTXA33T1-555. La imagen E corresponde a la mezcla de los cuatro canales anteriores.

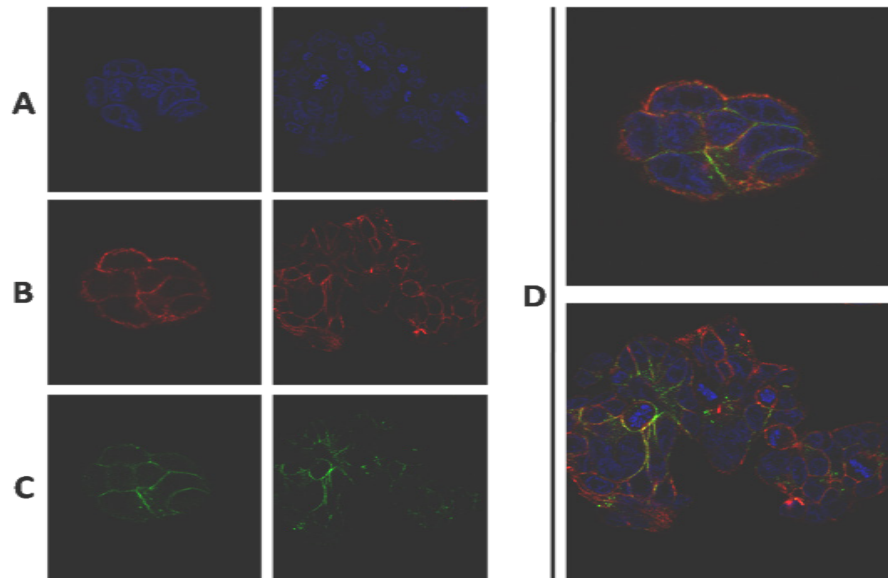
### 2.2.3.- IMTX A33 HtA 3ΔW-Alexa 555 (IMTXA33HtA3ΔW-555)

#### a) Unión e internación

Se siguieron los mismos pasos que con las otras dos construcciones, marcándose la inmunotoxina con Alexa-555 y llevando a cabo en primer lugar ensayos de unión e internación, en las mismas condiciones que los casos anteriores. A partir de las imágenes obtenidas (**Figuras 51 y 52**), se observó el reconocimiento y unión de la IMTXA33HtA3ΔW al antígeno GPA33 presente en la membrana de las células SW1222. Además, y al igual que sucedió con la IMTXA33T1, tras la incubación a 24 h con las células para analizar la internación, se observó que esta aparece principalmente localizada en la membrana, con una señal mucho menos intensa en el citosol. Este hecho podría deberse a una menor intensidad del marcaje debido al diferente número de lisinas presentes en la HtA respecto a la  $\alpha$ -sarcina. Sin embargo, parece más lógico pensar que la diferente distribución entre las inmunotoxinas basadas en las ribotoxinas podría deberse a la capacidad o no de interactuar con membranas.



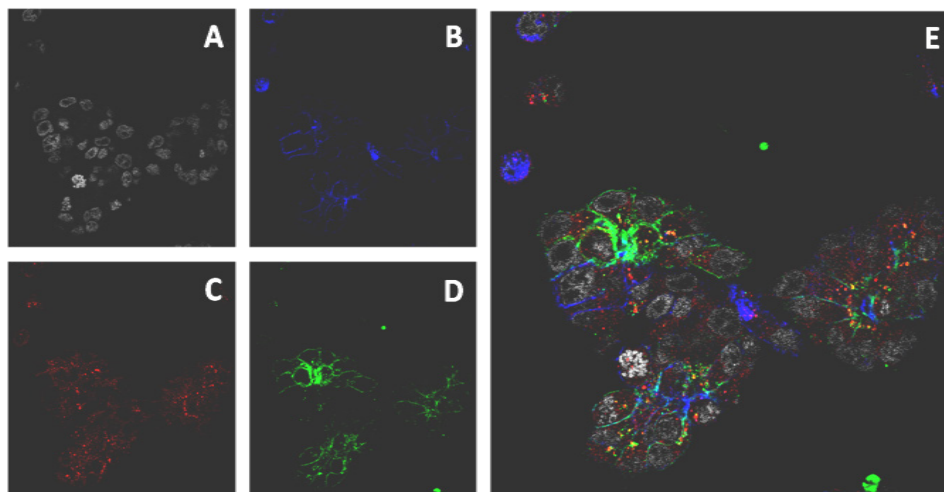
**Figura 51:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas con IMTXA33HtA3ΔW-555. (1) Tinción de núcleos con DAPI, (2) tinción de membranas utilizando antiCD44 y GAM-Alexa 647, (3) IMTXA33HtA3ΔW-555. (4) Imágenes correspondientes a la mezcla de los tres canales.



**Figura 52:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas con IMTXA33HtA3ΔW-555 durante 24 h. Los marcajes corresponden con los utilizados en la figura 51.

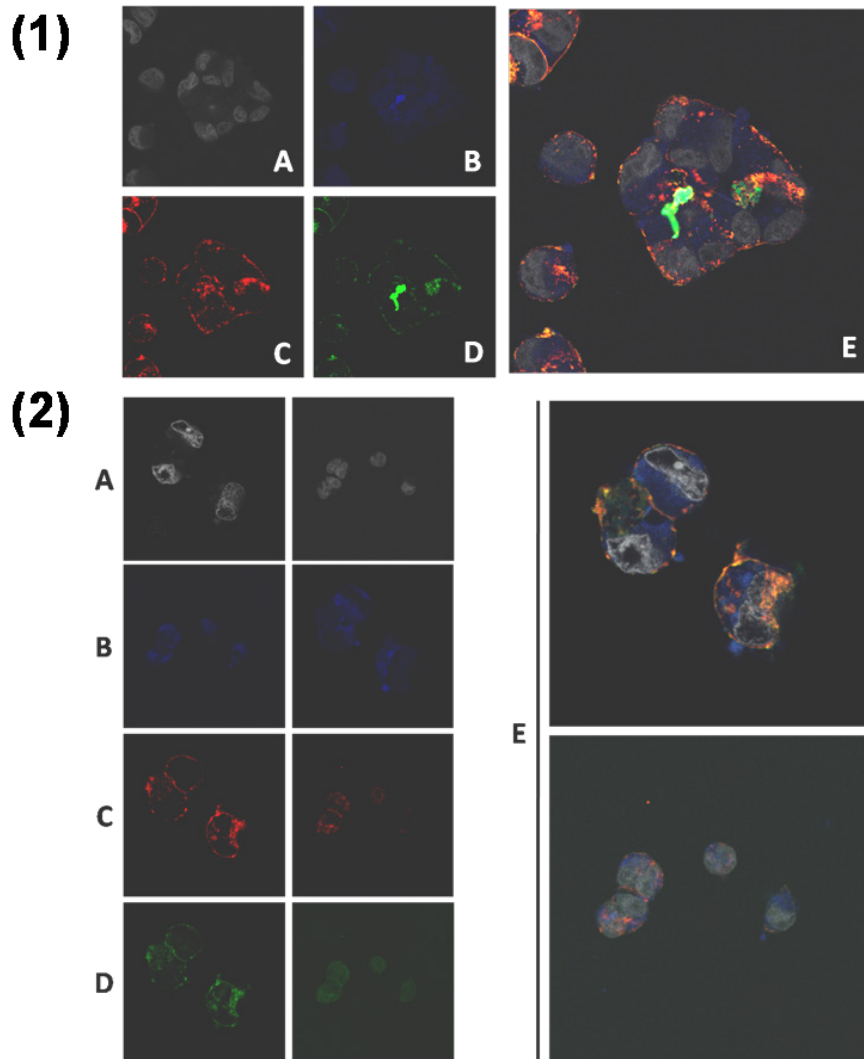
#### a) localización intracelular

En este sentido, los resultados obtenidos cuando se analizó el marcaje con endosomas, lisosomas y Golgi (**Figuras 53 y 54**) sugieren una distribución intracelular similar a la obtenida con la IMTXA33T1, más que a la de la IMTXA33αS. Así, en la figura 53 se observa la presencia de IMTXA33HtA3ΔW parcialmente localizada en endosomas tempranos.



**Fig.53:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas durante 2 hr con la IMTXA33HtA3ΔW-555. A) Marcaje de núcleos con DAPI, B) Marcaje de membrana con antiCD44 y GAM-Alexa 647, C) Marcaje de endosomas tempranos con antiEEA1 y GAR-Alexa 488 y D) IMTXA33HtA3ΔW555. E) Corresponde con la mezcla de los cuatro canales anteriores.

En el caso de los estudios de colocalización con lisosomas y Golgi, (**Figura 54**), se observó una mayor presencia de inmunotoxina en el golgi que en lisosomas. Nuevamente hay que destacar que, al igual que con la RNasa T1, esta colocalización en Golgi permanece a tiempo largo, lo que podría relacionarse con su incapacidad para interactuar con membranas, y por tanto de translocarse al citosol. Por otro lado la colocalización también en lisosomas es significativa, al menos a tiempos largos.



**Figura 54:** Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal de células SW1222 incubadas durante 2 h (1) y 16 h (2) con IMTXA33HtA3ΔW555. A) Marcaje de núcleos con DAPI, b) Marcaje de lisosomas con LysoTracker, c) Marcaje de Golgi con aglutinina y D) IMTXA33HtA3ΔW555. E) Corresponde con la mezcla de los cuatro canales anteriores.

Estos estudios nos sirvieron para concluir que la vía de entrada de las inmunotoxinas conlleva, principalmente la formación de endosomas tempranos y que en esta vía la ruta seguida por las toxinas es la ruta que deriva en el aparato de Golgi.

Además las diferencias de marcaje a tiempo largo entre las inmunotoxinas nos hicieron pensar que si bien en el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S, la capacidad de la  $\alpha$ -sarcina para interactuar con membranas podía parecer un *hándicap* para su utilización en posteriores ensayos *in vivo*, al parecer el miembro que podía dar más problemas de reacciones secundarias inespecíficas, resultó que esta capacidad para interactuar con membranas puede ser un punto muy positivo para su actuación, pudiendo darse la posibilidad de que una vez la inmunotoxina es internada y se produce la rotura de los dos dominios, la  $\alpha$ -sarcina se trasloca al citosol donde ejerce su acción tóxica. Este hecho no solo se veía apoyado por las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, sino también por las diferencias de tiempo que necesitan las inmunotoxinas para ejercer su citotoxicidad sobre las células diana.

Todos estos estudios abren un amplio campo de estudios futuros buscando ahondar más profundamente en las rutas seguidas por las inmunotoxinas así como una posible mejora de su actividad según estas rutas.



### BLOQUE 3

## CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA IMTXA33 $\alpha$ S

Una vez comprobada la eficacia y especificidad citotóxica de las inmunotoxinas en ensayos *in vitro* con cultivos celulares, y una vez caracterizada la influencia de las diferencias en cuanto a la especificidad o no de su actividad ribonucleolítica o la utilización de una u otra ruta intracelular, el siguiente paso debía ser la caracterización de la citotoxicidad *in vivo*.

En este proceso, está perfectamente establecido la utilización de modelos animales en las primeras etapas de esta caracterización, destacando entre ellos el empleo de ratones atímicos (*nude*). Así, y una vez generado un tumor localizado localmente en el ratón se procede al estudio del efecto de las proteínas de interés biomédico sobre dicho tumor y sobre el huésped.

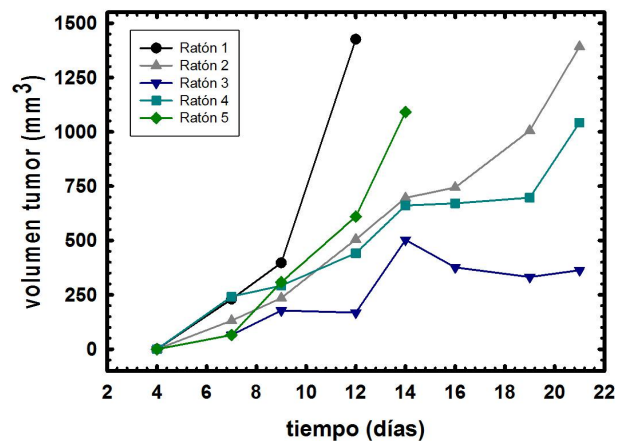
En este bloque se presentan los resultados obtenidos en la caracterización *in vivo* del efecto antitumoral de la IMTXA33 $\alpha$ S

### 3.- Ensayos *in vivo* con inmunotoxina scFvA33 $\alpha$ -sarcina.

#### 3.1- Generación de tumores

Antes de empezar los ensayos *in vivo* con la inmunotoxina se analizó en la bibliografía la existencia de información acerca de la metodología utilizada para la generación de tumores en ratones *nude* a partir de células SW1222 (Popkov *et al.*, 2005; Almqvist *et al.*, 2006).

Así en primer lugar se siguió el protocolo, descrito en Materiales y Métodos, y se inocularon células SW1222 en cinco animales para llevar a cabo el seguimiento del desarrollo del tumor. Las células se inyectaron en el flanco derecho del ratón de manera subcutánea y al día siguiente se comprobó que no había heridas y que los ratones estaban absorbiendo el matrigel en el que estaban embebidas las células. Se controló el crecimiento del tumor cada 48 horas. En los primeros días el tumor parecía líquido al tacto hasta que a partir del día 7 se pudo empezar a calibrar su volumen. La medida de volumen de tumor se realizó midiendo el ancho y largo y del mismo y aplicando la fórmula  $(\text{ancho}^2 \times \text{largo}) \times 0.52$ . En la **Figura 55** se muestra el crecimiento del volumen del tumor con el tiempo. El resultado mostró que en los cinco ratones estudiados se genero un tumor que evoluciono con el tiempo. Cabe destacar que este crecimiento fue heterogéneo, observándose diferencias significativas entre los diferentes ratones. Así, y a modo de ejemplo para llegar a un mismo volumen de tumor en el ratón 1 pasaron 12 días, mientras que para el ratón 2 pasaron 22, y el resto de los ratones no llegaron a ese volumen.



**Figura 55:** Seguimiento del crecimiento del tumor mediante medida de su volumen en los ratones inyectados con células SW1222.

Estos hechos hicieron pensar que si bien el resultado es positivo, en tanto que en todos los ratones se desarrollo un tumor, y mayoritariamente con un crecimiento rapido, esa heterogeneidad en el crecimiento conlleva la necesidad de analizar un

número de animales lo suficientemente grande como para disminuir la variabilidad en los resultados debido a la heterogeneidad en el desarrollo del tumor.

### 3.2- Estudio del efecto antitumoral de IMTXA33 $\alpha$ S.

#### 3.2.1.- Primer ensayo antitumoral

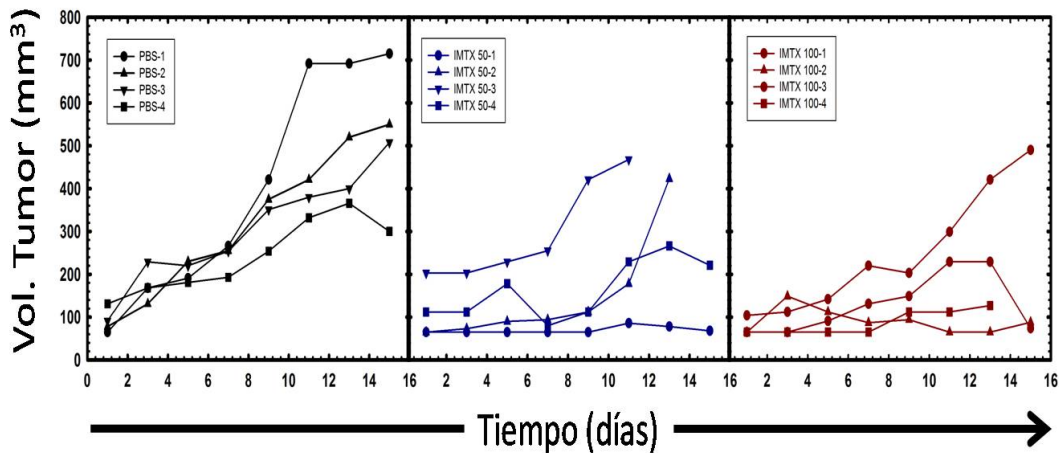
Tras comprobar que se podía establecer el tumor con las células SW1222 en los ratones *nude* y llevar a cabo su seguimiento, se realizó un primer ensayo con la IMTXA33 $\alpha$ S para estudiar el posible efecto de la misma sobre el desarrollo del tumor. Se planteó una prueba inicial con un número pequeño de ratones, y con dos dosis distintas de inmunotoxina. Así, se hicieron tres grupos de experimentación con cinco individuos en cada grupo: un control, a los que se les inyectaría PBS; y dos grupos tratados con 50  $\mu$ g o 100  $\mu$ g de IMTXA33 $\alpha$ S por dosis, respectivamente.

El tratamiento con la IMTXA33 $\alpha$ S comenzó una vez que el tumor habría alcanzado un volumen entre 50-100 mm<sup>3</sup>, mediante inyección intraperitoneal de la correspondiente dosis, cada 48 horas.

Para ello se indujo la generación del tumor en los ratones en las mismas condiciones del ensayo anterior, mediante inoculación de cinco millones de células SW1222 en el flanco derecho de cada ratón. Una vez que el volumen del tumor era el adecuado, se comenzó el tratamiento en dicho ratón. Los 15 ratones se encontraban alojados en tres jaulas en las que se mezcló ratones de los grupos experimentales.

Una vez que cada ratón recibía su primera dosis se marcaba y se comenzaba su seguimiento, midiendo el volumen del tumor cada dos días e inyectando la correspondiente dosis de PBS o inmunotoxina. Este seguimiento se llevó a cabo durante dos semanas. Tras dos semanas de tratamiento los ratones fueron sacrificados y el tumor fue extraído. En este sentido la última medida del volumen que aparece en las gráficas de la **Figura 56** se realizó con el tumor ya extraído. Además se extrajeron también la mayoría de los órganos de los ratones para un posterior estudio anatomopatológico. Los tumores fueron pesados y medidos con un calibre y cortados en

diferentes porciones para posteriores estudios. En la **figura 56** se muestra la evolución del crecimiento del tumor en cada uno de los ratones.



**Figura 56:** Seguimiento del crecimiento del tumor para cada ratón de los 3 grupos tratados. En el eje de abscisas se representa el tiempo (en días) desde que se comienza el tratamiento. La determinación del volumen en el último día para cada ratón se hizo una vez extraído el tumor.

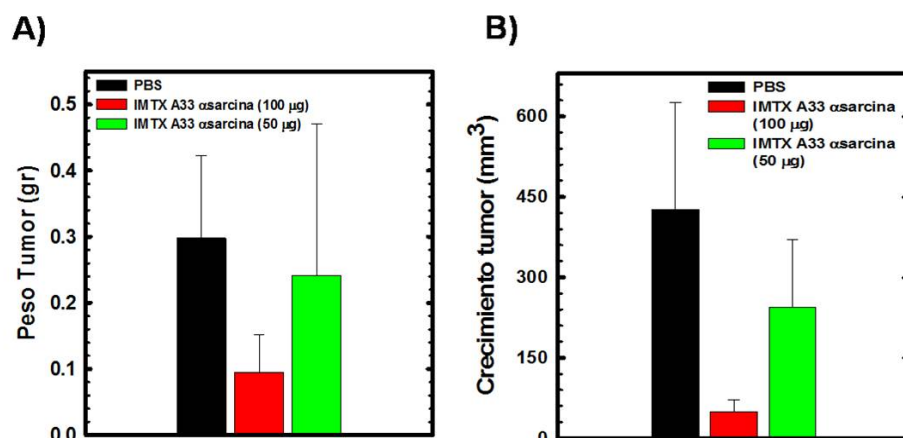
En la figura sólo se muestran los valores obtenidos para cuatro ratones en cada grupo. Esto se debió a que en tres ratones el tumor nunca alcanzó el volumen mínimo para empezar a tratarlo. Este dato entraría dentro de la heterogeneidad esperada según nuestro primer ensayo en el que se vio como algunos tumores doblaban su tamaño cada dos días, mientras que otros casos el crecimiento era mucho más lento. Los motivos por los que esto sucede no los sabemos, pero podría deberse a que en esos ratones las células inyectadas no hayan encontrado las condiciones óptimas de crecimiento, a pesar de estar embebidas en matrigel, y hayan activado su proceso apoptótico, quedando a lo mejor un número tan reducido de células creciendo que se necesita un tiempo mucho mayor para poder observar el crecimiento de tumor.

Al analizar los datos de la **Figura 56** se observa como en el grupo control, a los que se les suministra PBS, el crecimiento del tumor es constante. Sin embargo, en los dos grupos tratados con IMTXA33 $\alpha$ S el comportamiento es completamente diferente. Si bien se aprecia algún comportamiento heterogéneo, en líneas generales se comprueba que el tratamiento con inmunotoxina produce una inhibición en el crecimiento del tumor, siendo esta más patente para la dosis más alta de inmunotoxina. Así, el crecimiento del tumor en el grupo tratado con PBS fue el esperado incluyendo la heterogeneidad en la velocidad de crecimiento, alcanzándose valores de crecimiento acordes a lo esperado, según el ensayo realizado anteriormente. Si se analiza el grupo con la dosis más baja,

IMTX-50, se observó en primer lugar que en ningún caso los tumores desarrollados alcanzaban el volumen final del grupo control, viéndose además que, en dos de ellos, el crecimiento del tumor se veía inhibido. Este efecto es mucho más llamativo en el grupo IMTX-100, donde en tres de los cuatro ratones tratados el crecimiento del tumor se vio claramente inhibido. Hay que señalar que en el caso del ratón número 1 el tumor generado no se localizó en el flanco derecho, sino que se formó en la espalda próximo al cuello del ratón. No sabemos si este hecho es relevante en cuanto al crecimiento y tratamiento del tumor, pero no deja de ser cierto que es distinto que el resto de los miembros del grupo.

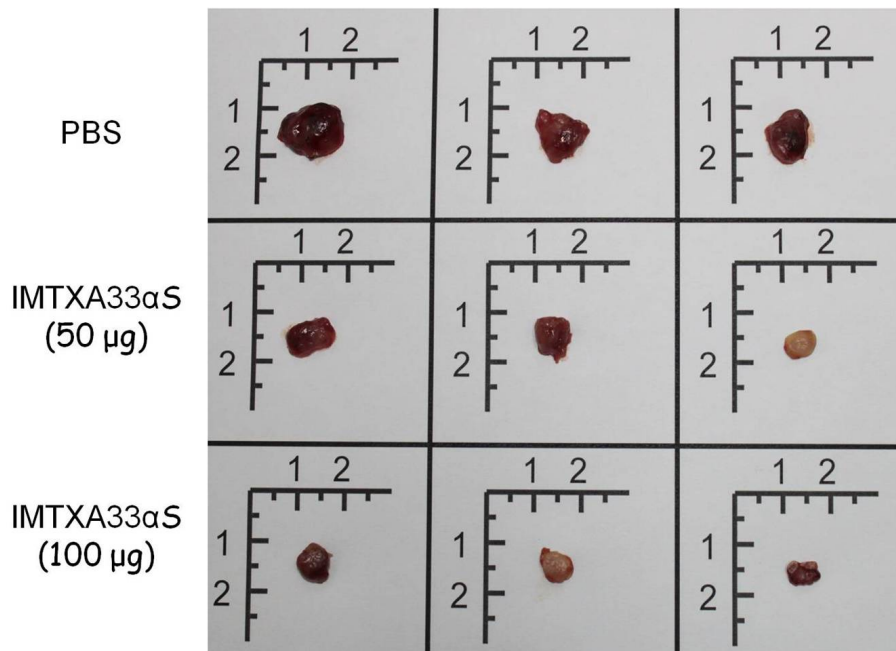
A partir de los tumores extraídos se analizó su peso, volumen y aspecto. En la **Figura 57** se muestra el peso medio de los tumores extraídos para cada uno de los tres grupos experimentados: control (PBS) y las dos dosis de inmunotoxina (IMTX-50 e IMTX-100). Se observa una disminución muy significativa en el peso medio del tumor existiendo una clara relación dosis/respuesta, lo que sugiere una importante eficacia antitumoral de la inmunotoxina.

Al representar el valor medio del crecimiento del tumor, considerando en este caso el volumen final de los tumores respecto al volumen de partida (**Figura 57B**) los resultados son, si cabe, más espectacular, confirmando la elevada eficacia de la inmunotoxina objeto del estudio.



**Figura 57:** Se muestran los datos finales de peso (A) y de crecimiento del volumen del tumor (B) tras la extracción del tumor al final del tratamiento. Se muestran el valor de medio de peso y crecimiento para cada uno de los tres grupos tratados.

Por otro lado al analizar las características morfológicas de los tumores, nuevamente se aprecian claras diferencias entre el grupo control y los tratados (**Figura 58**).



**Figura 58:** Fotografías realizadas a tumores recién extraídos de tres ratones por cada grupo de experimentación.

En el caso de estos últimos, los tumores presentan un aspecto como de quiste, semilíquidos al tacto y con una coloración blanquecina. Esto, sugeriría una inhibición de la irrigación o la ausencia de vasos sanguíneos en el tumor, que apoyaría la inhibición observada en el crecimiento del tumor, junto con la eficacia citotóxica de la inmunotoxina.

Para tratar de determinar el posible efecto antiangiogénico del tratamiento con la inmunotoxina, se llevó a cabo una inmunofluorescencia con el anticuerpo CD31, en cortes de tumores correspondientes a los tres grupos experimentales. El marcaje con CD31 ya se ha utilizado de forma habitual para la detección de vasos sanguíneos en tumores establecidos con la línea celular SW1222 (Popkov *et al.*, 2005). Los resultados se muestran en la **Figura 59**, observándose un marcaje intenso en el caso del tumor tratado con PBS, mientras que en el caso del tumor tratado con IMTXA33αS (100 μg/dosis) no se observa este marcaje, o bien su intensidad es considerablemente menor. Esto nos permitiría aventurar que la actividad antitumoral de la inmunotoxina está favoreciendo un proceso antiangiogénico.

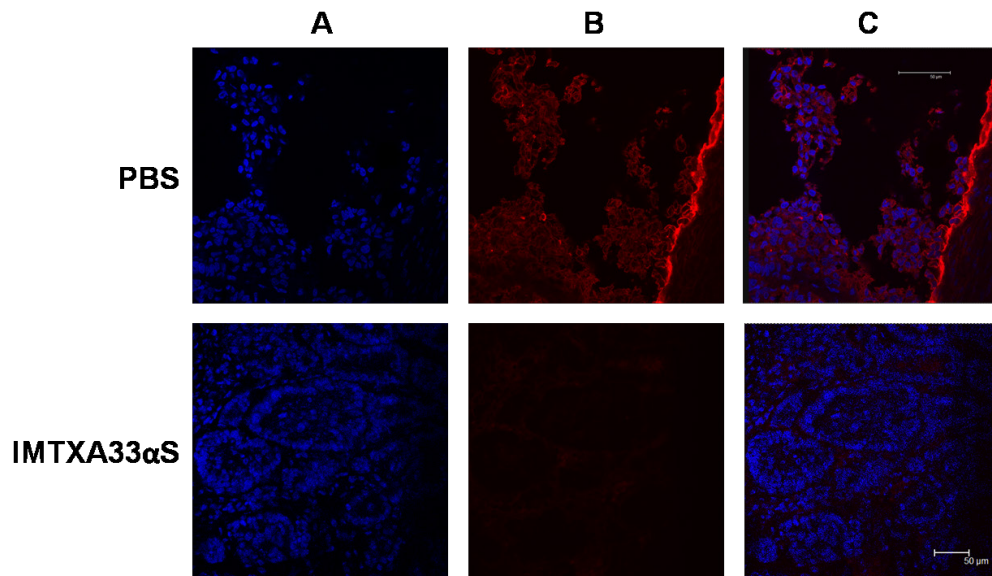
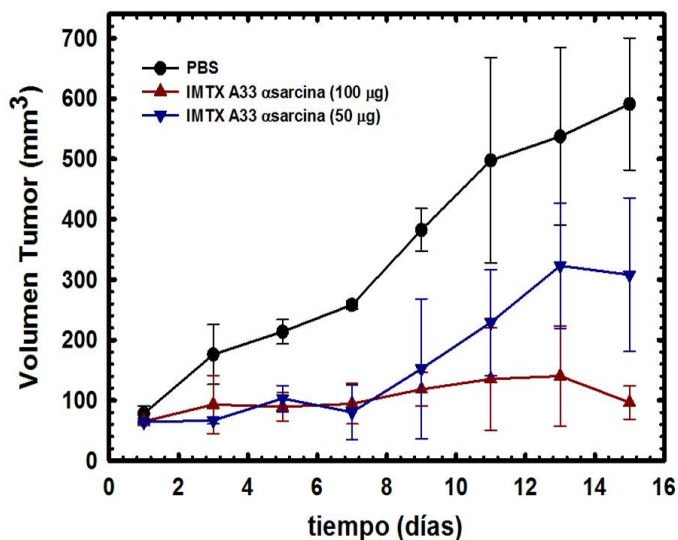


Fig.59: Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. Tumores representativos de los grupos de ratones tratados con PBS y con IMTXA33 $\alpha$ S (100  $\mu$ g/dosis) fueron congelados en TissueTek y cortados en el criostato en cortes de 5 a 10  $\mu$ m. Los cortes se fijan en un portaobjetos con poli-lisina. A) Marcaje de núcleos con DAPI, B) Marcaje de CD31 con anti-CD31 y DAM-Alexa647 y C) Imagen resultante de mezclar las dos imágenes anteriores.

Finalmente se tomaron los datos de crecimiento del tumor de cada ratón, para su representación por grupos, y se hizo una grafica con los valores medios de crecimiento en cada punto. Para esta gráfica se tomaron los datos de los cuatro ratones control, los cuatro ratones del grupo IMTX-50 y los ratones 2, 3 y 4 del grupo IMTX-100 (por lo explicado anteriormente acerca de la localización del tumor en el ratón 1). A partir de estos datos se elaboró la **Figura 60** en la que, nuevamente, se puede observar las diferencias en el crecimiento del tumor: el grupo control respecto a los grupos tratados con IMTXA33 $\alpha$ S, poniéndose de manifiesto la relación directa dosis/respuesta, que implica la práctica inhibición del crecimiento tumoral en el grupo IMTX-100.



**Figura 60:** Seguimiento del volumen del tumor para cada uno de los tres grupos tratados durante las dos semanas de tratamiento.

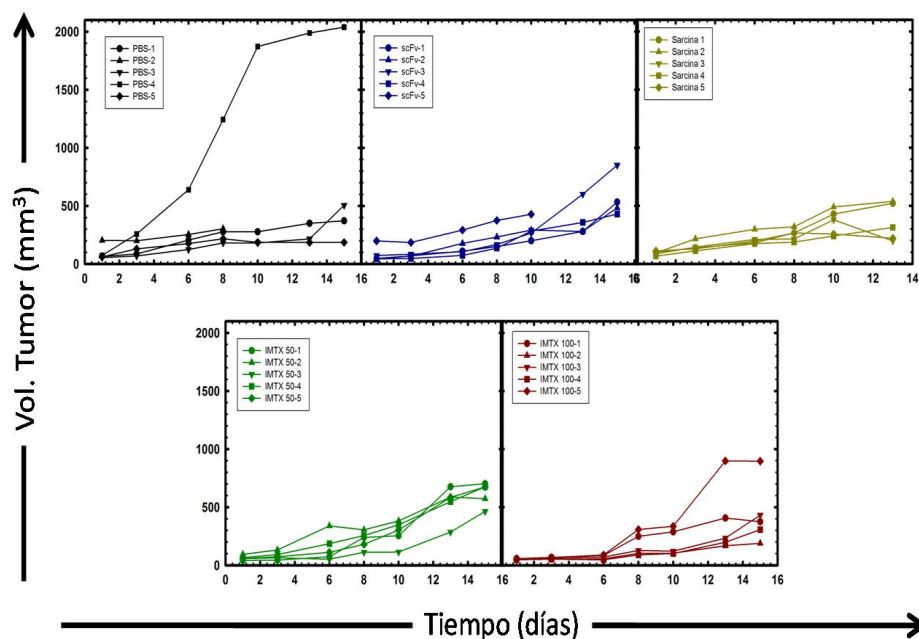
Los datos obtenidos fueron muy esperanzadores considerando que era el primer ensayo *in vivo*. Estos resultados supondrían la constatación del efecto antitumoral *in vivo* de la IMTXA33αS.

### 6.2.1.- Segunda prueba de tratamiento

Tras la primera prueba de tratamiento se planteó una segunda prueba con los mismos grupos más dos grupos control más. En el primer bloque de resultados de la presente Tesis, al describir la caracterización de las inmunotoxinas, se caracteriza primero la actividad de ambos dominios, marcador y toxico, por separado y a continuación la actividad conjunta de ambos dominios. Esto nos hizo pensar que habría que llevar a cabo los mismos controles en el ensayo *in vivo*. Así, además de tener los tres grupos del ensayo anterior, se plantearon dos grupos más: uno tratado con los scFvA33 solos y otro tratado con α-sarcina. Estos grupos serán tratados con la equivalencia molar al grupo de IMTX-100, esto es, cada dosis de scFvA33 será de 58 µg y cada dosis de α-sarcina será de 38 µg. En el caso de los scFvA33 solos no se ha descrito ningún ensayo *in vivo* en la bibliografía. Pero en el caso de la α-sarcina, si que se han descrito ensayos anteriormente, en los que se observó como la α-sarcina frenaba el crecimiento del tumor, pero su toxicidad sobre otros órganos hacía inviable su uso en tratamiento.

Las condiciones fueron iguales que las del primer tratamiento en cuanto a la generación del tumor, inyección intraperitoneal, y un volumen de tumor de 50-100 mm<sup>3</sup> para comenzar el tratamiento. Igualmente, los distintos grupos de ratones estuvieron mezclados en las cajas (5 ratones por caja), salvo el grupo tratado con  $\alpha$ -sarcina. La diferencia en este tratamiento consistió en que las dosis no se dieron cada 48 horas, sino que se dieron el lunes por la mañana, el miércoles a mediodía y el viernes por la tarde. Esto implica una dosis cada 48 horas, y un salto de 72 horas cada 3 dosis.

Al igual que en el ensayo anterior, se midió el crecimiento del tumor en cada uno de los ratones de cada grupo durante el tratamiento. La medida se hizo de igual modo. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 61**. Al observar los valores de crecimiento llamó la atención que en este ensayo había unos valores que se salían de lo esperado, el grupo tratado con PBS. Los valores de los grupos tratados con inmunotoxina difieren ligeramente con el ensayo anterior, lo cual es razonable, pues ya hemos dicho que se necesita una *n* mayor antes de sacar conclusiones. De igual modo los valores con scFvA33 y  $\alpha$ -sarcina fueron obtenidos por primera vez, y en ambos casos se observa un crecimiento del tumor. Pero en el caso del grupo PBS, el tumor creció de un modo exacerbado en uno de los miembros, de un modo ralentizado en dos de los miembros y no creció en otros dos. Si comparamos estos datos con lo obtenido en el ensayo anterior y con el crecimiento del tumor en el primer ensayo, queda patente

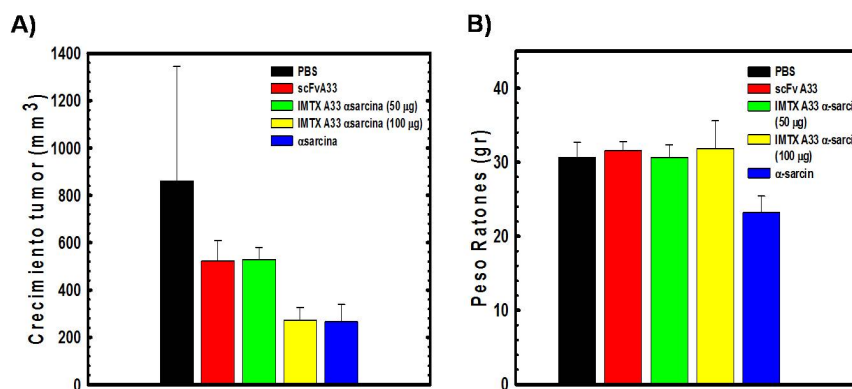


**Figura 61:** Seguimiento del crecimiento del tumor para cada ratón de los 5 grupos tratados. En el eje de abscisas se representa el tiempo (en días) desde que se comienza el tratamiento.

que en esta ocasión el grupo control PBS queda fuera de los parámetros normales, pues no se ha descrito que el PBS tenga actividad antitumoral. Si el grupo control, que representa la evolución del tumor en sí mismo (podríamos decir, el estado del tumor) estaba tan descontrolado, presentando esta heterogeneidad en el desarrollo del tumor, esto nos hizo pensar que de igual modo hay que ser cauteloso con los datos obtenidos con los otros grupos. En el caso del grupo control tratado con scFvA33 se observó que el tumor creció en los cuatro de los ratones tratados. Y en el caso del grupo control con  $\alpha$ -sarcina el tumor creció a un ritmo más lento, lo cual era de esperar, pues la actividad antitumoral de la  $\alpha$ -sarcina ya ha sido descrita anteriormente. En cuanto a los grupos tratados con inmunotoxina, el grupo IMTX-50 presentaba esta vez unos datos más homogéneos en cuanto a crecimiento de tumor, y en el caso de IMTX-100 los datos fueron también más homogéneos observándose que en cuatro de los ratones tratados el crecimiento del tumor era lento. Al igual que en el ensayo anterior, una vez finalizado el tratamiento se extrajeron los tumores de los ratones y se pesaron y midieron.

A la hora de representar los datos se seleccionaron aquellos miembros de cada grupo en los que los datos obtenidos presentaban cierta concordancia con lo obtenido anteriormente, y no eran carentes de sentido, siendo el grupo PBS el más difícil por lo ya explicado. Según esto los miembros seleccionados fueron: ratones 1, 3 y 4 en el grupo PBS; 1, 2, 3 y 4 en el grupo scFvA33; 2, 3, 4 y 5 en el grupo IMTX-50; 1, 2, 3 y 4 en el grupo IMTX-100; y los cinco miembros en el grupo  $\alpha$ -sarcina. El tratamiento de los datos se realizó igual que el ensayo anterior.

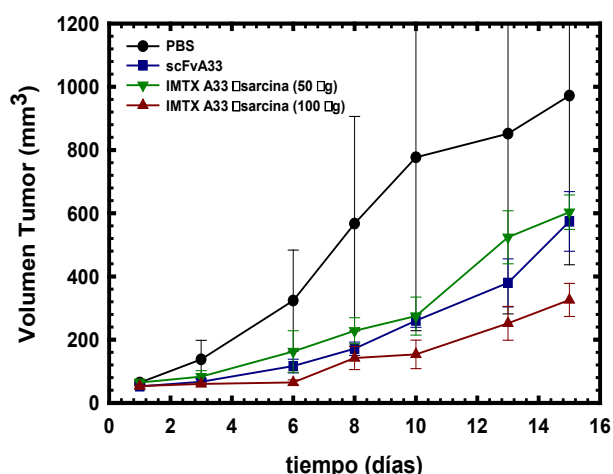
La **Figura 62** muestra los valores de peso de tumor y de crecimiento de tumor medios, por grupo. En este caso el peso de los tumores no presenta las diferencias observadas en el primer ensayo, siendo el peso de los tumores IMTX-50 prácticamente



**Figura 62:** Valores medios por grupo, de crecimiento de tumor (A) y peso de ratón (B).

equivalente al peso del grupo tratado con PBS y el de IMTX-100 muy parecido al grupo PBS, siendo el grupo scFvA33 el que presentaba menores valores.

Sin embargo, al representar los valores de crecimiento de tumor, el grupo IMTX-50 presentaba un crecimiento de tumor equivalente al grupo tratado con scFvA33 y el grupo IMTX-100 al grupo tratado con  $\alpha$ -sarcina. En este punto hay que hacer un inciso. El grupo tratado con  $\alpha$ -sarcina es en el que los tumores crecen más lentamente, pero hay que tener en cuenta que la  $\alpha$ -sarcina es tóxica. De hecho en la **Figura 62** (en la grafica de la derecha) se muestran los valores medios del peso del ratón para cada grupo. En el caso del grupo tratado con  $\alpha$ -sarcina los ratones pesaban entre un 20 y un 30% menos que los otros grupos. Por ello, en este grupo hubo que sacrificar a los ratones antes, pues al observarlos presentaban mal aspecto, delgados, con heridas en la piel y con menor movilidad. Insistimos en que esto no resultó sorprendente pues coincidía plenamente con lo ya descrito para ensayos *in vivo* con la  $\alpha$ -sarcina.



**Figura 63:** Seguimiento del volumen del tumor durante el tratamiento. Se muestran los datos de los grupos PBS, scFvA33, IMTX-50 e IMTX-100. En el eje de abcisas, el tiempo (en días) desde que se comienza el tratamiento.

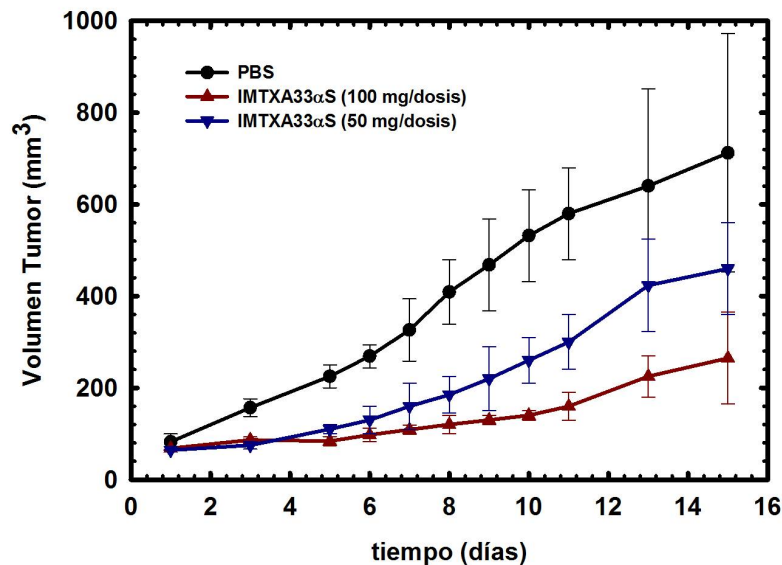
IMTX-50, y además en este caso el crecimiento del tumor en el grupo IMTX-100 es mayor que el observado anteriormente.

Sin embargo, los resultados fueron positivos en tanto que se amplía el número de datos obtenidos para cada grupo PBS, IMTX-50 e IMTX-100, confirmándose un poco más que la inmunotoxina no es tóxica en los ratones a estas concentraciones, y que en el caso de la dosis de 100  $\mu$ g parece que el crecimiento del tumor se ve ralentizado. El hecho de que los ratones tratados con scFvA33 solos o con  $\alpha$ -sarcina sola no muestren

Como en el ensayo anterior se elaboró una grafica de crecimiento de tumor medio para cada grupo con los días de tratamiento. En la gráfica (**Figura 63**) se observa en primer lugar que el grupo PBS presenta un error muy grande, lo cual no es sorprendente teniendo en cuenta los datos obtenidos para los ratones individualmente. Llama la atención igualmente que el crecimiento medio del grupo tratado con los scFvA33 es equivalente al grupo tratado con

este comportamiento hace más patente que es la acción conjunta de ambos dominios, conformando la inmunotoxina, la que actúa sobre el crecimiento del tumor.

Así, si se hace un análisis conjunto de los dos ensayos de tratamiento realizados, incluyendo los individuos seleccionados en cada caso para cada grupo de experimentación, obtenemos la gráfica presentada en la **Figura 64**. En la figura se muestra la evolución media del crecimiento del tumor para una  $n=7$ , en los tres grupos experimentales comunes: PBS y los dos tratados con inmunotoxina, observándose un marcado efecto antitumoral de la inmunotoxina, con una mayor respuesta inhibitoria del crecimiento a medida que aumenta la dosis de inmunotoxina. Si bien, estos ensayos *in vivo* son todavía muy preliminares, los resultados obtenidos indican un claro potencial de esta inmunotoxina en el tratamiento de este tipo de cáncer colorrectal.



**Figura 64:** Seguimiento del volumen del tumor con ratones seleccionados de los dos tratamientos. Se muestran los datos de los grupos PBS, scFvA33, IMTX-50 e IMTX-100. En el eje de abscisas, el tiempo (en días) desde que se comienza el tratamiento. Los datos fueron obtenidos a partir de 7 individuos ( $n=7$ ). Las barras de error muestran la desviación estándar en cada punto.

**DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

### 4.1.- LAS INMUNOTOXINAS

En el año 1856 el laureado Premio Nobel Paul Ehrlich hacía referencia por primera vez a las “balas mágicas” en su libro “The magic bullet”. Esta idea de dirigir específicamente una actividad toxica sobre un determinado tipo celular o tejido, supuso, en seguida, la búsqueda de posibles moléculas que se comportaran como drogas específicas que pudieran aplicarse en el tratamiento contra el cáncer. Recientemente, a comienzos de 2012 se le ha concedido el Premio Príncipe de Asturias a Greg Winter, en parte gracias a todos sus trabajos referidos a la obtención de anticuerpos monoclonales, y que han supuesto un avance fundamental en la inmunoterapia.

La idea conjunta de ambos trabajos, tan separados en el tiempo, supusieron un impulso en la búsqueda de la “bala mágica” que ha encontrado en las inmunotoxinas uno de sus mejores exponentes.

Así la inmunoterapia, como posible tratamiento del cáncer, encuentra en ésta un campo cada vez más amplio y más esperanzador (Melero *et al.*, 2007; Mellman *et al.*, 2011).

Así son cada vez más los inmunoconjugados que están alcanzando en tiempos record fases clínicas, cada vez más avanzadas (Glennie *et al.*, 2003; Chames *et al.*, 2009; Enever *et al.*, 2009). Entre estos inmunoconjugados todavía son más habituales las construcciones derivadas de anticuerpos completos que las construcciones con dominios variables de los mismos. Sin embargo, estos están dirigidos generalmente a linfomas y otro tipo de tumores de, por decirlo de un modo, fácil acceso.

El debate entre la utilización de los anticuerpos monoclonales completos o de sus derivados, fragmentos Fab o los dominios variables, está abierto, habiendo mucha investigación desarrollada entorno al estudio de las características de ambos y a su posible utilización en distintos tipos de tumores (Adams *et al.*, 2001). Si bien, hay que decir que cada vez es mayor la investigación llevada a cabo con dominios variables, dada la pobre penetración de los anticuerpos completos cuando de un tumor solido se trata.

Parece claro con la experiencia acumulada a lo largo del tiempo que no se puede excluir ninguno de las dos vías, sino más bien que en función del paciente y del tipo de cáncer que se esté tratando habrá que elegir una u otra e incluso combinar ambas, o diferentes tipos de terapia. Son muchos y diversos los factores que hay que tener en

cuenta y que entran en juego para elegir uno u otro. No cabe duda de que la utilización del anticuerpo completo brinda una mayor estabilidad frente a la estabilidad de los dominios variables solos, lo cual es una ventaja de cara a la utilización del anticuerpo completo. Igualmente de cara a la especificidad, el anticuerpo completo presenta una constante de asociación mayor, siendo mayor la especificidad de unión frente a los dominios variables. Pero estas ventajas pueden ser también inconvenientes según el tipo de tumor del que se trate. Así, su especificidad puede ser un inconveniente si el antígeno tumoral al que va dirigido se presenta débilmente en el tumor en cuestión, pudiendo ser, “demasiado” selectivo. Su estabilidad viene derivada de los puentes disulfuro a lo largo de su estructura, estructura que, como se ha dicho antes, debido a su elevado tamaño, encuentra problemas a la hora de penetrar en el tumor. Así, jugando con este binomio tamaño-afinidad se ha llegado hasta el punto de investigar con construcciones basadas en el uso de únicamente los CDRs del anticuerpo, que si bien presentan una afinidad mucho menor, tienen una capacidad de penetración muy elevada (Qiu *et al.*, 2008).

En el caso de la presente tesis se ha trabajado con los dominios variables, scFv, del anticuerpo mAbA33 que estaría en una situación intermedia, y que además permite su expresión recombinante en forma de cadena única. Estos scFv o inmunotoxinas, derivadas de la utilización de dominios variables, se han incorporado con rapidez a ensayos clínicos (Madhumathi *et al.*, 2012).

#### **4.2.- ANTIGENO GPA33-ANTICUERO mAbA33**

En base a lo explicado anteriormente, el anticuerpo monoclonal mAbA33 comenzó a ser estudiado como posible agente inmunoterapéutico frente al cáncer de colon en cuanto se caracterizó su marcador GPA33 en él y se comprobó que sus características le convertían en un candidato excelente para ser utilizado en terapia.

Hay que recordar que los estudios del antígeno GPA33 mostraron que éste se encontraba presente en el 95% de los tumores de colon, estando ausente en otro tipo de tejidos. El antígeno, asociado al tumor, se encontraba también ausente en sangre u otros fluidos, y sus niveles de expresión en el tumor eran elevadísimos, llegando a alcanzar las 800.000 moléculas/célula con una elevada tasa de reciclaje. Además, los estudios preliminares con el anticuerpo que lo reconoce, el mAbA33, mostró que la internalización del complejo antígeno-anticuerpo es muy rápida (Catimel *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 1997; Ackerman *et al.*, 2008)

Este anticuerpo ya ha alcanzado fases clínicas para su utilización en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon con resultados muy prometedores (Scott *et al.*, 2005; Almqvist *et al.*, 2006; 2007).

Si bien, en la introducción se comentó que se encontraron ciertos problemas derivados de una reacción adversa del sistema inmune del paciente, no hay que olvidar que son problemas secundarios o, al menos, solucionables. El paciente puede ser inmunodeprimido durante el tratamiento, o, como de hecho está pasando, se pueden buscar derivados mejorados del anticuerpo. Pero los resultados obtenidos en lo que a la acción del anticuerpo sobre el tumor se refiere son muy positivos.

Se han descrito diferentes construcciones con los dominios variables de este anticuerpo (Deckert *et al.*, 2004; Petrausch *et al.*, 2007; Panjideh *et al.*, 2008; Kirui *et al.*, 2010), pero dirigidas hacia la utilización en el diagnóstico más que en tratamiento. Así, los resultados descritos en esta memoria son los primeros dirigidos hacia el tratamiento de este tipo de cáncer.

### 4.3.- TOXINAS

Si nos centramos en el tipo de proteínas utilizadas como dominio tóxico, ya se comentó en la introducción que son muchísimos los estudios hechos con inmunotoxinas cuyo dominio tóxico está basado en la toxina diftérica o la exotoxina de *Pseudomonas* (Kreitman *et al.*, 2006), siendo mucho menores aquellos realizados con otras toxinas.

En nuestro grupo, se lleva trabajando desde hace más de dos décadas en la caracterización estructural y funcional de proteínas tóxicas de origen fúngico. Son muy pocos los ejemplos recientes que se pueden encontrar de estudios de inmunoconjugados derivados de estas proteínas, posiblemente debido a que inicialmente se utilizaban construcciones con el anticuerpo completo, o bien debido a problemas de citotoxicidad inespecífica. Sin embargo estas proteínas, presentan una serie de características muy positivas en cuanto a su uso como dominio tóxico en una inmunotoxina. Así, como se ha comentado en la introducción, sus características como pequeño tamaño, baja inmunogenicidad, elevada termoestabilidad y su elevada actividad, las convierten en candidatos para formar parte del dominio tóxico de una inmunotoxina.

Todos estos aspectos, junto con las características únicas como antígeno tumoral del GPA33 y su capacidad de internación una vez reconocido por el mAbA33,

animaban encarecidamente a llevar a cabo los estudios presentados en la presente tesis.

#### 4.4.- INMUNOTOXINAS BASADAS EN LOS scFvA33

En la presente tesis se han mostrado los resultados obtenidos con las construcciones derivadas de la fusión de los scFvA33 con tres tipos distintos de RNAsas en cuanto a su especificidad citotóxica y ribonucleolítica.

Las tres inmunotoxinas han sido expresadas utilizando el mismo sistema de expresión, obteniendo rendimientos razonablemente satisfactorios. Hay que resaltar que el sistema de expresión basado en la levadura *P. pastoris* utilizado permite un fácil escalado mediante la utilización de fermentadores. Así se ha descrito como los dominios variables pueden obtenerse hasta con un rendimiento de 8 gr/L mediante la utilización de estos fermentadores (Damasceno et al; 2004). Las diferencias en cuanto a los rendimientos obtenidos en el laboratorio parecen guardar una íntima relación con la proteína que forma parte de su dominio tóxico. Así, el mayor rendimiento en cuanto a la expresión se obtuvo con los dominios variables solos, siendo este rendimiento muy parecido al obtenido en la expresión de la IMTXA33T1. Sin embargo, al expresar las inmunotoxinas basadas en ribotoxinas, la IMTXA33 $\alpha$ S y la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W, los rendimientos son menores. Esto podría ser debido a que basta que un pequeño porcentaje de las inmunotoxinas no se procese bien para que estas toxinas, libres en el citoplasma de la levadura, puedan actuar sobre sus ribosomas, causando la muerte celular, y con ello obteniéndose una menor cantidad de inmunotoxina en el medio celular, o bien a que su mayor tamaño, o la presencia de los bucles de estructura no ordenada dificultan su plegamiento y correcto procesamiento de las mismas, disminuyendo así la cantidad total de proteína producida en el medio extracelular.

La purificación de las inmunotoxinas se realizó por igual en los tres casos, mediante cromatografía de afinidad, utilizando para ello el tag de histidinas presente en su extremo carboxilo terminal. Si bien durante el proceso de purificación se consigue el objetivo deseado, obteniendo las inmunotoxinas con un elevado grado de pureza, como se comprobó mediante electroforesis en PAGE-SDS e inmunodetección. No se nos escapa la necesidad en un futuro próximo de incluir un sitio de procesamiento proteolítico que permita la eliminación de esta extensión de histidinas una vez purificadas las inmunotoxinas.

#### 4.4.1.- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS INMUNOTOXINAS.

Las tres inmunotoxinas fueron caracterizadas estructuralmente tras su producción y purificación. Su caracterización estructural implicó un análisis de aminoácidos que nos permitió verificar que las inmunotoxinas estaban correctamente sintetizadas, así como el cálculo de su coeficiente de extinción, imprescindible para el cálculo correcto de su concentración en disolución.

En un siguiente paso se realizaron los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano para obtener información de su estructura. En el caso de las inmunotoxinas IMTXA33 $\alpha$ S e IMTXA33T1, el espectro de dicroísmo circular mostró un plegamiento con un elevado porcentaje de lamina  $\beta$  en su estructura secundaria. Este hecho tiene sentido si atendemos a que el 60% de la inmunotoxina corresponde a los dominios variables, que con un plegamiento tipo inmunoglobulina, tienen un alto contenido en lamina  $\beta$  en su estructura. Además, el espectro experimental obtenido es coincidente con el esperado teóricamente a partir de la contribución de ambos dominios: el dominio marcador y el dominio toxina. Esto nos indica también que ambos dominios se encuentran correctamente plegados, dada que ambas contribuciones se dan al observar el espectro experimental. Este hecho se confirma además en la caracterización funcional, en la que se verifica la funcionalidad de ambos dominios.

Sin embargo, esto no sucedió de igual manera con la IMTXA33HtA. El espectro experimental obtenido mostraba un alto porcentaje en lamina  $\beta$  y en estructura no ordenada, siendo este espectro distinto al teórico a partir de la contribución de ambos dominios. Sin embargo, conviene recordar que los ensayos llevados a cabo para la caracterización estructural mostraron la actividad de ambos dominios. Dado que existe una íntima relación entre el plegamiento y la funcionalidad de una proteína, el hecho de que el espectro de dicroísmo obtenido y el esperado difieran es algo interesante a estudiar. Existen varias posibilidades que expliquen este hecho, y conjuguen a la vez con los resultados obtenidos en la caracterización funcional. Una posibilidad consiste en que una parte de la proteína obtenida no se encuentre bien plegada, pero sí sintetizada completa. Según esto, bastaría un bajo porcentaje de estructura sin plegar para que el porcentaje de estructura no ordenada en espectro experimental varíe. Otra posibilidad podría ser que la proteína estuviera glicosilada. Existe un elevado número de proteínas que, al ser expresadas en *P. pastoris*, son producidas con glicosilaciones si presentan en su secuencia aquellas secuencias consenso que conllevan glicosilaciones. Esta posibilidad parece más irreal en tanto que no existen secuencias susceptibles de glicosilación en la HtA, y en los dominios variables, aunque las hubiera, sería algo

común a las tres inmunotoxinas. La sustitución de los tres triptófanos en la variante no citotóxica de HtA empleada en estos estudios incide directamente en el espectro de dicroísmo circular, dada la contribución de los triptófanos en el rango del UV-lejano. Independientemente de estas disquisiciones y de las diferencias observadas en cuanto al espectro registrado, es inequívoca la correcta funcionalidad de los dos dominios en esta inmunotoxina, que es el objetivo fundamental.

Como último paso en la caracterización estructural se llevaron a cabo ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S e IMTXA33T1. Estos ensayos nos mostraron que la desnaturalización térmica de las inmunotoxinas ocurre alrededor de los 45°C. Estos ensayos resultaban importantes de cara a comprobar su estabilidad a 37°C, pues los ensayos de citotoxicidad específica de las inmunotoxinas, bien sea *in vitro* o *in vivo* serían llevados a cabo a esas temperaturas. Sin embargo, tras los ensayos, solo se pudo estimar el valor de la constante de desnaturalización térmica, ya que en ambos casos el proceso de desnaturalización fue irreversible, lo que imposibilitaba el cálculo de este parámetro. La inmunotoxina, desnaturalizada, probablemente agrega con otras moléculas de inmunotoxina causando que en cierto punto los agregados formados precipiten, detectándose estas en las muestras tras los ensayos.

#### 4.4.2.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS INMUNOTOXINAS.

La caracterización funcional de las inmunotoxinas fue llevada a cabo, en los tres casos, siguiendo un mismo esquema de trabajo. Así, se caracterizó en primer lugar la funcionalidad de cada dominio por separado y finalmente se llevaron a cabo los ensayos de la acción conjunta de los mismos.

En primer lugar se llevaron a cabo los ensayos referentes a la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno GPA33 por parte de los dominios variables. Como se ha detallado en el apartado de Resultados de la presente Tesis Doctoral, en primer lugar se caracterizó esta unión con los dominios variables solos (Fig 5 de Resultados). Esto nos permitió comprobar la unión específica de los scFvA33 al GPA33, así como poner a punto el ensayo de citometría de flujo para las inmunotoxinas. Además, si bien habitualmente se ha usado el mAbA33 como control de la presencia del antígeno GPA33 en la células, en nuestro caso se utilizaron los scFvA33 como control positivo de esta unión para poder comparar lo obtenido con nuestras inmunotoxinas, y a los que hay que referir la mayor o menor capacidad de unión de las mismas.

La unión de los scFvA33 solos fue comparable a la obtenida con el mAbA33 en cuanto a su especificidad por el GPA33, sin producirse uniones inespecíficas a células antígeno-negativas. Si bien, es cierto que la capacidad de unión del anticuerpo completo es mayor, como es de esperar al presentar dos sitios de interacción. Esto redundante en que sea necesario una menor cantidad de moléculas de anticuerpo completo que de dominios variables solos, para obtener el mismo desplazamiento. Este hecho no es para nada negativo, pues ya se ha estudiado antes, y se ha resaltado en la introducción de la presente tesis, que la constante de unión de los dominios variables es, generalmente, unas 10 veces menor, que la del anticuerpo completo del que derivan. En nuestro caso, el que los dominios variables conserven esa capacidad de unión específica al antígeno los valida para su utilización como dominio marcador en las inmunotoxinas.

De hecho, en el caso de las inmunotoxinas, cuando se caracterizó la unión con extractos celulares, bien sea mediante una inmunodetección o bien mediante ELISA, los resultados obtenidos fueron muy positivos, estimándose para la IMTXA33 $\alpha$ S un valor de ID50 que resultó ser diez menor que el del mAbA33, lo que indica que no ha habido una pérdida de capacidad de unión de los dominios variables al fusionarlos con la  $\alpha$ -sarcina. Este hecho se vio reforzado al llevar a cabo los ensayos de citometría de flujo con las inmunotoxinas. En estos ensayos se comprobó que efectivamente se conservaba la unión específica a células antígeno-positivas, y los resultados eran comparables cuantitativamente y cualitativamente a los obtenidos con los dominios variables solos, lo cual indica que en las tres inmunotoxinas estudiadas, la fusión con la toxina no inhabilita la funcionalidad de los scFvA33.

Igual de positivos fueron los resultados obtenidos tras incubar los dominios variables y las inmunotoxinas a 37°C durante tiempos largos. En todos los casos se comprobó que la unión al antígeno GPA33 se conservaba, siendo nuevamente comparables los resultados obtenidos entre las inmunotoxinas y los dominios variables solos. Esto nos indica que a esa temperatura, relevante desde un punto de vista fisiológico y para las condiciones en que se realizan los ensayos de citotoxicidad, los dominios variables conservaran su funcionalidad.

Al comparar las inmunotoxinas entre sí, todas mostraron idéntica capacidad de unión específica al GPA33. Esto indicaba que en ningún caso el dominio tóxico independientemente de la RNasa utilizada interfería en la funcionalidad de los scFvA33. Esto corroboraría que el reconocimiento específico y la entrada al interior celular en las células diana son debidos exclusivamente al dominio marcador.

Además, los resultados obtenidos con células antígeno-negativas, tanto en ensayos de unión, como posteriormente de citotoxicidad *in vitro*, confirman la especificidad del dominio marcador. Más aún, la inclusión de la  $\alpha$ -sarcina en la construcción de la inmunotoxina redundó en una reducción muy significativa de su capacidad para interactuar “inespecíficamente” con membranas de células transformadas, comparado con ésta cuando se encuentra en su forma libre.

Es en el dominio tóxico donde encontramos las diferencias entre las inmunotoxinas. Así, las inmunotoxinas construidas están formadas por una ribotoxina, la  $\alpha$ -sarcina, con capacidad citotóxica *per se* y una actividad ribonucleolítica muy específica; por una RNasa no tóxica, la RNasa T1 con actividad ribonucleolítica inespecífica; o por una variante de la ribotoxina HtA, que conservando su actividad específica sobre el ribosoma, ha perdido su capacidad citotóxica al no ser capaz de interactuar con membranas, combinando por tanto características de las dos anteriores, en la misma molécula.

Los ensayos realizados para caracterizar la actividad RNasa en los diferentes dominios tóxicos resultaron, todos ellos, positivos. Así, en los tres casos se hizo en un primer momento un ensayo de actividad inespecífica, mediante un zimograma, en el que se comprobó en todos los casos su capacidad ribonucleolítica. Este ensayo mostró una actividad mayor en el caso de la RNasa T1, como era de esperar, ya que la RNasa T1 presenta una actividad inespecífica degradando cualquier tipo de RNA que se encuentre a su paso con preferencia por guanina. Mientras que en el caso de la sarcina y la HtA, su actividad inespecífica sobre el polinucleótidos es menor.

En un siguiente paso, se llevaron a cabo los ensayos de actividad específica que nos permitieran llevar a cabo una cuantificación y una comparación de la actividad de las ribotoxinas en su forma libre o formando parte de la inmunotoxina.

Así, se llevaron a cabo ensayos de incubación de reticulocitos con IMTXA33 $\alpha$ S e IMTXA33HtA3 $\Delta$ W y con las ribonucleasas libres, respectivamente. En los dos casos se comprobó que se mantenía en un 90% la actividad de las ribotoxinas al formar parte de la inmunotoxina. Igualmente se llevó a cabo un ensayo de degradación de RNA de levadura con IMTXA33T1 y RNasaT1 libre, siendo la actividad igual en ambos casos.

Estos estudios se llevaron a cabo igualmente tras incubación de las inmunotoxinas a 37°C durante tiempos largos, comprobándose que la actividad de las RNasas se mantenía estable sin diferencias significativas.

Siguiendo el razonamiento empleado en la caracterización funcional del dominio marcador, en este caso el dominio marcador no interfiere significativamente en la funcionalidad del dominio tóxico, ya que en todos los casos se detecta una actividad ribonucleolítica superior al 75% respecto a la RNasa libre. Además no se observan diferencias entre las tres construcciones.

Finalmente se analizó la acción conjunta de ambos dominios mediante ensayos de citotoxicidad. Como una primera aproximación se tomaron las dos inmunotoxinas más diferentes entre sí: la IMTXA33 $\alpha$ S y la IMTXA33T1 para llevar a cabo ensayos de viabilidad celular. Los ensayos llevados a cabo implicaban la incubación de las inmunotoxinas con células SW1222 y LIM1215 para luego incubar las células con Anexina V-FITC y Ioduro de Propidio y obtener información acerca del estado apoptótico o necrótico de las células. En líneas generales ambas proteínas provocaron la activación de un estado de apoptosis en las células, si bien parece que la IMTXA33 $\alpha$ S parece ser más citotóxica tanto con la línea SW1222 como con la línea LIM1215. Al intentar cuantificar esta actividad, mediante un ensayo de MTT, ampliamente utilizado y estandarizado para ensayos de viabilidad, encontramos que las diferencias entre ambas inmunotoxinas son mínimas. Así, en ambos casos, el valor de IC<sub>50</sub> frente a las células SW1222 se encuentra alrededor de 0.8  $\mu$ M. Sin embargo, en el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S se realizó un ensayo de citotoxicidad específico, mediante la medida de la inhibición de la biosíntesis de proteínas como consecuencia de su acción específica sobre el ribosoma. Los resultados obtenidos para la IMTXA33 $\alpha$ S mejoraron sensiblemente con un valor de IC<sub>50</sub> frente a las células antígeno-positivas SW1222 de 0.04  $\mu$ M, sin que esto implique un comportamiento similar en las células antígeno-negativas.

Estos resultados ponían de manifiesto que la actividad específica de la sarcina es más letal y eficaz que la actividad inespecífica de la RNasaT1. Así, podemos imaginar como una sola molécula de  $\alpha$ -sarcina, libre en el citosol inactivando los ribosomas con un único corte, será más letal para la célula que una molécula de RNasaT1, que si bien va degradando el RNA, lo hace de forma inespecífica pudiendo ser que muchos de esos cortes no comprometan la viabilidad celular. Esto, podría justificar razonablemente que necesitemos 20 veces más de IMTXA33T1 que de IMTXA33 $\alpha$ S para obtener la misma actividad citotóxica sobre células antígeno-positivas.

Sin embargo, los resultados obtenidos con las líneas celulares antígeno-negativas nos mostraron la otra cara de la moneda. Así, los ensayos realizados con las ribonucleasas solas y las inmunotoxinas, sobre líneas celulares antígeno-negativas mostraron que la IMTXA33T1 presenta una mayor especificidad de acción citotóxica, no

observándose ningún tipo de citotoxicidad sobre estas líneas, obteniéndose una viabilidad del 80% tras incubar con IMTXA33T1 a 5  $\mu$ M. Lo mismo que se obtuvo al hacer estos ensayos con RNasaT1 libre. Sin embargo, al hacer lo mismo con la IMTXA33 $\alpha$ S se comprobó que la sarcina, que es una molécula citotóxica *per se*, por su capacidad de interactuar con membranas, los resultados obtenidos fueron diferentes. Así la incubación con  $\alpha$ -sarcina sola mostro una IC<sub>50</sub> de 1  $\mu$ M para todas las líneas ensayadas. Si bien hay que decir que el resultado obtenido con la IMTXA33 $\alpha$ S fue positivo en tanto que las líneas celulares antígeno-negativas ensayadas presentaban unos valores de IC<sub>50</sub> mayores de 1  $\mu$ M, lo que implica que, probablemente, los dominios variables estén imposibilitando en cierta medida la capacidad de la  $\alpha$ -sarcina de interactuar con membranas, haciéndola “menos” toxica, para todas las células, salvo para las antígeno-positivas donde su toxicidad es mayor al ser dirigida por el dominio marcador.

En este punto encontramos que no podemos decir cuál de las dos inmunotoxinas parece un mejor candidato, pues si bien la IMTXA33 $\alpha$ S presenta una mayor citotoxicidad; la IMTXA33T1 parece más segura en términos de especificidad, pues su dominio toxico, no es toxico sino está dirigido por los dominios variables.

Esta disquisición podía ser respondida en principio con la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W, en la cual se aúnan ambas características, eficacia toxica de la  $\alpha$ -sarcina, y la ausencia de inespecificidad de la RNasaT1. Sin embargo, los resultados obtenidos con la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W mostraron que si bien, se cumplió lo esperado en cuanto a términos de especificidad, no se cumplió lo esperado en términos de citotoxicidad.

Así, la incubación de células antígeno-negativas con la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W mostro que no había toxicidad sobre estas líneas, presentando unos porcentajes de viabilidad superiores al 90%. Sin embargo, al incubar la inmunotoxina con las líneas celulares antígeno-positivas SW1222 y LIM1215, se obtuvieron unos valores de IC<sub>50</sub> de alrededor de 0.5  $\mu$ M, que si bien, es dos veces menor que el valor obtenido para la IMTXA33T1, es diez veces mayor que el obtenido para la IMTXA33 $\alpha$ S.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización funcional de los dominios tóxicos, y tras lo expuesto acerca de los diferentes ensayos de citotoxicidad, se planteo la siguiente cuestión. ¿Y si la HtA3 $\Delta$ W una vez internada no es capaz de acceder a los ribosomas? Según lo explicado anteriormente, parecería lógico pensar que la diferencia no puede estar ni en la unión, en la que el dominio toxico no participa, según lo observado, en los ensayos de caracterización funcional del dominio

marcador, ni en su actividad sobre el sustrato, el ribosoma, según lo observado en la caracterización del dominio tóxico. Así que podría ser que la diferencia estuviera en algún punto intermedio, entre el reconocimiento y unión del antígeno y la acción citotóxica; en la internación y posterior procesamiento intracelular, que debe conducir a la liberación de la toxina al citosol.

#### 4.5.- **TRAFFICKING**

Como se comentó en la introducción de la presente tesis, son muchos los estudios encaminados a optimizar la citotoxicidad específica de las inmunotoxinas. Estos estudios tenían en muchos casos como elemento diferencial la presencia de un *linker* que favoreciera la liberación de la toxina una vez en el interior celular. Si recordamos lo comentado, una de las posibilidades consistía en colocar en el *linker* un sitio de reconocimiento de furina, de tal modo que se facilitase la proteólisis del *linker*. En este sentido, los estudios realizados con diferentes toxinas en los que se ha comprobado las distintas rutas intracelulares que siguen, sugieren que la ruta de endosomas ácidos-Golgi parece ser la óptima para la acción de las toxinas (Dosio *et al.*, 2011).

Esto nos llevó a realizar estudios para intentar dilucidar cuál es la ruta intracelular que están siguiendo nuestras inmunotoxinas, no solo como explicación a las diferencias encontradas en cuanto su eficacia citotóxica, sino también, a la hora de buscar una posible optimización en la acción de nuestras inmunotoxinas. Para tratar de visualizar estas rutas, utilizamos técnicas de microscopía confocal de inmunofluorescencia, junto con la utilización de marcadores específicos para diferentes componentes celulares. La utilización de diferentes tiempos de incubación ha permitido en principio, cubrir las diferentes etapas del procesamiento intracelular que siguen las inmunotoxinas.

Al estudiar la unión desde esta perspectiva, todas las inmunotoxinas se comportan por igual, obteniéndose las imágenes ya presentadas en las que se puede ver la inmunotoxina en la membrana celular, que presenta el antígeno GPA33; en la internación a tiempo largo, 24 h, se vieron diferencias entre ellas. A la vista de las imágenes obtenidas, en las células incubadas 24 h con IMTXA33 $\alpha$ S parece que se observa un patrón diferenciado en la célula, observándose la aparición de puntos, como vesículas, o zonas en las que la proteína está más concentrada. Algo parecido se observó en el caso de la IMTXA33HtA3 $\Delta$ W, si bien la inmunotoxina parece estar en una

situación más distante al núcleo que en el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S. En el caso de la IMTXA33T1, este marcaje parece mucho más difuminado, en el citoplasma con una menor intensidad.

En un momento inicial se pensó que las diferencias en el marcaje a tiempo largo entre la IMTXA33 $\alpha$ S y la IMTXA33T1 se debían a una cuestión de intensidad de marcaje. Si recordamos bien se ha comentado anteriormente que la  $\alpha$ -sarcina presenta en su secuencia un número mayor de lisinas que la RNasaT1, según lo cual, en el marcaje con Alexa-555, la  $\alpha$ -sarcina estaría más marcada que la RNasaT1. Esto explicaría muy bien la diferencia en cuanto a la intensidad de marcaje en el interior celular a tiempo largo. Sin embargo, para que este razonamiento sea cierto se está dando por hecho que las toxinas se encuentran en su forma libre, separadas de los dominios variables.

Esto nos hizo plantearnos dos cuestiones. Por un lado, si esto es así, ¿qué pasa con los dominios variables? Esto es, una vez liberada la toxina, los dominios variables ¿se degradan?, ¿se quedan en algún compartimento?, ¿se produce su reciclaje hacia la membrana? Responder a esta pregunta es importante en tanto que los dominios variables están marcados con el Alexa-555, por lo que en realidad no podemos saber a tiempo largo si las imágenes que estamos observando corresponden a la localización de las inmunotoxinas enteras, las toxinas y los dominios variables por separado, o las toxinas solas. Desde luego no parece lógico que las imágenes correspondan a los dominios variables solos porque el patrón sería igual en todos los casos, ya que son los mismos en todos los casos.

En este paso se planteó la necesidad de conocer la ruta intracelular que estaban siguiendo nuestras inmunotoxinas, con la idea de saber mejor los procesos a los que están siendo sometidas en intentar entender mejor el porqué estas diferencias a tiempo largo y si esto tiene un relación con los resultados obtenidos en cuanto a la citotoxicidad.

Como ya se comentó en la introducción, la vía de entrada habitualmente implica la entrada mediante endosomas. Por ello, en un primer instante se pensó en estudiar esta vía mediante el marcaje de la proteína EEA1 (proteína A1 presente en los endosomas tempranos) para estudiar la posible colocalización de nuestra proteína con los endosomas.

Estos estudios nos mostraron una colocalización parcial de los endosomas tempranos y las inmunotoxinas. En la mayoría de los casos se observaba la presencia de endosomas sin inmunotoxina en el interior. Esto es razonable en tanto que las

células tendrán activadas otra serie de vías con la consiguiente formación de endosomas. Sin embargo también se comprobó que gran parte de la proteína no parecía estar colocalizando con endosomas. Parece razonable pensar que esto también puede estar debido a que no toda la proteína entra en el mismo instante de tiempo, por lo que en una escala de tiempo las moléculas de inmunotoxina estarán en distintos compartimentos. En nuestro caso los ensayos los hicimos a un único tiempo de 2 horas de incubación de inmunotoxina antes de fijar las células. Pero sería muy interesante hacer estudios a diferentes tiempos, con la idea de observar esta entrada.

Aun así, las imágenes obtenidas nos permitieron verificar que existe colocalización entre endosomas e inmunotoxina, por lo que podemos afirmar que, al menos, una de las posibles vías de entrada de las inmunotoxinas implica la formación de endosomas.

Además en el caso de la IMTXA33 $\alpha$ S se observó la presencia, en algunos casos, de la formación de vesículas de gran tamaño, conteniendo inmunotoxina en su interior y con una localización perinuclear. En la bibliografía ya había sido descrita anteriormente, utilizando el mAbA33, la formación de estas vesículas, denominadas macropinosomas (Daghighian *et al.*, 2007). En nuestro caso, se observó también la presencia de estas macrovesículas, (Figura 44 de resultados), apareciendo habitualmente en el caso de la incubación con IMTXA33 $\alpha$ S. Esto no quiere decir que este fenómeno no ocurra con las otras dos inmunotoxinas, pero fue menos frecuente entre los ensayos llevados a cabo.

Según este resultado parece que las inmunotoxinas entran vía endosomas o mediante la formación de macropinosomas. En el primer caso, y volviendo a lo comentado en la introducción, la vía de endosomas deriva en la formación o en el aparato de Golgi, siendo estas vías no excluyentes entre sí, por lo que es posible que las dos se estén dando al mismo tiempo. La posibilidad de que las inmunotoxinas sean derivadas hacia los lisosomas no era una perspectiva muy halagüeña, ya que en los lisosomas podría darse la degradación de las inmunotoxinas. Así, lo más positivo sería que las inmunotoxinas fueran derivadas hacia el aparato de Golgi.

Por esto nos planteamos la posibilidad de incubar las células con inmunotoxina marcada y a continuación marcar los lisosomas y el aparato de Golgi, buscando la posible colocalización con uno y/u otro orgánulo. Para ello se utilizaban los siguientes marcadores, por un lado el LysoTracker, basado en una sonda que al llegar a los lisosomas, debido a su entorno ácido produce un cambio en la sonda con la consiguiente fluorescencia; y por otro lado para marcar el Golgi se utilizó una lectina

marcada que se une a zonas ricas en ácido siálico, presente en las membranas del Golgi.

Los ensayos de colocalización con lisosomas y Golgi se hicieron a dos tiempos, uno corto, 4 h, y otro largo, 16 h, para comprobar si se observaba alguna diferencia. A tiempo corto en el caso de las tres inmunotoxinas se observó una colocalización parcial con el aparato de Golgi, no observándose colocalización con los lisosomas. A tiempo largo, sin embargo, se vio una cierta colocalización parcial con lisosomas en el caso de la IMTXA33T1 y la IMTXA33HtA3ΔW, y colocalización parcial con aparato de Golgi, mientras que en el caso de la IMTXA33αS a tiempo largo solo se veía una colocalización parcial con el aparato de Golgi y además, nuevamente, la aparición de zonas en las que la proteína está más concentrada y que no colocalizaban ni con Golgi ni con lisosomas.

Estos resultados nos llevan a pensar que las inmunotoxinas estudiadas entran al menos por una vía que conlleva la formación de endosomas, y que mayoritariamente la inmunotoxina es derivada hacia el aparato de Golgi. Las tres parecen presentar esta vía, si bien la IMTXA33αS presenta diferencias respecto a las otras dos en cuanto al patrón de marcaje en la célula, a tiempo largo.

Si buscamos un elemento diferencial en la α-sarcina respecto a la RNasaT1 y la HtA3ΔW, el elemento que nos parece más patente de entrada es la capacidad de interactuar con membranas. Esto nos hizo plantearnos que puede que aquí radique la causa de las diferencias mostradas en la citotoxicidad de las inmunotoxinas.

Así, si conjugamos los resultados de citotoxicidad con lo observado mediante microscopía confocal, podríamos plantear la siguiente hipótesis, según la cual todas las inmunotoxinas se unen e internan por igual en la célula, pero en un momento, bien sea al acidificarse los endosomas en su “viaje” hacia el Golgi, o bien en el propio Golgi, se produce la liberación, total o parcial, de los dominios tóxicos. En este momento la α-sarcina libre presenta por sí misma la capacidad de interactuar con la membrana y translocarse al citosol, donde ejercerá su acción letal sobre el ribosoma, mientras que la RNasaT1 y la HtA3ΔW que carecen de esta capacidad han de ser transportadas o translocadas al citosol mediante la maquinaria celular, lo cual no sabemos ni cómo, ni cuándo, ni dónde ocurre.

Esta hipótesis explicaría el porqué se ve un patrón diferente de marcaje en el caso de la IMTXA33αS y porqué es más efectiva en términos de citotoxicidad en menos tiempo que las otras dos inmunotoxinas.

Aunque si bien estos estudios han resuelto algunas preguntas, han abierto otras muchas que son necesarias responder para completar el dibujo del procesamiento de las inmunotoxinas en el interior celular. Para ello sería fundamental contar con la disponibilidad de un anticuerpo dirigido contra los dominios variables scFvA33. De este modo tras incubar las tres inmunotoxinas por separado, no marcadas, se podrían marcar los dos dominios, con el anti-scFvA33 y con el anti- $\alpha$ -sarcina (o el correspondiente a los otros dos dominios tóxicos). Esto nos permitiría ver donde esta cada uno de los dominios, así como verificar la separación total o parcial de ambos, llevando a cabo este ensayo a diferentes tiempos. Además, permitiría saber cuál es el devenir de los dominios variables scFvA33 una vez escindidos del dominio tóxico.

Por otro lado, otros ensayos a llevar a cabo serían aquellos en los que se marquen los lisosomas y el aparato de Golgi por separado, utilizando la misma técnica recién explicada de modo que podamos ver la vía seguida por los dominios. Esto no fue posible hacerlo con las inmunotoxinas marcadas por la ausencia de un anticuerpo anti-scFvA33 y porque la cantidad de fluoróforos presentes en la célula, en los diferentes orgánulos dificultarían de gran manera la obtención de imágenes sin que haya una superposición de canales.

Se puede decir así que estos ensayos de *trafficking* llevados a cabo están en una fase preliminar hasta completar de una manera inequívoca el mapa del camino seguido por cada uno de los dominios de las inmunotoxinas una vez que se encuentran en el interior celular. Sin embargo, los ensayos llevados a cabo hasta la fecha si nos permiten decir que las inmunotoxinas se internan en la línea celular antígeno-positiva SW1222 y que una vez en el interior pueden seguir varias vías, una de las cuales implica su internalización vía endosomas y derivando hacia el aparato de Golgi.

Sin embargo no hay que olvidar que el objetivo principal de la tesis es la caracterización de tres inmunotoxinas que difieren en su dominio tóxico en busca de la inmunotoxina más efectiva. Y, según todo lo detallado hasta este punto, parecería lógico pensar que la inmunotoxina más efectiva es la IMTXA33 $\alpha$ S.

Por esto, nos planteamos dar el siguiente paso en la caracterización con la IMTXA33 $\alpha$ S, llevando a cabo ensayos *in vivo*.

#### **4.6.- CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA IMTXA33 $\alpha$ S**

Para la caracterización *in vivo* de la IMTXA33 $\alpha$ S el primer paso fue el estudio de la generación de tumores en ratones *nude* mediante la inoculación de células SW1222. Estos estudios, si bien mostraron que se formaban tumores en 4 de los 5 casos estudiados, también mostro que existe una amplia heterogeneidad en la forma de crecimiento del tumor, lo cual pareció importante no perder de vista a lo largo de los tratamientos consecutivos, dado que esa heterogeneidad se vería igual de patente o más en los estudios sucesivos.

Si tenemos en cuenta los dos ensayos de tratamiento antitumoral llevados a cabo y analizamos grupo por grupo nos encontraremos esa heterogeneidad de una manera más o menos acusada.

Los ratones tratados con PBS, son aquellos en los que el tumor creció alcanzando volúmenes mayores. En este sentido fue el grupo en el que se observaron mayores diferencias entre los distintos miembros, diferencias muy marcadas entre el primer y segundo ensayo, y en el que en 7 de los 10 ratones tratados el tumor creció considerablemente.

Los ratones tratados con IMTXA33 $\alpha$ S (50  $\mu$ g/dosis) mostraron en 7 de 10 casos una remisión parcial del crecimiento del tumor, si bien, debido a la heterogeneidad entre los miembros, el posible efecto antitumoral no queda del todo patente, observándose casos en los que un tumor crece como los tratados con PBS y casos en los que el crecimiento se ve completamente ralentizado.

Los resultados más significativos llegaron en el caso de los ratones tratados con IMTXA33 $\alpha$ S (100  $\mu$ g/dosis). En este grupo se observó que también en 7 de los 10 casos la remisión de crecimiento del tumor fue patente, siendo el grupo más homogéneo en cuanto a la evolución del tumor se refiere.

Por otro lado se llevo a cabo el ensayo *in vivo* en el que se inyectaba dominios variables solos scFvA33 y  $\alpha$ -sarcina sola. En ambos casos el resultado fue muy positivo. En el caso del grupo tratado con scFvA33 el tumor creció, aunque si bien no alcanzaba los valores medios obtenidos por el grupo control (tratado con PBS), el tumor creció en todos los casos. En cuanto al grupo tratado con  $\alpha$ -sarcina los ratones tratados sufrieron una pérdida de peso considerable (alrededor del 30%) comparado con el grupo control, y se observó en la piel la aparición de heridas, no sabemos si debido a la tratamiento con  $\alpha$ -sarcina, pero desde luego estos signos solo se vieron en este grupo.

Estos dos últimos grupos fueron muy positivos pues reflejan que la acción antitumoral de la IMTXA33 $\alpha$ S se debe a la acción conjunta de ambos dominios, separados los cuales no se da esa acción antitumoral.

Además teniendo en cuenta lo observado con la IMTXA33 $\alpha$ S y la  $\alpha$ -sarcina, se podría decir que parece que en el tratamiento con inmunotoxina no se dan efectos secundarios no deseados por la posible liberación del domino toxico libre.

Falta todavía realizar más estudios, en los que se está trabajando, con los tejidos extraídos de los ratones tras el tratamiento. Estos estudios revelaran si la IMTXA33 $\alpha$ S causa algún tipo de daño secundario no deseado bien a nivel hepático, en los riñones, etc. Desde luego el resultado de estos estudios es de vital importancia para poder seguir adelante con los estudios *in vivo* con la IMTXA33 $\alpha$ S.

Por ultimo no hay que olvidar que si bien el numero de ratones utilizados en los ensayos son un número significativo y que parece dar una idea del efecto de la IMTXA33 $\alpha$ S como tratamiento ante el tumor, no olvidamos que es un numero de ratones bajo y que estos ensayos son preliminares, haciéndose necesario repetir este ensayo nuevamente para tener un numero de individuos mayor de modo que el resultado sea más significativo.



**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos y expuestos en la presente Tesis Doctoral y, teniendo en cuenta los objetivos propuestos al inicio de presente trabajo de investigación, podríamos concluir que:

1.- Se dispone de un sistema de expresión adecuado para producir y purificar a homogeneidad y con un elevado rendimiento, las construcciones propuestas: scFvA33e inmunotoxinas basadas en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, la variante de ribotoxina no citotóxica HtA3 $\Delta$ W, o la RNasa no tóxica, RNasaT1,

2.- Las inmunotoxinas purificadas presentan una estructura terciaria funcional que se mantiene estable tras incubación a tiempos largos, a temperaturas fisiológicamente revelantes.

3.- Las inmunotoxinas muestran una correcta funcionalidad de sus dominios, tanto en su caracterización por separado, como conjunta, mostrando una elevada citotoxicidad *in Vitro*, con una exquisita especificidad sobre células que presenten el antígeno GPA33 en su membrana.

4.- El estudio de las rutas intracelulares y del procesamiento intracelular de las inmunotoxinas nos permitieron comprobar que éstas siguen diversas rutas intracelulares. Además las diferentes construcciones muestran comportamientos distintos, principalmente la IMTX basada en la  $\alpha$ -sarcina que sigue principalmente una ruta que implica al aparato de Golgi. Las diferentes características en cuanto a la capacidad de interaccionar con membranas, y los estudios realizados sobre *trafficking* podrían explicar las diferencias vistas en cuanto a la citotoxicidad presentada por las inmunotoxinas.

5.- Los estudios *in vivo*, si bien son preliminares, muestran un claro efecto antitumoral de la IMTXA33 $\alpha$ S, comprobándose también un efecto dosis-respuesta, según la cantidad de proteína usada para el tratamiento.



**COROLARIO**



## COROLARIO

Los resultados obtenidos presentados en esta Memoria constituyen un avance muy significativo en la línea de investigación comenzada hace ya unos años, dirigida a la potencial aplicación de las ribonucleasas extracelulares microbianas en el diseño de inmunotoxinas o inmunorribonucleasas antitumorales. El conocimiento adquirido en el grupo de investigación a lo largo de todos estos años, ha permitido utilizarlo en la obtención de estas inmunotoxinas antitumorales que muestran una elevada especificidad y eficacia citotóxica, poniendo las bases además para su posterior optimización.

La expresión de las inmunotoxinas en la levadura *P. pastoris* ha resultado óptima para la producción de las mismas, siendo este sistema ideal para un posterior escalado a nivel industrial, si fuese necesario, mediante la utilización de fermentadores. En este sentido se han llevado a cabo pruebas preliminares para su expresión en fermentador, con la idea de optimizar esta expresión a un escalado mayor, y mejorar el rendimiento en la obtención de inmunotoxina.

La caracterización llevada a cabo con las inmunotoxinas purificadas muestra que éstas ejercen su citotoxicidad específicamente frente a las células diana, que presentan el antígeno GPA33 en su membrana, exhibiendo una elevada eficacia citotóxica. En todos los casos, muestran una elevada estabilidad estructural y funcional en sus dos dominios constituyentes. Además, los estudios referentes al procesamiento intracelular de las inmunotoxinas sugiere que éstas siguen principalmente una vía que implica la entrada mediante endosomas, siendo transportadas a continuación al aparato de Golgi, donde probablemente se produce su procesamiento y la liberación del dominio tóxico.

La unión de ambos estudios ha abierto múltiples aspectos de posible optimización que pueden ser abordados próximamente. Uno de estos puntos implicaría la utilización de un mutante de hirsutelina doble mutante, HtA2 $\Delta$ W (Herrero-Galán et al., 2012) que presenta las mismas características que el mutante ya descrito en la presente Tesis, pero que se produce con un mayor rendimiento. Este mutante sería muy útil de cara a obtener cantidades suficientes de proteína para poder realizar estudios *in vivo*, que no han sido abordados hasta la fecha. Es el efecto antitumoral *in vivo* el que permitirá determinar cuál de las construcciones obtenidas es la que presenta la mayor eficacia antitumoral.

Por otro lado, los estudios de procesamiento intracelular pueden ser completados mediante el marcaje de los orgánulos subcelulares por separado, y ampliando el intervalo de tiempo estudiado. La captura de imágenes con una mayor amplitud de tiempos podría darnos una mayor información sobre la ruta utilizada por las inmunotoxinas en el interior celular. En este sentido, se ha tratado de visualizar, hasta ahora sin éxito, los dos dominios por separado durante el procesamiento intracelular, lo que permitiría asegurar que éste se ha realizado correctamente. Por ello, sería sumamente interesante obtener un anticuerpo anti-scFvA33, para poder incubar las células con inmunotoxina sin marcar durante diferentes tiempos y a continuación marcar los diferentes dominios por separado. Eso nos daría una imagen más real y certera de donde se encuentra cada dominio y del procesamiento que siguen, y serían otro aspecto susceptible de optimización en la eficacia de las inmunotoxinas. Así, por ejemplo, la inclusión de un sitio de reconocimiento de furina en el linker que une ambos dominios debería mejorar dicha eficacia, al menos en aquellas inmunotoxinas que mayoritariamente siguen la ruta endosomas-golgi. En la actualidad ya se han diseñado y producido las construcciones IMTXA33fur $\alpha$ S y IMTXA33furT1, y se está llevando a cabo su caracterización funcional.

Otro aspecto que puede ser abordado, es la obtención de otros diseños de inmunotoxinas que puedan ver implementada su capacidad de penetración en tumores sólidos. En este sentido, se ha comenzado con los ensayos de biología molecular necesarios para obtener las construcciones de dos variantes de inmunotoxina basadas exclusivamente en dos de los CDRs (cada una) del anticuerpo A33. Estas construcciones, denominadas feromonicinas, tienen un tamaño de apenas 7 KDa. En un futuro inmediato se empezarán los estudios para su producción y caracterización, para determinar su utilidad como potencial dominio marcador.

Por último, pero no por ello menos importante o más tarde, queda por ahondar en los estudios de actividad antitumoral *in vivo*. Los ensayos mostrados en la presente tesis doctoral son ensayos preliminares. Es necesario profundizar en ellos. En primer lugar para tener un número mayor de individuos tratados en cada uno de los grupos experimentales. En segundo lugar, se podría estudiar la posibilidad de variar la dosis suministrada, ya que en vista de los resultados obtenidos no se habría alcanzado la saturación en el intervalo dosis-respuesta. El futuro análisis de los estudios anatomopatológicos valorará si puede aumentarse o no la cantidad de inmunotoxina suministrada por dosis, pudiendo disminuir así el número de dosis. Por otro lado, puede variarse la vía de administración, y estudiar cual de ellas es la más efectiva, si intraperitoneal, intravenosa o intraperitumoral.

Si estos ensayos confirmasen el efecto antitumoral de la IMTXA33 $\alpha$ S el siguiente paso sería estudiar su efecto sobre ratones no inmunodeficientes para estudiar la posible inmunogenicidad de la inmunotoxina. En este sentido se está trabajando ya en el diseño para obtener una inmunotoxina que carezca de la extensión de histidinas, para evitar problemas de inmunogenicidad.

Según todo lo descrito, es mucho el camino que queda por recorrer hasta poder conocer a ciencia cierta si estas inmunotoxinas podrían ser utilizadas algún día como posible tratamiento en el cáncer colorrectal. Sin embargo todos los datos que se han ido obteniendo durante los últimos años aportan información relevante para su potencial aplicación y posterior optimización.

En este sentido y para finalizar, quiero recordar el hilo argumental seguido en la Introducción de esta Memoria, y que tiene su reflejo en una parte del título: “Tras los pasos de Paul Ehrlich”. En la lucha contra el cáncer, el desarrollo de estrategias y terapias efectivas, el descubrimiento de nuevas drogas, la realización de ensayos clínicos o, por ejemplo, la identificación de un oncogén o la idea de especificidad de acción, sólo ha sido posible por el conocimiento adquirido después de muchos años de investigación básica y de hipótesis, en muchos casos erróneas o imposibles de interpretar en una época, y que sin embargo supusieron un paso más en la historia del cáncer. El trabajo realizado en esta Tesis, supone un nuevo paso en esta línea, en concreto en tratar de hacer realidad o diseñar nuevas “balas mágicas”, como las que imaginó Paul Ehrlich. En definitiva, avanzar paso a paso, para no quedarnos atrás en el objetivo final de encontrar terapias y tratamientos cada vez más efectivos y personalizados contra el cáncer, y particularmente el cáncer colorrectal.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA:**

- Abrami L, Liu S, Cosson P, Leppla SH, van der Goot FG. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. (2003) *J Cell Biol* 160: 321–328
- Ackerman ME, Chalouni C, Schmidt MM, Raman VV, Ritter G, Old LJ, Mellman I, Wittrup KD. A33 antigen displays persistent surface expression (2008a) *Cancer Immunol Immunother*, 57: 1017-1027.
- Ackerman ME, Pawlowski D, Wittrup KD. Effect of antigen turnover rate and expression level on antibody penetration into tumor spheroids (2008b) *Mol Cancer Ther*, 7 (7): 2233–2240.
- Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of Single-Chain Fv antibody molecules. (2001) *Cancer Res*, 61:4750-4755.
- Adams GP, Weiner LM (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23, 1147-1157
- Almqvist Y, Steffen AC, Tolmachev V, Divgi CR, Sundin A. In vitro and in vivo characterization of <sup>177</sup>Lu-huA33. A radioimmunoconjugate against colorectal cancer (2006) *Nuclear Med Biol*, 33: 991-998.
- Almqvist Y, Steffen AC, Lundqvist H, Jensen H, Tolmachev V, Sundin A. Biodistribution of <sup>211</sup>Pb-labeled humanized monoclonal antibody A33 (2007) *Cancer Biother Radiopharm*, 22 (4): 480–487.
- ÁlvarezGarcía E, GarcíaOrtega L, Verdún Y, Bruix M, Martínez del Pozo Á y Gavilanes JG (2006) Tyr48, a conserved residue in ribotoxins, is involved in the RNAdegrading activity of osarcin. *Biol Chem* 387: 535–541.
- Antignani A, Youle RJ. Endosome fusion induced by diphtheria toxin translocation domain. (2008). *PNAS*, 105:8020-8025.
- Aravind L, Koonin, EV (2001) A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol*. 341, 3-28.
- Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. (2009) *Eur J Pharmacol* 625, 181-189.
- Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R. y Saenger, W. (1988) Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 263, 15358-15368.
- Arruda LK, PlattsMills TA, Fox JW y Chapman MD (1990) *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J Exp Med* 172: 529–1532.
- Arruda, LK., Mann, BJ. and Chapman, MD. (1992) Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f1, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol* 149: 3354–3359.
- Asano R, Ikoma K, Shimomura I, Taki S, Nakanishi T, Umetsu M, Kumagai I. Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody by format conversion to tandem single-chain variable fragment (taFv): the case of the hEx3 diabody (2011) *J Biol Chem*. 286(3):1812-8.
- Balandin TG, Edelweiss E, Andronova NV, Treshalina EM, Sapozhnikov AM, Deyev SM. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunotoxin scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts. (2011) *Invest New Drugs* 29:22-32
- Baluna, R., Coleman, E., Jones, C., Ghetie, V. & Vitetta, E. S. The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells *in vitro*: insights into toxin-mediated vascular damage. *Exp. Cell Res*. 258, 417–424 (2000).

Barbas, 3rd, C.F., A.S. Kang, R.A. Lerner and S.J. Benkovic, 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 7978-7988

Barendswaard EC, Scott AM, Divgi CR, Williams CJR, Coplan K, Riedel E, Yao TJ, Gansow OA, Finn RD, Larson SM, Old LJ, Welt S. Rapid and specific targeting of monoclonal antibody A33 to a colon cancer xenograft in nude mice (1998) *Ent J Oncol*, 12 (1): 45–53.

Beckman RA, Weiner LM, Davis HM (2007). Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* 109: 170–179.

Beintema JJ, y Kleineidam RG, (1998) The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell Mol. Life Sci.* 54, 825-832.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond, S.M. y Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242: 423-426,

Borriello M, Lacceti P, Terrazzano G, D'Alessio G, De Lorenzo C. A novel fully human antitumor immunoRNase targeting ErbB2-positive tumors. (2011) *British Journal of Cancer* 104:1716-1723.

Brandhorst, TT. And Kenealy, WR. (1992) Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. *J Gen Microbiol* 138: 429–1435.

Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, Pastan I. (1991) B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 8616-8620

Brinkmann U. (2000) Recombinant antibody fragments and immunotoxin fusions for cancer therapy. *In Vivo*.14: 21-27

Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. (2001) *Annu Rev Cell Dev Biol*; 17: 517–568.

Byers VS, Pawluczyk IZA, Hooi DSW, Price MR, Carroll S, Embleton MJ, Garnett MC, Berry N, Robins RA, Baldwin RW. Endocytosis of immunotoxin-791T/36-RTA by tumor cells in relation to its cytotoxic action. (1991) *Cancer Res* 51:1990-1995.

Cao Y, Marks JD, Marks JW, Cheung LH, Kim S, Rosenblum MG. Construction and characterization of novel, recombinant immunotoxins targeting the Her2/neu oncogene product: in vitro and in vivo studies. (2009) *Cancer Res*, 69:8987-8995.

CamposOlivas R, Bruix M, Santoro J, Martínez del Pozo Á, Lacadena J, Gavilanes JG y Rico M (1996a) 1H and 15N nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease asaricin. *Protein Sci* 5: 969–972.

CamposOlivas R, Bruix M, Santoro J, Martínez del Pozo Á, Lacadena J, Gavilanes JG y RicoM (1996b) Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease asaricin. *FEBS Lett* 399: 163–165.

Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P *et al.* (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγmαRIIIa gene. *Blood* 99: 754–758.

Carmell, M.A. y Hannon, G.J. (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 214-218.

Carmichael JA, Power BE, Garrett TPJ, Yazaki PJ, Shively JE, Raubischek AA, Wu AM and Hudson PJ. The crystal structure of an anti-CEA scFv diabody assembled from T84.66 scFvs in V(L)-to-V(H) orientation: implications for diabody flexibility. (2003) *J Mol Biol* 326, 341-351.

Carrera-Sangrá N, Álvarez-García E, Herrero-Galán E, Tomé J, Lacadena J, Alegre-Cebollada J, Oñaderra M, Gavilanes JG, Martínez-del-Pozo A. The therapeutic potential role of fungal ribotoxins (2008) *Current Pharma Biotech*, 9: 153-160.

Catimel B, Ritter G, Welt S, Old LJ, Cohen L, Nerrie MA, White SJ, Heath JK, Demediuk B, Domagala T, Lee FT, Scott AM, Tu GF, Ji H, Moritz RL, Simpson RL, Burgess AW, Nice EC. Purification and characterization of a novel restricted antigen expressed by normal and transformed human colonic epithelium (1996) *J Biolog Chem*, 271(41): 25664–25670.

Catimel B, Nerrie M, Lee FT, Scott AM, Ritter G, Welt S, Old LJ, Burgess AW, Nice EC. Kinetic analysis of the interaction between the monoclonal antibody A33 and its colonic epithelial antigen by the use of an optical biosensor. A comparison of immobilisation strategies (1997) *J Chromatogr*, 776 (1): 15–30.

Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. (2009) *CA Cancer J Clin* 59 366-378.

Chames P, Regenmortel MV, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for future. (2009) *British Journal of Pharmacology*, 159:220-223.

Chaudhary CK, Queen G, Junghans RP, Waldmann TA, Fitzgerald DJ, Pastan I (1989) A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas exotoxin*. *Nature* 339, 394 - 397

Chang CH, Gupta P, Michel R, Loo M, Wang Y, Cardillo TM, Goldenberg DM. Ranpirnase (frog RNase) targeted with a humanized , internalizing anti-Trop-2 antibody has potent cytotoxicity against diverse epithelial cancer cells. (2010) *Mol Cancer Ther* , 9, 2276-2286.

Chen A, Hu T, Mikoryak C, Draper RK. Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction. (2002) *Biochim Biophys Acta* 1589: 124–139.

Chen A, AbuJarour RJ, Draper RK. Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI. (2003) *J Cell Sci* 116: 3503–3510

Chong G, Lee FT, Hopkins W, Tebbutt N, Cebon JS, Mountain AJ, Chappell B, Papenfuss A, Schleyer P, U P, Murphy R, Wirth V, Smyth FE, Potasz N, Poon A, Davis ID, Saunderson T, O'keefe GJ, Burgess AW, Hoffman EW, Old LJ, Scott AM. Phase I trial of 131I-huA33 in patients with advanced colorectal carcinoma. (2005) *Clin Cancer Res* 11, 4818-4826.

Chovnick A, Schneider WP, Tso JY, Queen C, Chang CN A recombinant, membrane-acting immunotoxin (1991) *Cancer Res* 51: 465–467.

Chung W, Kwabi-Addo B, Ittmann M, Jelinek J, Shen L, Yu Y, Issa JP (2008) Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS ONE* 3

Conde FP, Orlandi R, Canevari S, Mezzanzanica D, Ripamonti M, Muñoz SM, Jorge P, Colnaghi MI. The Aspergillus toxin restriction is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells (1989) *Eur J Biochem*, 178, 795-802.

Connor J, Bucana C, Fidler IJ y Schroit AJ (1989) Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outerleaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3184–3188.

Correll CC, Beneken J, Plantinga MJ, Lubbers M y Chan YL (2003) The common and the distinctive features of the bulgedG motif based on a 1.04 Å resolution RNA structure. *Nucleic Acids Res* 31: 6806–6818.

Correll CC, Yang X, Gerczei T, Beneken J y Plantinga MJ (2004) RNA recognition and base flipping by the toxin  $\alpha$ -sarcin. *J Synchrotron Radiat* 11: 93–96.

D'Alessi, G, Riordan JF, (eds) (1997) *Ribonucleases: structures and functions*. eds. Academic Press.

Daghighian F, Barendswaard E, Welt S, Humm J, Scott A, Willingham MC, McGuffie E, Lloyd JO, Larson SM. Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of Iodine-125-labelled A33 monoclonal antibody. (1996) *J Nucl Med* 37, 1052-1057.

Damasceno LM, Pla I, Chang HJ, Cohen L, Ritter G, Old LJ, Batt CA. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris* (2004) *Protein Express Purif*, 37: 18-26.

Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris* (2007) *Appl Microbiol Biotechnol*, 74 (2): 381–389.

Damasceno LM, Lee F, Ritter G, Old L, Batt C High-level expression of a phage display-derived scFv in *Pichia pastoris*. (2009) *Methods Mol Biol* 562, 225-236.

Deckert PM, Renner C, Cohen LS, Jungnluth A, Ritter G, Bertino JR, Old LJ, Welt S. A33scFv-cytosine deaminase: a recombinant protein construct for antibody-directed enzyme-prodrug therapy. (2003) *British Journal of Cancer* 88: 937-939.

Deckert PM, Bornmann WG, Ritter G, Williams CJR, Franke J, Keilholz U, Thiel E, Bertino JR, Welt S. Specific tumor localisation of a hu A33 antibody-carboxipeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine (2004) *Int J Oncol*, 24 (5): 1289–1295.

Deshpande, R.A. y Shankar, V. (2002) Ribonucleases from T2 family. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 79-122.

Dosio F, Brusa P, Cattel L. Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components. (2011) *Toxins* 3:848-883.

Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer (2009) *Annu Rev Immunol*, 27; 83-117.

Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova JL, Lutsenko GV, Leonova OG, Popenko VI, Sapozhnikov AM, Deyev SM Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. (2008) *PLoS One* 3, e2434

Edelweiss E, Balandin TG, Stremovskiy OA, Deyev SM, Petrov RV. Anti-EGFR-Miniantibody-Barnase immunoconjugate is highly toxic for human tumor cells. (2010) *Doklady Akademii Nauk*, 434, 558-561.

Egami, F., Oshima, T. y Uchida, T. (1980) Specific interaction of base-specific nucleases with nucleosides and nucleotides. En *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. Chapeville, F. y Haenni, A.L., eds. Springer Verlag, vol. 32, pp. 250-277.

Ehrlich P. The relationship existing between chemical constitution, distribution, and pharmacological action. In: Himmelweite F, Marquardt M, Dale H, eds. *The Collected Papers of Paul Ehrlich*. London: Pergamon Press, 1956; 596–618

Endo Y, Wool IG The site of action of  $\alpha$ -sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the  $\alpha$ -sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 9054–9060.

Endo Y, Huber PW, Wool IG The ribonuclease activity of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin. The characteristics of the enzymatic activity of  $\alpha$ -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. (1983) *J Biol Chem* 258: 2662–2667

Enever C, Batuwangala T, Plummer C, Sepp A. Next generation immunotherapeutics-honing the magic bullet. (2009) *Cur Op Biotechnol* 20, 405-411

Engert A, Diehl V, Schnell R, Radszuhn A, Hatwig MT, Drillich S, Schön G, Bohlen H, Tesch H, Hansmann ML, Barth S, Schindler J, Ghetie V, Uhr J, Vitetta E. A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma (1997) *Blood*, 89, 403-410.

Fang EF, Ng TB. Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications (2011) *Biochimica et Biophysica Acta* 1815:65-74

Fernandez A, Martinez A, Gaspar MJ, Filella X, Molina R, Ballesta AM (2007) Marcadores tumorales serológicos. *Quimica Clinica* 26:77-85

Fernandez-Puentes, C., and Carrasco, L. (1980) Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins, *Cell* 20: 769-775.

Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, Jiménez P, Girbés T. (2011) Use of ribosome-inactivating proteins from sambucus for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins*. May;3(5):420-41.

Francisco JA, Gawlak SL, Siegall CB. Construction, Expression, and Characterization of BD1-G28-5 sFv, a Single-chain Anti-CD40 Immunotoxin Containing the Ribosome-inactivating Protein Bryodin 1. (1997) *JBC* 272:24165-24169.

Frankel AE, Powell BL, Hall PD, Case LD, Kreitman RJ Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia (2002) *Clin Cancer Res* 8: 1004–1013.

Frankel AE, Woo JH, Neville DM. (2009) Immunotoxins. *Principles of cancer biotherapy*. 407-449

Foss FM, Saleh MN, Krueger JG, Nichols JC, Murphy JR. Diphtheria toxin fusion proteins (1998) *Curr Top Microbiol Immunol*, 234, 63-61.

Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, Weinstein JN. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab in tumors. *Cancer Res*. 1989;49:5656–5663

Gao C, Mao S, Kaufmann G, Wirsching P, Lerner RA, Jandar KD (2002) A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *PNAS* 99:12612:12616

García-Mayoral, MF., García-Ortega, L., Lillo, MP., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, JG., Rico, M. and Bruix, M. (2004) NMR structure of the noncytotoxic  $\alpha$ -sarcin mutant D(7–22): the importance of the native conformation of peripheral loops for activity. *Protein Sci* 13: 1000–1011.

GarcíaMayoral MF, PantojaUceda D, Santoro J, Martínez del Pozo Á, Gavilanes JG, Rico M y Bruix M (2005a) Refined NMR structure of  $\alpha$ sarcin by <sup>15</sup>N<sup>1</sup>H residual dipolar couplings. *Eur Biophys J* 34: 1057–1065.

García-Mayoral, MF., García-Ortega, L., Álvarez-García, E., Bruix, M., Gavilanes, JG. and Martínez del Pozo, A. (2005b) Modelling the highly specific ribotoxin recognition of ribosomes. *FEBS Lett* 579: 6859–6864.

Garcia-Ortega L, Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, Kao R, Davies J, Olmo N, Martinez del Pozo A, Gavilanes JG. Involvement of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of the *Aspergillus* ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity (2001) *Protein Sci*, 10: 1658-1668.

García-Ortega L, Masip M, Mancheño JM, Oñaderra M, Lizarbe MA, García-Mayoral MF, Bruix M, Martínez del Pozo A, Gavilanes JG. Deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of the ribotoxin  $\alpha$ -Sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease (2002) *J Biol Chem*, 277: 18632-18639.

García-Ortega, L., De los Ríos, V., Martínez-Ruiz, A., Oñaderra, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (2005) Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2, *Electrophoresis* 26: 3407-3413.

Gasset M, Mancheño JM, Lacadena J, Turnay J, Olmo N, Lizarbe MA, Martínez del Pozo A, Oñaderra M, Gavilanes JG.  $\alpha$ -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles (1994) *Curr Topics Pept Protein Res*, 1: 99-104.

Ghetie V, Swindell E, Uhr JW, Vietetta ES. Purification and properties of immunotoxins containing one vs. two deglycosylated ricin A chains (1993) *J Immunol Methods*, 166, 117-122.

Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin (2001) *Blood*. 97:1392-1398

Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V *et al.* (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14701–14706.

Glinka EM, Edelweiss EF, Sapozhnikov AM, Deyev SM (2006) A new vector for controllable expression of an anti-HER2/neu mini-antibody-barnase fusion protein in HEK 293T cells. *Gene* 366: 97–103.

Glück A yWool IG (1996) Determination of the 28 S ribosomal RNA identity element (G4319) for  $\alpha$ sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site. *J Mol Biol* 256: 838–848.

Goyal A and Batra JK. Inclusion of a furin-sensitive spacer enhances the cytotoxicity of ribotoxin restrictocin containing recombinant single-chain immunotoxin. (2000) *Biochem J*. 345, 247-254.

Graumann K, Premstaller A (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* 1: 164–186.

He D, Yang H, Lin Q, Huang H. Arg9-peptide facilitates the internalization of an anti-CEA immunotoxin and potentiates its specific cytotoxicity to target cells (2005) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37:192-205.

Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, Tu GF, Ji H, Whitehead RH, Groenen LC, Scott AM, Ritter G, Cohen L, Welt S, Old LJ, Nice EC, Burgess AW. The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily (1997) *Biochemistry*, 94: 469-474.

Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH (2005) Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 22: 16-25

Hempel F, Lau J, Klingl A, Maier UG (2011) Algae as Protein Factories: Expression of a Human Antibody and the Respective Antigen in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE* 6(12): e28424.

Herrero-Galán E, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Boucias DG, Olmo N, Oñaderra M, Gavilanes JG, The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin (2008) *Proteins*, 72: 217–228.

Herrero-Galán, E., Álvarez-García, E., Carrera-Sangr a, N., Lacadena, J., Alegre-Cebollada, J., Martinez del Pozo, A., Oñaderra, M. and Gavilanes, JG. (2009) Fungal ribotoxins: structure, function and evolution. In *Microbial Toxins: Current research and future trends*.

Herrero-Galán E, García-Ortega L, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Olmo N, Gavilanes JG, Oñaderra M. Implication of an Asp residue in the ribonucleolytic activity of hirsutellin A reveals new electrostatic interactions at the active site of ribotoxins. (2012a) *Bichime* 94:427-433

Herrero-Galán E, García-Ortega L, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Olmo N, Gavilanes JG, Oñaderra M. A non-cytotoxic but ribonucleolytically specific ribotoxin variant: implication of tryptophan residues in the cytotoxicity of hirsutellin A (2012b) *Biol. Chem* 393:449-456.

Hofsteenge, J. (1997) Ribonuclease inhibitor. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 621-658.

Hoogenboom HR, Chames P (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today* 21: 371-378.

Höglund J, Orlova A, Sundin A, Lundqvist H, Tolmachev V. Cellular processing in the SW1222 cell line of mAb A33 directly and indirectly radiohalogenated (2006) *Oncology Reports* 16:159-163.

Holzman DC. Whatever happened to immunotoxins? Research and hope, are still alive (2009) *J Natl Cancer Inst* 101, 624-625.

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 85(16): 5879-5883

Inogés S, Calvillo MR, Diaz de Cerio AL, Zabalegui N, Ibarrola AS, Rocha E, Bendandi M. Active immunotherapy in the treatment of haematological neoplasias. (2004) *An Sist Sanit Navar*, 27:45-62.

Jansen FK, Jansen A, Derocq JM, Carriere D, Carayon P, Veas F, Jaffrezou JP. Golgi vacuolization and immunotoxin enhancement by monesin and perhexiline depend on a serum protein. (1992) *JBC* 267: 12577-12582.

Ji H, Moritz RL, Reid GE, Ritter G, Catimel B, Nice E, Heath JK, With SJ, Welt S, Old LJ, Burgess AW, Simpson RJ. Electrophoretic analysis of the novel antigen for the gastrointestinal-specific monoclonal antibody A33 (1997) *Electrophoresis*, 18 (3-4): 614-621.

Johannes L, Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. (2005) *Gene Therapy* 12:1360-1368.

Johnstone CN, Tebbutt NC, Abud HE, White SJ, Stenvers KL, Hall NE, Cody SH, Whitehead RH, Catimel B, Nice EC, Burgess AW, Heath JK. Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells (2000) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G500-G510.

Johnstone CN, White SJ, Tebbutt NC, Clay FJ, Ernst M, Biggs WH, Viars CS, Czekay S, Arden KC, Heath JK. Analysis of the regulation of the A33 antigen gene reveals intestine-specific mechanisms of gene expression (2002) *JBC* 277: 37, 34531-34539

Joosten CE, Cohen LS, Ritter G, Batt CA, Shuler ML Glycosylation profiles of the human colorectal cancer A33 antigen naturally expressed in the human colorectal cancer cell line SW1222 and expressed as recombinant protein in different insect cell lines (2004) *Biotechnol Prog*, 20: 1273-1279.

Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ, Lerner RA (1991) Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *PNAS* 88:4363

Kao, R., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Crameri, R. y Davies, J. (2001) Mitogillin and related fungal ribotoxins. *Methods Enzymol.* 341, 324-335.

Kiessling A, Füssel S, Wehner R, Bachmann M, Wirth MP, Rieber EP, Schmithz M. Advances in Specific Immunotherapy for Prostate Cancer (2008) *European Urology*, 53, 694-708

- Kim, J.S., Soucek, J., Matousek, J. y Raines, R.T. (1995) Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 270, 31097-31102.
- King DJ, Antoniw P, Owens RJ, Adair JR, Haines AM, Farnsworth AP, Finney H, Lawson AD, Lyons A, Baker TS. Preparation and preclinical evaluation of humanised A33 immunoconjugates for radioimmunotherapy (1995) *Br J Cancer*, 72 (6): 1364–1372.
- Kirkham M, Fujita A, Chadda R, Nixon SJ, Kurzchalia TV, Sharma DK, Pagano RE, Hancock JF, Mayor S, Parton RG. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. (2005) *J Cell Biol*; 168: 465–476
- Kirui DK, Rey DA, Batt CA. Gold Hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. (2010) *Nanotechnology* 21, 105-115
- Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellenhofer G, Hoess A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides *J. Mol. Biol.* 296, 57–86
- Kondo T, FitzGerald D, Chaudhary VK, Adhya S, Pastan I. Activity of immunotoxins constructed with modified Pseudomonas exotoxin A lacking the cell recognition domain (1988) *J Biol Chem*, 263, 9470-9475.
- Koradi R, Billeter M, Wüthrich K (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14: 51–55.
- Krauss J, Arndt MAE, Dübel S, Rybak S; Antibody-targeted Rnase fusion protein (ImmunoRNases) for cancer therapy (2008) *Curr Pharma Biothech*, 9; 231-234.
- Kreitman RJ, Chaudhary VK, Waldmann T, Willingham MC, FitzGerald DJ, Pastan I. The recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-Pseudomonas exotoxin 40 is cytotoxic toward peripheral blood malignant cells from patients with adult T-cell leukemia (1990). *Proc Natl Acad Sci*, 87, 8291-8295.
- Kreitman RJ, Batra JK, Seetharam S, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan I. Single-chain immunotoxin fusions between anti-Tac and Pseudomonas exotoxin: relative importance of the two toxin disulfide bonds (1993) *Bioconjug Chem.*, 4, 112-120.
- Kreitman RJ. Immunotoxins in cancer therapy (1999) *Current Opin Immunol*, 11: 570–578.
- Kreitman RJ. Immunotoxin (2000) *Expert Opin Pharmacother*, 1, 1117-1129.
- Kreitman RJ, Recombinant toxins for the treatment of cancer (2003) *Curr Opin Mol Ther*, 5, 44-51.
- Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy (2006) *A A P S Journal*, 8 (3): E532–E551.
- Kreitman RJ (2009) Recombinant Immunotoxins Containing Truncated Bacterial Toxins for the Treatment of Hematologic Malignancies. *BioDrugs* 23, 1-13.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 (1970) *Nature*, 227: 680-685.
- Lacadena, J., Martinez del Pozo, A., Lacadena, V., Martinez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1998) The cytotoxin alpha-sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett* 424, 46-48.
- Lacadena J, Martinez del Pozo A, Martinez-Ruiz A, Perez-Cañadillas JM, Bruix M, Mancheño JM, Oñaderra M, Gavilanes JG; Role of histidine-50, glutamic acid-96 and histidine 137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -Sarcin (1999) *Proteins*, 37: 474-484

- Lacadena J, Álvarez-García E, Carrera-Sangrá N, Herrero-Galán E, Alegre-Cebollada J, García-Ortega L, Oñaderra M, Gavilanes JG, Martínez del Pozo A. Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers (2007) *FEMS Microbiol Rev*, 31: 212-237.
- Lamy B, Davies J, Schindler D. The aspergillus ribonucleolytic toxins (ribotoxins); Genetically Engineered Toxins (1992) *Frankes AE ed*, pp 237-258.
- Lawe DC, Chawla A, Merithew E, Dumas J, Carrington W, Fogarty K, Lifshitz L, Tuft R, Lambright D, Corvera S. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1 (2002) *J Biol Chem*. 8;277(10):8611-7.
- Lee FT, Hall C, Rigopoulos A, I Zweit J, Pathmaraj K, O'Keefe GJ, Smyth FE, Welt S, Old LJ, Scott AM. Immuno-PET of human colon xenograft-bearing BALB/c nude mice using <sup>124</sup>I-CDR-Grafted Humanized A33 monoclonal antibody. (2001) *J Nucl Med* 42:764-769.
- Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK, Turley SJ. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self (2006) *Nature Immunology*, 8 181 – 190.
- Leedham SJ, Wright NA. Expansion of a mutated clone: from stem cells to tumour (2008) *J Clin Pathol* 61:167-171
- LeMaistre CF, Saleh MN, Kuzel TM, Foss F, Plataniias LC, Schwartz G, Ratain M, Rook A, Freytes CO, Craig F, Reuben J, Nichols JC. Phase I trial of a ligand fusion-protein (DAB389IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2 (1998) *Blood*, 91, 399-405.
- Li Q, Verschraegen CF, Mendoza J, Hassan R. Cytotoxic Activity of the Recombinant Anti-mesothelin Immunotoxin, SS1(dsFv)PE38, Towards Tumor Cell Lines Established from Ascites of Patients with Peritoneal Mesotheliomas (2004) *Anticancer Research*, 24, 1327-1335.
- Li Z, Yu T, Zhao P, Ma J. Immunotoxins and cancer therapy (2005) *Cell Mol Immunol*, 2(2): 106-112.
- Lin A, Huang KC, Hwu L yTzean SS (1995) Production of type II ribotoxins by *Aspergillus* species and related fungi in Taiwan. *Toxicon* 33: 105–110.
- LópezOtín C, Barber D, FernándezLuna JL, Soriano F y Méndez E (1984) The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur J Biochem* 143: 621–634.
- Lord JM, Deeks E, Marsden CJ, Moore K, Pateman C, Smith DC, Spooner RA, Watson P, Roberts LM. Retrograde transport of toxins across the endoplasmic reticulum membrane. (2003) *Biochem Soc Trans*; 31: 1260–1262
- De Lorenzo C, Di Malta C, Cali G, Troise F, Nitsch L, D'Alessio G. Intracellular route and mechanism of action of ERB-hRNase, a human anti-ErbB2 anticancer immunoagent. (2007) *FEBS letters*, 581:296-300.
- De Lorenzo C, D'Alessio G. From ImmunoToxins to ImmunoRNases (2008) *Curr Pharma Biotech*, 9: 210-214.
- De Lorenzo C, D'Alessio G Human anti-ErbB2 immunoagents-immunoRNases and compact antibodies. (2009) *FEBS J*. 276, 1527-1535.
- Loverix, S. y Steyaert, J. (2001) Deciphering the mechanism of RNase T1. *Methods Enzymol*. 341, 305-323.
- Loverix, S., Doumen, J. y Steyaert, J. (1997) Additivity of protein-guanine interactions in ribonuclease T1. *J. Biol. Chem*. 272, 9635-9639.

- Luginbuhl B, Kanyo Z, Jones RM, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE *et al.* (2006). Directed evolution of an anti-prion protein scFv fragment to an affinity of 1 pM and its structural interpretation. *J Mol Biol* 363: 75–97.
- MacIntosh, G.C., Bariola, P.A., Newbigin, E. y Green, P.J. (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 1018-1023.
- Madhumathi J, Verma RS. (2012) Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins *Curr Opin Microbiol.* 15(3):300-9
- Makarov AA, Kolchinsky A, Ilinskaya ON. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents (2008) *BioEssays* 30:780-790.
- Makarov, A.A. e Ilinskaya, O.N. (2003) Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* 540, 15-20.
- Mancheño JM, Gasset M, Albar JP, Lacadena J, Martínez del Pozo Á, Oñaderra M y Gavilanes JG (1995) Membrane interaction of a bstructureforming synthetic peptide comprising the 116–139th sequence region of the cytotoxic protein  $\alpha$ sarcin. *Biophys J* 68: 2387–2395.
- Mao Z, Shan S, Zhu Y, Yi X, Zhang H, Shang Y, Tong T. Transcriptional regulation of A33 antigen expression by gut-enriched Krüppel-like factor (2003) *Oncogene* 22, 4434-4443.
- Mathew M, Verma RS. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. (2009) *Cancer Sci*, 100: 1359-1365.
- Martinez del Pozo A, Gasset M, Oñaderra M, Gavilanes JG. Conformatinal study of the antitumour protein  $\alpha$ -Sarcin (1989) *Int J Pept Protein Res*, 34: 416-422.
- Martinez-Ruiz A, García-Ortega L, Kao R, Lacadena J, Oñaderra M, Mancheño JM, Davies J, Martinez del Pozo A, Gavilanes JG. RNase U2 and  $\alpha$ -Sarcin: a study of relationships (2001) *Methods Enzimol*, 341: 335-351.
- MartínezRuiz A, Martínez del Pozo Á, Lacadena J, Oñaderra M y Gavilanes JG (1999a) Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases. *J Invertebr Pathol* 74: 96–97.
- MartínezRuiz A, Kao R, Davies J y Martínez del Pozo Á (1999b) Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* 37: 1549–1563.
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2001) Arginine 121 is a crucial residue for the specific cytotoxic activity of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Eur. J. Biochem.* 268, 6190-6196.
- Masip, M., García-Ortega, L., Olmo, N., García-Mayoral, M.F., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (2003) Leucine 145 of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin plays a key role for determining the specificity of the ribosome-inactivating activity of the protein. *Protein Sci.* 12, 161-169.
- Mathivanan S, Lim JWE, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM 1215 reveals a tissue-specific protein signature. (2009) *Molecular & Cellular Proteomics* 197-208.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552–554.
- McGrath, K. E., Koniski, A. D., Malik, J. and Palis, J. (2003). Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101, 1669-1676.

- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. (2011) *Nature*, 480: 480-489.
- Menzel C, Schirrmann T, Konthur Z, Jostock T, Dübel S. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas (2008) *Blood*, 111:3830-3837
- Moritz RL, Ritter G, Catimel B, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Burgess AW, Nice EC, Simpson RJ. Microsequencing strategies for the human A33 antigen, a novel surface glycoprotein of human gastrointestinal epithelium (1998) *Journal of chromatography*, 798: 91-101.
- Morokoff AP, Novak U. Targeted therapy for malignant gliomas (2004) *J Clin Neurosci* ; 11: 807-818.
- Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniataki, E. y Mourelatos, Z. (2003) The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem. Sci.* 28, 534-540
- Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH (1985). A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* 314: 268-270.
- Newton DL, Hansen HJ, Mikulski SM, Goldenberg DM, Rybak SM. (2001) Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*;97(2):528-35.
- Nielsen, K. and Boston, R.S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 785-816.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 19: 239-245.
- Olmo N, Turnay J, González de Buitrago G, López de Silanes I, Gavilanes JG, Lizarbe MA. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. Induction of cell death via apoptosis (2001) *Eur J Biochem*, 268: 2113-2123.
- Olson BH, Jennings JC, Roga V, Junek AJ, Schuurmans DM.  $\alpha$ -Sarcin, a new antitumour agent. II. Fermentation and antitumour spectrum (1965) *Appl Microbiol*, 13: 322-326.
- Onda M, Nagata S, FitzGerald DJ, Beers R, Fisher R, Vincent JJ, Lee B, Nakamura M, Hwang J, Kreitman RJ, Hassan R, Pastan I. Characterization of the B cell epitopes associated with a truncated form of *Pseudomonas* exotoxin (PE38) used to make immunotoxins for the treatment of cancer patients. (2006) *The Journal of Immunology*, 177:8822-8834.
- Onda, M., Beers, H., Xiang, L., Nagat, S., Wang, QC. And Pastan, I. (2008) An immunotoxin with greatly reduced immunogenicity by identification and removal of B cell epitopes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105: 11311-11316
- Orlandi R, Canevari S, Conde FP, Leondi F, Mezzanzanica D, Ripamonti M, Colnaghi MI. Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAB (1988) *Cancer Immunol Immunother*, 26, 114-120.
- Osterman, H.L. y Walz, F.G.Jr. (1978) Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T1. Kinetic studies using GpA, GpC, GpG and GpU as substrates. *Biochemistry* 17, 4124-4130.
- O'Toole JE, Esseltine D, Lynch TJ, Lambert JM, Grossbard ML. Clinical trials with blocked ricin immunotoxins (1998) *Curr Top Microbiol Immunol* 234, 35-56.
- Pace CN, Heinemann U, Hahn U, Saenger W. Ribonuclease T1: structure, function and stability. (1991) *Angew Chem Int Ed Engl* 30, 343-454.
- Panjideh H, Coelho VC, Dervede J, Bachran C, Förster G, Franke J, Fasold P, Fuchs H, Thiel E, Deckert PM. Biodistribution and efficacy of [<sup>131</sup>I]A33scFv::CDy, a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer. (2008) *International Journal of Oncology*, 32:925-930.

- Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer (2006) *Nature Reviews*, 6: 559–565.
- Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer (2007) *Annu Rev Med*, 2007; 58: 221–37.
- Pentón D, Pérez-Barzaga V, Díaz I, Reytor ML, Campos J, Fando R, Calvo L, Cilli EM, Morera V, Castellanos-Serra LR, Pazos F, Lanio ME, Alvarez C, Pons T, Tejuca M. (2011) Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein Eng Des Sel*. 24(6):485-93
- Pereira-Fantini PM, Judd LM, Kalantzis A, Peterson A, Ernst M, Heath JK, Giraud AS. A33 Antigen-deficient mice have defective colonic mucosal repair (2010) *Inflamm Bowel Dis* 16:604-612.
- Perez-Cañadillas JM, Santoro J, Campos-Olivas R, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Gavilanes JG, Rico M, Bruix M. The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -Sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity (2000) *J Mol Biol*, 299: 1061-1073.
- Petrausch U, Dervede J, Coelho V, Panjideh H, Frey D, Fuchs H, Thiel E, Deckert PM. A33scFv Green fluorescent protein, a recombinant single-chain fusion protein for tumor targeting (2007) *Protein Eng Des Sel*, 20(12): 583 - 590.
- Peumans, W.J., Hao, Q. and Van Damme, E.J. (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J*. 15, 1493-1506.
- Pirker R (1988) Immunotoxins against solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 114:385-393
- Pla IA, Damasceno LM, Vannelli T, Ritter G, Batt CA, Shuler ML. Evaluation of Mut<sup>+</sup> and MutS *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration (2006) *Biotechnol Prog*, 22 (3): 881–888.
- Potala S, Sahoo SK, Verma RS (2008) Targeted therapy of cancer using diphtheria toxin-derived immunotoxins. *Drug Discov Today* 13:807-815
- Popkov M, Jendreyko N, McGavern DB, Rader C, Barbas CF. Targeting Tumor Angiogenesis with Adenovirus-Delivered Anti-Tie-2 Intrabody (2005) *Cancer Res* 65:972-981
- Pulvirenti T, Giannotta M, Capestrano M, Capitani M, Pisanu A, Polishchuk RS, San Pietro E, Beznoussenko GV, Mironov AA, Turacchio G, Hsu VW, Salles M, Luini A. A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway (2008) *Nature Cell Biology* 10; 912-922.
- Preithner S, Elm S, Lippold S, Locher M, Wolf A, da Silva AJ *et al.* (2006). High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G. *Mol Immunol* 43: 1183–1193.
- Qiu XQ, Wang H, Cai B, Wang LL, Yue ST. Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting (2007) *Nature Biotechnology*, 25:921-929.
- Qu, Z., Griffiths, GL., Wegener, WA., Chang, CH., Govindan, SV., Horak, ID., Hansen, HJ and Goldenberg, DM. (2005) Development of humanized antibodies as cancer therapeutics. *Methods* 36: 84-95
- Rabouille C, Klumperman J. The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport (2005) *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:812-817.
- Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF; The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies (2000) *J Biol Chem*, 275: 13668-13676.

Rageul J, Mottier S, Jarry A, Shah Y, Théoleyre S, Masson D, Gonzalez FJ, Laboisie C, Denis MG. KLF4-dependent, PPAR $\gamma$ -induced expression of GPA33 in colon cancer cell lines. (2009) *Int J Cancer*, 125:2802-2809

Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A. *Chem. Rev.* 98, 1045-1066.

Rathore, D.; Nayak, S.K. and Batra, J.K. Overproduction of fungal ribotoxin  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*: generation of an active immunotoxin. (1997) *Gene*, 190, 31–35.

Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23: 1073–1078.

Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B., and Pastan, I. (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments, *Nat Biotechnol* 14: 1239-1245.

Ritter G, Cohen LS, Nice EC, Catimel B, Burgess AW, Moritz RL, Ji H, Heath JK, White SJ, Welt S, Old LJ, Simpson RJ. Characterization of posttranslational modifications of human A33 antigen, a novel palmitoylated surface glycoprotein of human gastrointestinal epithelium. (1997) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236: 682-686

Ritter G, Cohen LS, Williams C JR, Richards EC, Old LJ, Welt S. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. (2001) *Cancer Res* 61, 6851-6859.

Rodríguez, R., López-Otín, Barber, D., Fernández-Luna, J.L., González, G. y Méndez, E. (1982) Aminoacid sequence homologies in  $\alpha$ -sarcin, restrictocin and mitogillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 315-321.

Roga V, Hedeman LP, Olson BH. Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms (1971) *Cancer Chemoter Rep*, 55: 101-113.

Roopenian DC, Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):715-25.

Rosenblum MG, Cheung LH, Liu Y, Marks JW. Design, Expression, Purification, and Characterization, *in Vitro* and *in Vivo*, of an Antimelanoma Single-chain Fv Antibody Fused to the Toxin Gelonin (2003) *Cancer Res*, 63:3995-4002.

Röthlisberger D, Honegger A, Plückthum. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability (2005) *J Mol Biol* 347:773-789.

Rybak S, Newton DL. Natural and Engineered Cytotoxic Ribonucleases: Therapeutic Potential (1999) *Experimental Cell Research* 253:325-335.

Rybak SM, Arndt MA, Schirrmann t; Dübel S, Krauss J (2009) Ribonucleases and immunorribonucleases as anticancer drugs. *Curr Pharm Des* 15, 2665-2675.

Sacco, G., Drickamer, K. y Wool, I.G. (1983). The primary structure of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin. *J.Biol.Chem.* 258, 5811-5818.

Sakamoto J, Kojima H, Kato J, Hamashima H, Suzuki H. Organ-specific expression of the intestinal epithelium-related antigen A33, a cell surface target for antibody-based imaging and treatment in gastrointestinal cancer (2000) *Cancer Chemoter Pharmacol*, 46: 27-32.

Sakamoto J, Oriuchi N, Mochiki E, Asao T, Scott AM, Hoffman EW, Jungbluth AA, Matsui T, Lee FT, Papenfuss A, Kuwano H, Takahashi T, Endo K, Old LJ. A phase I radioimmunolocalization trial of humanized monoclonal antibody huA33 in patients with gastric carcinoma (2006) *Cancer Sci*, 97 (11): 1248-1254.

Sarnovsky R, Tendler T, Makowski M, Kiley M, Antignani A, Traini R, Zhang J, Hassan R, FitzGerald DJ. Initial characterization of an immunotoxin constructed from domains II and III of cholera exotoxin. (2010) *Cancer Immunol Immunother*, 59:737-746.

Sato K, Egami F. (1957) The specificity of T1 ribonuclease. *C R Seances Soc Biol Fil*. 151(10):1792-6.

Scanlan MJ, Ritter G, Yin BWT, Williams C, Cohen LS, Coplan KA, Fortunato SR, Frosina D, Lee SY, Murray AE, Chua R, Filonenko VV, Sato E, Old LJ, Jungbluth AA. Glycoprotein A34, a novel target for antibody-based cancer immunotherapy (2006) *Cancer Immunity*, 6.

Schindler, D. G., and Davies, J. E. (1977) Specific cleavage of ribosomal RNA caused by alpha sarcin, *Nucleic Acids Res* 4: 1097-1110.

Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon JS, Hannah A, Chong G, U P, Papenfuss A, Rigopoulos A, Sturrock S, Murphy R, Wirth V, Murone C, Smyth FE, Knight S, Welt S, Ritter G, Richards E, Nice, EC, Burgess AW, Old LJ A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. (2005) *Clin Cancer Res* 11, 4810-4817.

Selvaggi K, Saria EA, Schwartz R, Vlock DR, Ackerman S, Wedel N, Kirkwood JM, Jones H, Ernstoff MS. Phase I/II study of murine monoclonal antibody-ricin A chain (XOMAZYME-Mel) immunoconjugate plus cyclosporine A in patients with metastatic melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1993 Apr;13(3):201-207.

Siegall CB, Liggitt D, Chace D, Mixan B, Sugai J, Davidson T, Steinitz M (1997) Characterization of vascular leak syndrome induced by the toxin component of *Pseudomonas* exotoxin-based immunotoxins and its potential inhibition with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Cancer Res*. 3(3):339-4

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2012. (2012) *CA Cancer J Clin* 62:10-29.

Singh R, Samant U, Hyland S, Chaudhari PR, Wels WS, Bandyopadhyay D. Target-specific cytotoxic activity of recombinant immunotoxin scFv(MUC1)-ETA on breast carcinoma cells and primary breast tumors (2007) *Mol Cancer Ther* 6:562-569.

Singh R, Zhang Y, Pastan I, Kreitman RJ. (2012) Synergistic antitumor activity of Anti-CD25 recombinant immunotoxin LMB-2 with chemotherapy. *Clin Cancer Res* 18(1):152-160

Shimba N, Torigoe H, Takahashi H, Masuda K, Shimada I, Arata Y, Sarai A. (1995) Comparative thermodynamic analyses of the Fv, Fab\* and Fab fragments of anti-dansyl mouse monoclonal antibody. *FEBS Lett*. 1995 Mar 6;360(3):247-50

Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, SakuradaMet *al*. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278: 3466-3473

Schirrmann T, Krauss J, Arndt MA, Rybak SM, Dübel S (2009) Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases) *Expert Opin Biol Ther* 9, 79-95

Shlyakhovenko VA Ribonucleases in tumor growth. (2009) *Exp Oncol* 31, 127-133.

Smith GP (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.

Steyaert J. A decade of protein engineering on ribonuclease T1-atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. (1997) *Eur J Biochem* 247, 1-11.

- Tejuca M, Díaz I, Figueredo R, Roque L, Pazos F, Martínez D, Iznaga-Escobar N, Pérez R, Alvarez C, Lanio Me (2004) Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *Int Immunopharmacol.* 4(6):731-44.
- Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC and Vitetta ES. Immunotoxins: An Update. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:49-71.
- Tran D, Carpentier JL, Sawano F, Gorden P, Orci L. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7957–7961
- Tschmelitsch J, Barendsward E, Williams CJ, Yao TJ, Cohen AM, Old LJ, Welt S. Enhanced antitumor activity of combination radioimmunotherapy (<sup>131</sup>I-labeled monoclonal antibody A33) with chemotherapy (Fluorouracil). (1997) *Cancer Res*, 57:2181-2186.
- Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I. (2000) Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *PNAS* 97:8548-8553
- Turnay J, Olmo N, Jiménez A, Lizarbe MA, Gavilanes JG. Kinetic study of the cytotoxic effect of  $\alpha$ -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*, on tumor cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. (1993) *Mol Cell Biochem* 122, 39-47.
- Uchiumi, T., Honma, S., Endo, Y. y Hachimori, A. (2002) Ribosomal proteins at the stalk region modulate functional rRNA structures in the GTPase center. *J. Biol. Chem.* 277, 41401-41409.
- Vallera DA, Li C, Jin N, Panoskaltis-Mortari A, Hall WA (2002) Targeting urokinase-type plasminogen activator receptor on human glioblastoma tumors with diphtheria toxin fusion protein DTAT. *J Natl Cancer Inst*; 94: 597–606
- Vey M, Schäfer W, Berghöfer S, Klenk HD, Garten W. Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation (1994) *J Cell Biol.* 127(6 Pt 2):1829-42.
- Viegas A, Herrero-Galán E, Oñaderra M, Macedo AL, Bruix M. (2009) Solution structure of hirsutellin A--new insights into the active site and interacting interfaces of ribotoxins. *FEBS J.* 276(8):2381-90
- Wawrzynczak EJ, Henry RV, Cumber AJ, Parnell GD, Derbyshire EJ, Ulbrich N. Biochemical, cytotoxic and pharmacokinetic properties of an immunotoxin composed of a mouse monoclonal antibody Fib75 and the ribosome-inactivating protein alpha-sarcin from *Aspergillus giganteus* (1991) *Eur J Biochem*, 196, 203-209.
- Weber F, Asher A, Bucholz R, Berger M, Prados M, Chang S, Bruce J, Hall W, Rainov NG, Westphal M, Warnick RE, Rand RW, Floeth F, Rommel F, Pan H, Hingorani VN, Puri RK Safety, tolerability, and tumor response of IL4- *Pseudomonas* exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma 2003. *J Neurooncol*; 64: 125–137.
- Weldon JE, Pastan I A guide to taming a toxin-recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. (2011) *FEBS Journal* 278:4683-4700.
- Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohen A, Larson SM, Old LJ, et al. (1994) Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts. *J Clin Oncol.* 12:1193-203
- Welt S, Ritter G, Williams C Jr, Cohen LS, John M, Jungbluth A, Richards EA, Old LJ, Kemeny NE. Phase I study of anticolon cancer humanized antibody A33. (2003) *Clin Cancer Res* 9, 1338-1346.
- Welt S, Ritter G, Williams C Jr, Cohen LS, Jungbluth A, Richards EA, Old LJ, Kemeny NE. (2003) Preliminary report of a phase I study of combination chemotherapy and humanized A33 antibody immunotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 9:1347-53.

Weng WK, Levy R (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21: 3940-3947

Wilkinson IC, Hall CJ, Veverka V, Shi JY, Muskett FW, Stephens PE, Taylor, Henry AJ, Carr MD. High Resolution NMR-based Model for the Structure of a scFv-IL-1" Complex. (2009) *J Biol Chem* 284, 31928-31935.

Wirth J, Martínez del Pozo Á, Mancheño JM, MartínezRuiz A, Lacadena J, Oñaderra M y Gavilanes JG (1997) Sequence determination and molecular characterization of gigantín, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818. *Arch Biochem Biophys* 343: 188–193.

Wool, I.G. (1997) Structure and mechanism of action of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 131-162.

Yamamoto K, Fujii R, Toyofuku Y, Saito T, Koseki H, Hsu VW, Ae T. The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum (2001) *The EMBO Journal*, 20 (12): 3082-3091.

Yang X and Moffat K (1996) Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific *Aspergillus* ribotoxin, restrictocin. *Structure* 4: 837–852.

Yang, X., Gerczei, T., Glover, L.T. y Correll, C.C. (2001) Crystal structures of restrictocin-inhibitor complexes with implications for RNA recognition and base flipping. *Nat. Struct. Biol.* 8, 968-973.

Yeung TM, Shaan CG, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 3722-3727.

Yoshida H The ribonuclease T1 family. (2001) *Methods Enzymol* 341, 28-41.

Yuki S, Kondo Y, Kato F, Kato M, Matsuo N. Noncytotoxic ribonuclease, RNase T1, induces tumor cell death via hemagglutinating virus of Japan envelope vector. (2004) *Eur J Biochem* 271, 3567-3572.

Zewe M, Rybak SM, Dübel S, Coy JF, Welschof M, Newton DL, Little M. Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion (1997) *Immunotechnology* 3:127-136.

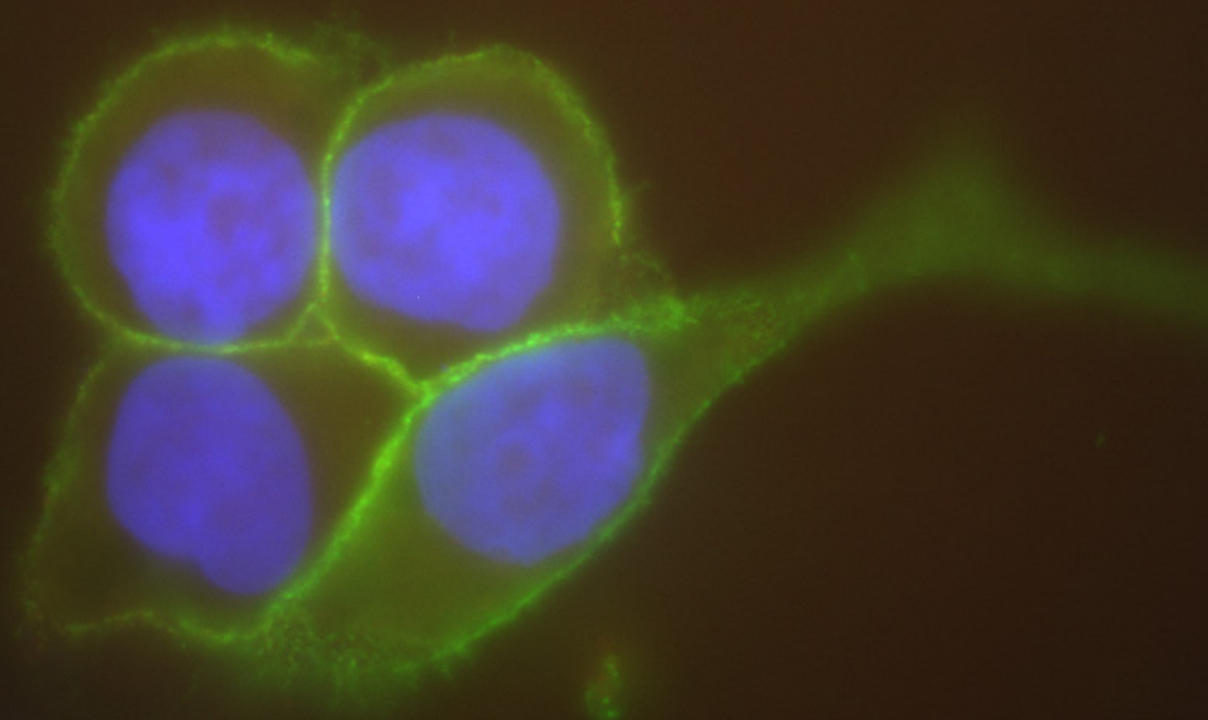
Zhao W, Chen TL, Vertel BM, Colley KJ. (2006) The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail. *J Biol Chem.* 281(41):31106-18

Las inmunotoxinas son moléculas quiméricas formadas por un dominio marcador que dirige la acción de un segundo dominio, tóxico, para que este ejerza su acción sobre la célula diana. Estas inmunotoxinas son uno de los máximos exponentes en la búsqueda de la *bala mágica*, concepto acuñado por Paul Ehrlich que proponía la posibilidad de encontrar una molécula que actuara de forma específica sobre una célula diana sin afectar a otros tipos celulares.

Las ribotoxinas son un tipo de RNAsas que se caracteriza por su elevada actividad específica sobre el ribosoma, al que inactivan con un único corte específico, inhibiendo la biosíntesis de proteínas.

La presente Tesis Doctoral se centra en la caracterización estructural y funcional de inmunotoxinas basadas en ribotoxinas y RNAsas microbianas extracelulares, como parte del dominio tóxico. Estas inmunotoxinas dirigidas por los dominios variables (scFv) del anticuerpo mAbA33, van dirigidas hacia el antígeno GPA33, presente en el 95% de los tumores de colon y ausente en otros tejidos.

El presente estudio pretende ahondar en el conocimiento y comprensión de los mecanismos moleculares de estas *balas mágicas*, desde el reconocimiento y unión a su antígeno específico, hasta su posible utilización como terapia antitumoral.



# The Therapeutic Potential of Fungal Ribotoxins

Nelson Carreras-Sangrà, Elisa Álvarez-García, Elías Herrero-Galán, Jaime Tomé, Javier Lacadena, Jorge Alegre-Cebollada, Mercedes Oñaderra, José G. Gavilanes\* and Álvaro Martínez-del-Pozo\*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

**Abstract:** Ribotoxins constitute a family of toxic extracellular fungal RNases that exert a highly specific activity on a conserved region of the larger molecule of rRNA, known as the sarcin-ricin loop. This cleavage of a single phosphodiester bond inactivates the ribosome and leads to protein synthesis inhibition and cell death. In addition to this ribonucleolytic activity, ribotoxins can cross lipid membranes in the absence of any known protein receptor. This ability is due to their capacity to interact with acid phospholipid-containing membranes. Both activities together explain their cytotoxic character, being rather specific when assayed against some transformed cell lines. The determination of high-resolution structures of some ribotoxins, the characterization of a large number of mutants, and the use of lipid model vesicles and transformed cell lines have been the tools used for the study of their mechanism of action at the molecular level. The present knowledge suggests that wild-type ribotoxins or some modified variants might be used in human therapies. Production of hypoallergenic mutants and immunotoxins designed against specific tumors stand out as feasible alternatives to treat some human pathology in the mid-term future.

**Keywords:** Asp f 1; fungal allergy; immunotoxin; restrictocin; RNase;  $\alpha$ -sarcin.

## INTRODUCTION

Ribotoxins are a family of toxic extracellular fungal RNases that exert a highly specific ribonucleolytic activity on the larger molecule of rRNA of the ribosome leading to protein synthesis inhibition and cell death by apoptosis [1-4]. They were discovered during a screening program of the Michigan Department of Health searching for antibiotics and antitumoral agents. The culture filtrates of a mould identified as *Aspergillus giganteus* MDH18894 contained a substance inhibitory to sarcoma and carcinoma induced in mice [5]. The molecule responsible for these effects was proved to be a protein, named  $\alpha$ -sarcin, that still today is the best known ribotoxin (Fig. 1A) [6]. Unfortunately, the rather unspecific cytotoxicity of these proteins when administered to animals harboring different tumors limited their potential clinical use [7].

$\alpha$ -Sarcin, restrictocin, and Asp f 1 are the most exhaustively characterized ribotoxins [1-4,8-10], but many others have been identified and partially characterized in different fungal species [11-16], including the insecticidal protein hirsutellin A (HtA) produced by the invertebrate fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* [15,17,18]. All ribotoxins show a high degree of amino acid sequence identity (above 85%) with precisely the only exception of HtA that displays only about 25% sequence identity with the previously known family members [15,18].

Ribotoxins are not the only extracellular RNases produced by fungi. For example, a mould so common as *Aspergillus oryzae*, that is used in the production of various comestible foods, is also the producer of RNase T1 [19], probably one of the most exhaustively characterized proteins. RNase T1 is therefore the best known member of the family of fungal extracellular RNases [20,21], a group that obviously includes ribotoxins. All of them also show a high degree of sequence [15,16,22,23] and structural similarity [24-29] but, apart from ribotoxins, none of these other fungal RNases has been reported to show cytotoxic activity.

In addition to RNase T1, RNase U2 from *Ustilago sphaerogena* also deserves to be mentioned because it is the non-toxic fungal extracellular RNase most closely related to ribotoxins of from a phylogenetic point of view [3,15,16,23,30]. RNase U2 is a small and highly acidic protein [31] that shows a strong preference for 3'-linked purine nucleotide phosphodiester bonds [32,33], specificity that is rather unusual within the group of microbial RNases. The observation that ribotoxins are larger basic proteins, containing longer and charged loops that are not present in the non-cytotoxic fungal RNases, suggested that these loops are directly related to their cytotoxic properties [30]. It would appear that an RNase T1-like protein would have acquired ribosome specificity by the insertion of short recognition domains that would target it to cleave more specific substrates. This hypothesis has become even more appealing after the recent biochemical characterization of HtA [18], a much smaller ribotoxin presumably with shorter loops.

In summary, all the features outlined above suggest that the study of the evolution and the mechanism of action of ribotoxins is of particular interest, as they appear to be naturally engineered targeted toxins evolved from the other mi-

\*Address correspondence to these authors at the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain; Tel: +34 91 394 4158; Fax: +34 91 394 4159; E-mail: alvaro@bbm1.ucm.es or ppgf@bbm1.ucm.es

crobial nontoxic RNases to enter cells and specifically inactivate the ribosomes [34,35]. Identification of the structural features that have allowed these proteins to become such efficient natural killers would be a major step towards their utilization, native or modified, as weapons against different human pathologies.

### RIBONUCLEOLYTIC ACTIVITY

Ribotoxins inhibit protein biosynthesis in ribosomal preparations by specifically cleaving a single phosphodiester bond of the large rRNA fragment [36,37]. This bond is also the specific target of the plant family of N-glycosidases known as ribosome-inactivating proteins (RIP) [38,39] best represented by ricin, the toxin found in the seeds from the castor bean plant, *Ricinus communis*. This region, known as the sarcin-ricin loop or SRL (Fig. 2) is unique and it is located at an evolutionarily conserved site with important roles in ribosome function [40].

Ribotoxins behave as highly specific RNases when assayed against cell-free intact ribosomes, retaining this specificity when assayed against naked rRNA containing the SRL sequence. However, they can also produce extensive non-specific digestion of almost any RNA when used at higher concentrations [9,41]. Ribotoxins follow the same general acid-base type endonucleolytic reaction scheme as the other members of the RNase T1 family [2,3,42,43]. First, there is a transphosphorylation reaction to form a 2',3'-cyclic phosphate intermediate. Second, this intermediate is hydrolyzed to the corresponding 3'-phosphate. The appearance of this cyclic intermediate, common to all proteins of the RNase T1 family so far studied is implicit in the denomination of all these enzymes as cyclizing RNases [43]. However, the catalytic efficiency of RNases T1 and U2 against naked RNA, homopolynucleotides, or dinucleotides is several orders of magnitude higher. On the other hand, ribotoxins cleave and consequently inactivate the ribosome with a second order rate constant that matches the catalytic efficiency of the fastest known enzymes [44].

In the case of  $\alpha$ -sarcin, during the first step of the reaction, Glu-96 acts as a general base and His-137 as a general acid. The hydrolysis of the cyclic derivative is then catalyzed by the same groups, but their roles are reversed [43,45]. In fact, this Glu/His combination is the most common pair of catalytic residues found in microbial RNases [20]. Another conserved residue, His-50, is required to assist the electrostatic stabilization of the transition state [45]. Mutational studies have also revealed that three other active site residues, Tyr48, Arg121, and Leu145, although not essential, appear to be determinants of the ribotoxin activity of  $\alpha$ -sarcin [46-48]. Studies on the crystal structures of complexes of restrictocin with inhibitors led to the proposal that these ribotoxins may use base flipping to enable cleavage at the correct site of the SRL substrates [49]. All studies so far suggest that these three residues would enable the base flipping performed by His50/Glu96/His137 that permits cleavage of the unique phosphodiester bond at the SRL [49].

### INTERACTION WITH PHOSPHOLIPIDS

In addition to their ribonucleolytic activity, ribotoxins cross lipid membranes in the absence of any known protein

receptor [1,3,50]. Thus, although any ribosome could be potentially inactivated by these proteins, due to the universal conservativeness of the SRL, they are especially active on transformed or virus-infected cells [5,51,52]. This observation has been explained in terms of an altered permeability of their target cells combined with the ability of ribotoxins to interact with acid phospholipid-containing membranes [3,4,52-54]. Indeed, this ability seems to be related to the antitumoral character that led to their discovery [5,55].

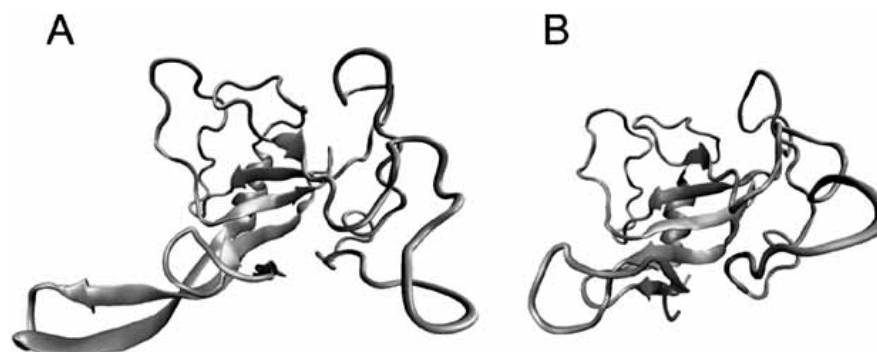
In this regard, the use of lipid model systems proved that  $\alpha$ -sarcin specifically interacts with negatively charged phospholipid vesicles at neutral or slightly acidic pH, resulting in protein-lipid complexes that can be isolated by centrifugation in a sucrose gradient [53]. Binding experiments revealed a strong ribotoxin-lipid vesicle interaction that caused vesicle aggregation, followed by their fusion into much larger lipidic structures [53]. Indeed, the peptide bonds of the protein were protected against trypsin hydrolysis upon binding to these vesicles [53,55], despite the high number of basic residues present along its sequence [23]. Altogether, all these results proved how  $\alpha$ -sarcin, a water-soluble and hydrophilic protein, can interact with phospholipid bilayers through a combination of electrostatic and hydrophobic forces [56]. In good agreement with this scenario, the innate ability of  $\alpha$ -sarcin to translocate across a phospholipid membrane in the absence of any other protein has also been demonstrated [50].

The current working hypothesis sustains that a higher content of negatively charged phospholipids in transformed cell membranes [53,54,57-60] would explain the favored toxicity of these proteins against tumors. Unfortunately, there is no direct evidence yet that this abundance of acidic phospholipids is the main explanation for the antitumoral activity of  $\alpha$ -sarcin.

### STRUCTURAL FEATURES

As mentioned above, ribotoxins show a high degree of identity in their approximately 150 amino acid sequence [14-16,23,61-64], including the conservation of their two disulfide bridges [3,30]. This observation includes HtA [15,18], although this protein is 20 residues shorter than most of the other known ribotoxins. Sequence differences are mainly concentrated at the loops of the ribotoxins suggesting that these differences are responsible for the minor differences observed among their activities [15].

This similarity is also evident between the two ribotoxins whose three-dimensional structure has been solved, restrictocin [26,49] and  $\alpha$ -sarcin [29,65-67]. Both proteins folds into a common  $\alpha + \beta$  structure with a central five-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and an  $\alpha$ -helix of almost three turns. Residues 1-26 are especially interesting because they form a long  $\beta$ -hairpin that can be considered as two consecutive minor  $\beta$ -hairpins connected by a hinge region (Fig. 1A). The distal region of this  $\beta$ -hairpin has been deleted, obtaining the  $\Delta(7-22)$  variant of  $\alpha$ -sarcin [68], a mutant retaining the same conformation as the wild-type protein (Fig. 1B) [69]. Further support for the importance of this N-terminal extension was obtained by docking and enzymatic studies which revealed that this  $\beta$ -hairpin most probably establishes interactions with specific ribosomal proteins in order to direct the ri-



**Fig. (1)** Three-dimensional structures of (A) wild-type (PDB ID 1DE3) and (B)  $\Delta(7-22)$  (PDB ID 1R4Y)  $\alpha$ -sarcins [29,69]. The diagrams were generated with the VMD program [140].

botoxin to the SRL [67, 68]. This prediction would also explain the highly diminished cytotoxic properties observed for the deleted variant [68].

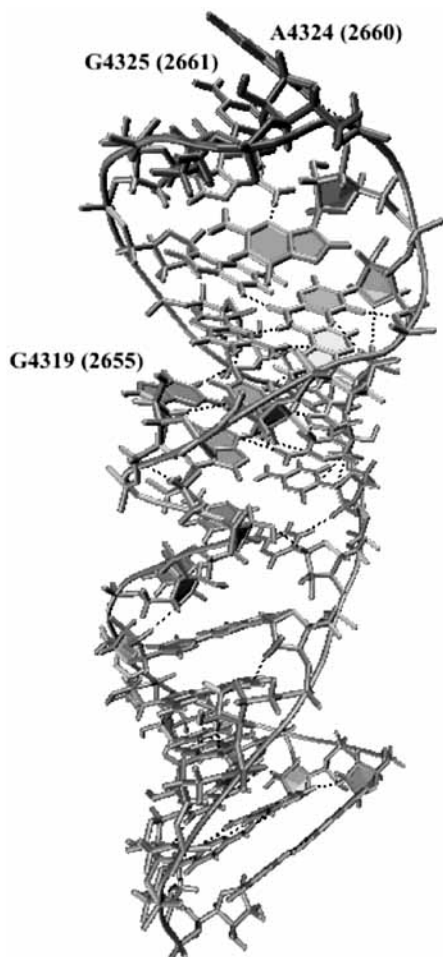
Even though  $\alpha$ -sarcin and restrictocin show almost identical structures, some small but nevertheless significant func-

tional and structural differences are evident. These differences concern the long non-structured loops and especially the N-terminal  $\beta$ -hairpin, a region of high mobility [26,65]. Interestingly, these aperiodic loops show a well defined conformation despite their exposed character and their lack of repetitive secondary structure [65].

Ribotoxins share their structural core with the non-toxic RNases of the RNase T1 family, in good agreement with their sequence similarities. Both RNase T1 and RNase U2 display identical regular secondary structure elements to ribotoxins despite their different amino acid sequence lengths. The geometric arrangement of the residues involved in the active site is also shared by both families of RNases. In fact, all fungal extracellular RNases whose three-dimensional structure is known exhibit quite different enzymatic specificities, but all of them share this common structural fold concerning the architecture and connectivity of the secondary structure elements [3,26,28,29]. The most significant structural differences among them are, again, related to both the presence of the longer N-terminal  $\beta$ -hairpin in ribotoxins and the different length and charge of their aperiodic loops.

In addition to the deletion mutant mentioned above, many more  $\alpha$ -sarcin mutants have been isolated and characterized. These mutational studies have revealed the involvement of several residues, which are conserved among the different microbial extracellular RNases, in catalysis. Thus, it is well known that His137 and Glu96 are the only residues that are essential for the cleavage reaction performed by  $\alpha$ -sarcin [35,45,70-75], whereas His-50, Tyr-48, Arg-121, and Leu-145 mostly contribute to the stabilization of the transition state [45-48], as stated above. Most of these residues are located in the central  $\beta$ -sheet and their side-chains point towards the concave face of the protein structure where the substrate is supposed to dock [29].

With regard to the protein regions involved in the interaction with membranes, the use of water-soluble synthetic peptides and mutant variants of  $\alpha$ -sarcin within the main  $\beta$ -sheet of this protein suggested that this region (residues 116-139) would be directly involved in this interaction [76-78]. Interestingly, this sheet has also been predicted to be one of the few apolar regions of the protein [30,76]. The study of the mentioned mutants suggested that it would be located within the hydrophobic core of the phospholipid bilayer once the protein-lipid complexes were formed [46,78]. Within this



**Fig. (2)** Diagram showing the structure of the SRL (PDB ID 430d) [141]. Numbers correspond to rat or *Escherichia coli* (in brackets) nucleotide positions within the 28S (23S) rRNA gene. The bond cleaved by ribotoxins is that on the 3'-side of G4325 (2661). Ricin depurinates A4324 (2660). Both nucleotides have been represented in a darker gray tone. The bulged G is G4319 (2655). The diagram was generated with the VMD program [140].

same idea, mutants affecting  $\alpha$ -sarcin active site residue Arg121 (R121K and R121Q), showed that the loss of the positive charge at that position produced a dramatic impairment of the protein's ability to interact with phospholipid membranes [46]. Other than this hydrophobic core, mutations affecting single residues located at the N-terminal  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin and the  $\Delta(7-22)$  variant suggested that this protein portion would also be another region involved in the interaction with cell membranes, as they display a different pattern of interaction with lipid vesicles [68,79]. Finally, loop 2 has been proposed by several authors [26,29,30,72] to be also one of the protein regions involved in the interaction with lipids but this possibility has not been directly studied yet.

### CYTOXICITY AGAINST INTACT CELLS

$\alpha$ -Sarcin is able to inactivate the ribosomes of a great variety of organisms in cell-free systems [4,35], but it displays marked selectivity when intact cells are used as targets. This specificity seems to be determined by its ability to penetrate cells, as explained above. Thus,  $\alpha$ -sarcin is especially active against transformed or virus-infected mammalian cells in the absence of any other permeabilizing agent [51,52,80-83]. This effect is saturable and consistent with passage across the cell membrane as the rate-limiting step. However, no membrane damage or mitochondrial activity alterations are detected [82]. These experiments confirmed that  $\alpha$ -sarcin exhibits an intrinsic and rather specific cytotoxic character when assayed against some transformed cell lines, most probably due to the presence of acidic phospholipids on the outer leaflet of the membrane [53,54,57,58]. Consequently, all  $\alpha$ -sarcin mutants studied that displayed an altered phospholipid interaction ability, such as that one affecting the positive charge of the active site residues Arg-121 (R121Q) [46] or, again, the  $\Delta(7-22)$  deletion mutant [68], showed diminished cytotoxic effects on human rhabdomyosarcoma cells [68,79]. Obviously, mutation of the catalytically essential His-137 (H137Q) rendered a non-cytotoxic variant too [52].

### THE A. FUMIGATUS ALLERGEN ASP F 1

Fungi represent one of the principal sources of allergens. Invasive infection is usually fatal unless treated early, and even then, antifungal therapy is often unsuccessful. The incidence of fungal infections has indeed risen lately, owing to the increase in the number of immunocompromised patients [84]. Furthermore, a link between fungal allergy and severe asthma is accepted, although still poorly understood [85,86]. *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic human pathogen and one of the most common sources of allergy and asthma in humans [87,88]. This fungus is also the producer of Asp f 1, a ribotoxin and one of its most important allergens [8,64]. Asp f 1, for example, has been found in the urine of patients with disseminated aspergillosis [8,64,89], although it has also been proven that it is not a major virulence factor in *A. fumigatus* infections [90-92]. However, this protein is clearly involved in the pathogenicity of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), the most severe form of allergic inhalant diseases, as these patients show high levels of Asp f 1-specific IgE [10,93].

Extracts of *A. fumigatus* are frequently used to diagnose allergic reactions, but they are highly complex mixtures very difficult to standardize [94]. Attempts to improve diagnosis are focusing on the use of homogeneous standard preparations of recombinantly produced allergens [95,96]. Unfortunately, recombinant native Asp f 1 is not devoid of cytotoxic activity, and indeed it can trigger anaphylaxis. Taking into account that the ribotoxin-characteristic N-terminal  $\beta$ -hairpin shows high amino acid sequence variability [3,15,16] and that it is highly flexible and exposed [29,69], it was considered as a major determinant of the immunoreactivity of these proteins [10]. This hypothesis was confirmed through the production and characterization of Asp f 1,  $\alpha$ -sarcin, and their corresponding  $\Delta(7-22)$  variants [10,68]. The two deleted proteins studied showed marked decreases in their reactivity to Asp f 1-IgE antibodies, suggesting that this N-terminal  $\beta$ -hairpin was involved in at least one allergenic epitope [10]. In addition, these experiments reinforced the significant prevalence of Asp f 1-specific IgE antibodies in sera from ABPA patients sensitized to *A. fumigatus* [2,10,96,97] a prevalence that was also observed for the Asp f 1 variants studied that, even more importantly, also retained most of the IgG epitopes [10].

The amount of data accumulated with these noncytotoxic deletion variants of Asp f 1 seems to favor their use in immunomodulating therapies for *Aspergillus* hypersensitivity and diagnosis, although *in vivo* assays are still required to assess this possibility. Within this idea, it must be remarked how these potentially hypoallergenic ribotoxin molecules have been recently cloned and produced in *Lactococcus lactis* [98], a microorganism 'generally regarded as safe' (GRAS). This GRAS status of *L. lactis*, altogether with the fact that the hypoallergenic variants of Asp f 1 are secreted by the engineered bacteria, confers this system with the features required to try immunotherapeutic protocols for Asp f 1-related allergic diseases. The feasibility of this approach will be next tested in animal models in our laboratory after the recent optimization of an allergic murine model sensitized against this allergen (E.A.-G., E. Batanero, R. García-Fernández, M., Villalba, R. Rodríguez, J.G.G. and A.M.P., unpublished data).

### RIBOTOXINS AS PART OF IMMUNOTOXINS

Immunotoxins are therapeutic agents with a high degree of specificity, composed of targeting moieties, such as antibodies or physiologically important ligands, linked to toxic proteins [99-101]. The design of this type of molecules is helping to close the gap required to achieve one of the oldest goals of antitumoral therapy, proposed by Ehrlich as early as 1906, of targeting cancer cells with a 'magic bullet' consisting of a tissue-specific carrier that would deliver toxic agents to neoplastic tissue [102]. Initially, immunotoxins were prepared by conjugating toxins to monoclonal antibodies, using the whole antibody molecule as targeting moiety [103]. However, it was soon realized that smaller sizes would allow higher index of penetration within solid tumors, easier clearance from blood vessels, and easier manipulation procedures. Within this idea, new approaches have been optimized with the advent of the late extraordinary biotechnological development, including the production of recombinant immunotoxins in different model organisms such as bacteria, yeast, or even insect cells (N.C.-S., A.M.P.,

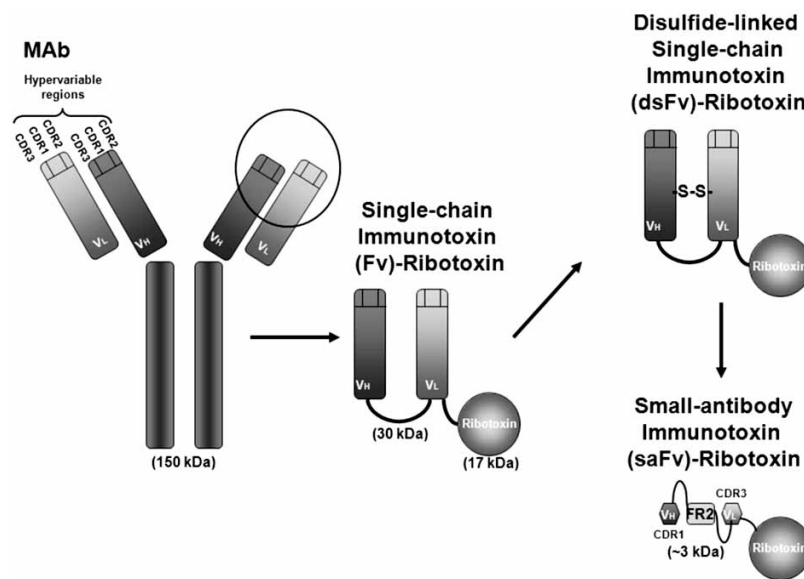
yeast, or even insect cells (N.C.-S., A.M.P., M.O., J.G.G. and J.L., unpublished data). This type of molecules is considered as a second generation of immunotoxins that contain only the antibody variable domains stabilized by a flexible peptide (scFv) or a disulfide bridge (dsFv) (Fig. 3) [104,105].

Regarding the toxic moiety, the most representative toxins employed have been ricin from plants [106-110] and *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin from bacteria [111-116]. However, although not so frequently employed, ribotoxins have several advantages for their use in the design of immunotoxins; namely, their small size, high thermostability, poor immunogenicity, resistance to proteases, and their highly efficient ability to inactivate ribosomes [3,4,117]. In fact, different ribotoxins have been used as components of immunotoxins [117-125]. The first ribotoxin-based immunotoxins were constructed by chemical conjugation with mitogillin [122], restrictocin [117-119], or  $\alpha$ -sarcin [121]. Some years later second-generation versions were also produced by fusing restrictocin cDNA with that encoding the scFv region of a monoclonal antibody directed against the human transferrin receptor, joined by a linear flexible peptide to promote the independent folding of the two immunotoxin moieties. These constructs were further engineered to enhance the intracellular processing and delivery of the ribotoxin [126]. Unfortunately, none of these ribotoxin-based immunotoxins has been yet studied beyond a preliminary characterization, most probably due to their large size, which could hinder their correct internalization into solid tumors, or to the low structural stability of the immunoconjugates prepared.

Much more recently, a new ribotoxin-based immunotoxin approach aimed at solving these problems has been developed. Within this idea, a single-chain immunotoxin composed of the variable domains of the B5 monoclonal antibody bound to  $\alpha$ -sarcin through a peptide containing a furin cleavage site (scFv-IMTX $\alpha$ S) (Fig. 3) has been efficiently

produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* (N.C.-S., A.M.P., M.O., J.G.G. and J.L., unpublished data). The B5 Lewis<sup>Y</sup> monoclonal antibody, a member of the Nemod antibody family, is specific against Lewis<sup>Y</sup> carbohydrates. These tumor-associated antigens are overexpressed on the surface of many carcinomas, including breast and colon solid tumors [127]. Various members of this family of antibodies have already been used as targeting moieties in many different immunotoxins [127-134] and at least three of them have been tested in phase I trials in patients with cancer yielding promising favorable results [130,135].

*P. pastoris* has emerged as a convenient robust heterologous expression host for immunotoxin production due to its efficient secretory system and its ability to express complex recombinant proteins with correct intra and intermolecular disulfide bonds. The constructs expressed in this system usually produce proteins that do not require additional *in vitro* unfolding and refolding steps, unlike most of the immunotoxins heterologously expressed in bacteria [136-138]. Indeed, *P. pastoris* possesses tightly regulated promoters such as that of the alcohol oxidase 1 gene (*AOX1*), which is perfectly suited for the controlled expression of foreign genes [139]. This explains why *P. pastoris* was the microorganism chosen to produce recombinant scFv-IMTX $\alpha$ S. The immunotoxin produced with this system displays the characteristic ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin as well as specific cytotoxicity against cell lines containing the Lewis<sup>Y</sup> antigen (N.C.-S., A.M.P., M.O., J.G.G. and J.L., unpublished data). Binding assays performed with different cellular extracts, with a commercial version of the Lewis<sup>Y</sup> antigen, or with a synthetic peptide with such a structure that mimics the antigen behavior, have confirmed the high specific affinity conferred to the immunotoxin by its targeting moiety. With the aim to obtain a more cytotoxic immunotoxin, different approaches and designs have been assayed in order to improve toxin delivery into the cytosol of the targeted cells or to increase the stability and/or affinity of the immunotoxin (N.C.-



**Fig. (3)** Scheme showing the different immunotoxin designs constructed using modified versions of the B5 Lewis<sup>Y</sup> monoclonal antibody and the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. CDR, complementary determining regions; V<sub>H</sub>, variable domain of high chain; V<sub>L</sub>, variable domain of light chain; S-S, disulfide bridge; FR2, framework region 2.

S., A.M.P., M.O., J.G.G. and J.L., unpublished data). The immunoribotoxins constructed by these means appear to be potential good candidates to be studied in the field of cancer therapies.

## CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

Ribotoxins are unique RNases displaying an exquisite specific ribonucleolytic action as well as an innate ability to cross membranes. Both activities altogether explain the anti-tumoral properties that led to their discovery. The initial deception produced by the abandonment of their use as potential anticancerous agents in human therapies has been slowly overcome through the detailed study of their mechanism of action at the molecular level for many years [1-4,9,34]. In this regard, the determination of several high-resolution ribosomal structures, the characterization of a great variety of mutants, and the use of different lipid model vesicles and transformed cell lines have been of great help. Thus, the current knowledge about their mechanism of action suggests that these ribotoxins, or probably some of their modified variants, might be used soon with therapeutic aims. Within this idea, the production of hypoallergenic variants to treat fungal allergies and different immunotoxins designed against specific tumors stand out as the most feasible alternatives in the mid-term future.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant BFU2006/04404 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). E. Álvarez-García, E. Herrero-Galán, N. Carreras-Sangrà, and J. Alegre-Cebollada are recipients of fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

## ABBREVIATIONS

ABPA	=	Allergic bronchopulmonary aspergillosis
AOX1	=	Alcohol oxidase 1 gene
CDR	=	Complementary determining regions
dsFV	=	Disulfide bridged FV
FR2	=	Framework region 2
FV	=	Antibody variable domains
HtA	=	Hirsutellin A
RIP	=	Ribosome-inactivating protein
RNase	=	Ribonuclease
scFV	=	Single chain FV
SRL	=	Sarcin-ricin loop

## REFERENCES

- Gasset, M.; Mancheño, J.M.; Lacadena, J.; Turnay, J.; Olmo, N.; Lizarbe, M.A.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1994) *Curr. Top. Pept. Protein Res.*, **1**, 99–104.
- Kao, R.; Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Cramer, R. and Davies, J. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 324–335.
- Martínez-Ruiz, A.; García-Ortega, L.; Kao, R.; Lacadena, J.; Oñaderra, M.; Mancheño, J.M.; Davies, J.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 335–351.
- Lacadena, J.; Álvarez-García, E.; Carreras-Sangrà, N.; Herrero-Galán, E.; Alegre-Cebollada, J.; García-Ortega, L.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. and Martínez del Pozo, A. (2007) *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 212–237.
- Olson, B.H.; Jennings, J.C.; Roga, V.; Junek, A.J. and Schuurmans, D.M. (1965) *Appl. Microbiol.*, **13**, 322–326.
- Olson, B.H. and Goerner, G.L. (1965) *Appl. Microbiol.*, **13**, 314–321.
- Roga, V.; Hedeman, L.P. and Olson, B.H. (1971) *Cancer Chemother. Rep.*, **55**, 101–113.
- Arruda, L.K.; Mann, B.J. and Chapman, M.D. (1992) *J. Immunol.*, **149**, 3354–3359.
- Wool, I.G. (1997) in *Ribonucleases. Structures and Functions*, (D'Alessio, G. & Riordan, J.F., eds.), Academic Press, New York, pp. 131–162.
- García-Ortega, L.; Lacadena, J.; Villalba, M.; Rodríguez, R.; Crespo, J.F.; Rodríguez, J.; Pascual, C.; Olmo, N.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2005) *FEBS J.*, **272**, 2536–2544.
- Lin, A.; Huang, K.C.; Hwu, L. and Tzean, S.S. (1995) *Toxicol.*, **33**, 105–110.
- Parente, D.; Raucchi, G.; Celano, B.; Pacilli, A.; Zaroni, L.; Canevari, S.; Adobati, E.; Colnaghi, M.I.; Dosio, F.; Arpicco, S.; Cattel, L.; Mele, A. and De Santis, R. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **239**, 272–280.
- Huang, K.-C.; Hwang, Y.Y.; Hwu, L. and Lin, A. (1997) *Toxicol.*, **35**, 383–392.
- Wirth, J.; Martínez del Pozo, A.; Mancheño, J.M.; Martínez-Ruiz, A.; Lacadena, J.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **343**, 188–193.
- Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1999) *J. Invertebr. Pathol.*, **74**, 96–97.
- Martínez-Ruiz, A.; Kao, R.; Davies, J. and Martínez del Pozo, A. (1999) *Toxicol.*, **37**, 1549–1563.
- Boucias, D.G.; Farmerie, W.G. and Pendland, J.C. (1998) *J. Invertebr. Pathol.*, **72**, 258–261.
- Herrero-Galán, E.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Olmo, N.; Boucias, D.G.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (2008) *Proteins*, [Epub ahead of print].
- Sato, K. and Egami, F. (1957) *J. Biochem.*, **44**, 753–767.
- Yoshida, H. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 28–41.
- Loverix, S. and Steyaert, J. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 305–323.
- Sato, S. and Uchida, T. (1975) *Biochem. J.*, **145**, 353–360.
- Sacco, G.; Drickamer, K. and Wool, I.G. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 5811–5818.
- Pace, C.N.; Heinemann, U.; Hahn, U. and Saenger, W. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 343–360.
- Noguchi, S.; Satow, Y.; Uchida, T.; Sasaki, C. and Matsuzaki, T. (1995) *Biochemistry*, **34**, 15583–15591.
- Yang, X. and Moffat, K. (1996) *Structure*, **4**, 837–852.
- Campos-Olivas, R.; Bruix, M.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Gavilanes, J.G. and Rico, M. (1996) *Protein Sci.*, **5**, 969–972.
- Campos-Olivas, R.; Bruix, M.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Gavilanes, J.G. and Rico, M. (1996) *FEBS Lett.*, **399**, 163–165.
- Pérez-Cañadillas, J.M.; Santoro, J.; Campos-Olivas, R.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M. and Bruix, M. (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 1061–1073.
- Martínez del Pozo, A.; Gasset, M.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **953**, 280–288.
- García-Ortega, L.; De los Ríos, V.; Martínez-Ruiz, A.; Oñaderra, M.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2005) *Electrophoresis*, **26**, 3407–3413.
- Rushizky, G.W.; Mozejko, J.H.; Rogerson, D.L. Jr. and Sober, H.A. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4966–4971.
- Uchida, T.; Arima, T. and Egami, F. (1970) *J. Biochem.*, **67**, 91–102.
- Lamy, B.; Davies, J. and Schindler, D. (1992) in *Genetically Engineered Toxins*, (Frankel, A.E., ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 237–258.
- Kao, R. and Davies, J. (1995) *Biochem. Cell. Biol.*, **73**, 1151–1159.
- Schindler, D.G. and Davies, J.E. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1097–1110.
- Endo, Y. and Wool, I.G. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 9054–9060.
- Endo, Y. and Tsurugi, K. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8128–8130.

- [39] Endo, Y.; Mitsui, K.; Motizuki, M. and Tsurugi, K. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 5908–5912.
- [40] Wool, I.G.; Glück, A. and Endo, Y. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 266–269.
- [41] Wool, I.G. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 164–165.
- [42] Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Barbero, J.L.; Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Oñaderra, M.; López-Otín, C.; Ortega, S.; García, J. and Gavilanes, J.G. (1994) *Gene*, **142**, 147–151.
- [43] Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, V.; Martínez-Ruiz, A.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1998) *FEBS Lett.*, **424**, 46–48.
- [44] Korennykh, A.V.; Piccirilli, J.A. and Correll, C.C. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 436–443.
- [45] Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Martínez-Ruiz, A.; Pérez-Cañadillas, J.M.; Bruix, M.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1999) *Proteins*, **37**, 474–484.
- [46] Masip, M.; Lacadena, J.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6190–6196.
- [47] Masip, M.; García-Ortega, L.; Olmo, N.; García-Mayoral, M.F.; Pérez-Cañadillas, J.M.; Bruix, M.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 161–169.
- [48] Álvarez-García, E.; García-Ortega, L.; Verdún, Y.; Bruix, M.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2006) *Biol. Chem.*, **387**, 535–541.
- [49] Yang, X.; Gerczei, T.; Glover, L.T. and Correll, C.C. (2001) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **8**, 968–973.
- [50] Oñaderra, M.; Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Lacadena, J.; Schiavo, G.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (1993) *Biochem. J.*, **295**, 221–225.
- [51] Fernández-Puentes, C. and Carrasco, L. (1980) *Cell*, **20**, 769–775.
- [52] Olmo, N.; Turnay, J.; González de Buitrago, G.; López de Silanes, I.; Gavilanes, J.G. and Lizarbe, M.A. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2113–2123.
- [53] Gasset, M.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1989) *Biochem. J.*, **258**, 569–575.
- [54] Gasset, M.; Oñaderra, M.; Thomas, P.G. and Gavilanes, J.G. (1990) *Biochem. J.*, **265**, 815–822.
- [55] Oñaderra, M.; Gasset, M.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (1989) *Biochem. Soc. Trans.*, **17**, 999–1000.
- [56] Gasset, M.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A.; Schiavo, G.P.; Laynez, J.; Usobiaga, P. and Gavilanes, J.G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 9–16.
- [57] Connor, J.; Bucana, C.; Fidler, I.J. and Schroit, A.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3184–3188.
- [58] Zachowski, A. (1993) *Biochem. J.*, **294**, 1–14.
- [59] Slivinsky, G.G.; Hymer, W. C.; Bauer, J. and Morrison, D. R. (1997) *Electrophoresis*, **18**, 1109–1119.
- [60] Orntoft, T.F. and Vestergaard, E.M. (1999) *Electrophoresis*, **20**, 362–371.
- [61] Rodríguez, R.; López-Otín, C.; Barber, D.; Fernández-Luna, J.L.; González, G. and Méndez, E. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 315–321.
- [62] López-Otín, C.; Barber, D.; Fernández-Luna, J.L.; Soriano, F. and Méndez, E. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **143**, 621–634.
- [63] Fernández-Luna, J.L.; López-Otín, C.; Soriano, F. and Méndez, E. (1985) *Biochemistry*, **24**, 861–867.
- [64] Arruda, L.K.; Platts-Mills, T.A.; Fox, J.W. and Chapman, M.D. (1990) *J. Exp. Med.*, **172**, 1529–1532.
- [65] Pérez-Cañadillas, J.M.; Guennegues, M.; Campos-Olivas, R.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M. and Bruix, M. (2002) *J. Biomol. NMR*, **24**, 301–316.
- [66] García-Mayoral, M.F.; Pantoja-Uceda, D.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M. and Bruix, M. (2005) *Eur. Biophys. J.*, **34**, 1057–1065.
- [67] García-Mayoral, M.F.; García-Ortega, L.; Álvarez-García, E.; Bruix, M.; Gavilanes, J.G. and Martínez del Pozo, A. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 6859–6864.
- [68] García-Ortega, L.; Masip, M.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Lizarbe, M.A.; García-Mayoral, M.F.; Bruix, M.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 18632–18639.
- [69] García-Mayoral, M.F.; García-Ortega, L.; Lillo, M.P.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M. and Bruix, M. (2004) *Protein Sci.*, **13**, 1000–1011.
- [70] Yang, R. and Kenealy, W.R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16801–16805.
- [71] Brandhorst, T.; Yang, R. and Kenealy, W.R. (1994) *Protein Expr. Purif.*, **5**, 486–497.
- [72] Kao, R. and Davies, J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 12576–12582.
- [73] Lacadena, J.; Mancheño, J.M.; Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Gasset, M.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1995) *Biochem. J.*, **309**, 581–586.
- [74] Sylvester, I.D.; Roberts, L.M. and Lord, J.M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1358**, 53–60.
- [75] Kao, R.; Shea, J.E.; Davies, J. and Holden, D.W. (1998) *Mol. Microbiol.*, **29**, 1019–1027.
- [76] Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Albar, J.P.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 2387–2395.
- [77] Mancheño, J.M.; Martínez del Pozo, A.; Albar, J.P.; Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1998) *J. Pept. Res.*, **51**, 142–148.
- [78] De Antonio, C.; Martínez del Pozo, A.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Lacadena, J.; Martínez-Ruiz, A.; Pérez-Cañadillas, J.M.; Bruix, M. and Gavilanes, J.G. (2000) *Proteins*, **41**, 350–361.
- [79] García-Ortega, L.; Lacadena, J.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Kao, R.; Davies, J.; Olmo, N.; Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2001) *Protein Sci.*, **10**, 1658–1668.
- [80] Carrasco, L. and Esteban, M. (1982) *Virology*, **117**, 62–69.
- [81] Olmo, N.; Turnay, J.; Lizarbe, M.A. and Gavilanes, J.G. (1993) *STP Pharm. Sci.*, **3**, 93–96.
- [82] Turnay, J.; Olmo, N.; Jiménez, A.; Lizarbe, M.A. and Gavilanes, J.G. (1993) *Mol. Cell. Biochem.*, **122**, 39–47.
- [83] Stuart, A.D. and Brown, T.D. (2006) *J. Virol.*, **80**, 7500–7509.
- [84] Pasqualotto, A. (2006) *Clin. Microbiol. Infect.*, **12**, S25.
- [85] Ronning, C.M.; Fedorova, N.D.; Bowyer, P.; Coulson, R.; Goldman, G.; Kim, H.S.; Turner, G.; Wortman, J.R.; Yu, J.; Anderson, M.J.; Denning, D.W. and Nierman, W.C. (2005) *Rev. Iberoam. Microcol.*, **22**, 223–228.
- [86] Denning, D.W.; O'Driscoll, B.R.; Hogaboam, C.M.; Bowyer, P. and Niven, R.M. (2006) *Eur. Respir. J.*, **27**, 615–626.
- [87] Walsh, T.J. and Pizzo, A. (1988) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 460–475.
- [88] Bodey, G.P. and Vartivarian, S. (1989) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **8**, 413–437.
- [89] Lamy, B.; Moutaouakil, M.; Latge, J.P. and Davies, J. (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 1811–1815.
- [90] Paris, S.; Monod, M.; Diaquin, M.; Lamy, B.; Arruda, L.K.; Punt, P.J. and Latge, J.P. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**, 31–36.
- [91] Smith, J.M.; Davies, J.E. and Holden, D.W. (1993) *Mol. Microbiol.*, **9**, 1071–1077.
- [92] Smith, J.M.; Tang, C.M.; Van Noorden, S. and Holden, D.W. (1994) *Infect. Immun.*, **62**, 5247–5254.
- [93] Kurup, V.P.; Kumar, A.; Kenealy, W.R. and Greenberger, P.A. (1994) *J. Lab. Clin. Med.*, **123**, 749–756.
- [94] Piechura, J.E.; Huang, C.J.; Cohen, S.H.; Kidd, J.M.; Kurup, V.P.; Calvanico, N.J. (1983) *Immunology*, **49**, 657–665.
- [95] Cramer, R.; Hemmann, S.; Ismail, C.; Menz, G. and Blaser, K. (1998) *Int. Immunol.*, **10**, 1211–1216.
- [96] Kurup, V.P.; Knutsen, A.P.; Moss, R.B. and Bansal, N.K. (2006) *Clin. Mol. Allergy*, **4**, 11–17.
- [97] Greenberger, P.A. (2002) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110**, 685–692.
- [98] Álvarez-García, E.; Alegre-Cebollada, J.; Batanero, E.; Monedero, V.; Pérez-Martínez, G.; García-Fernández, R.; Gavilanes, J.G. and Martínez del Pozo, A. (2008) *J. Biotechnol.*, **134**, 1–8.
- [99] Brinkmann, U. and Pastan, I. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1198**, 27–45.
- [100] Reiter, Y. and Pastan, I. (1998) *Trends Biotechnol.*, **16**, 513–520.
- [101] Kreitman, R.J. (2001) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2**, 313–325.
- [102] Ehrlich, P. (1956) in *The Collected Papers of Paul Ehrlich*, Vol. 1, (Himmelfeit, F.; Marquardt, M. & Dale, H., eds.), Pergamon Press, New York, pp. 596.
- [103] Kreitman, R.J. (2000) *Expert. Opin. Pharmacother.*, **1**, 1117–1129.
- [104] Kreitman, R.J. (2003) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **5**, 44–51.
- [105] Li, Q.; Verschraegen, C.F.; Mendoza, J. and Hassan, R. (2004) *Anticancer Res.*, **24**, 1327–1335.
- [106] Pastan, I.; Chaudhary, V. and FitzGerald, D.J. (1992) *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 331–354.
- [107] Ghetie, V.; Swindell, E.; Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1993) *J. Immunol. Methods*, **166**, 117–122.

- [108] Engert, A.; Diehl, V.; Schnell, R.; Radszuhn, A.; Hatwig, M.T.; Drillich, S.; Schön, G.; Bohlen, H.; Tesch, H.; Hansmann, M.L.; Barth, S.; Schindler, J.; Ghetie, V.; Uhr, J. and Vitetta, E. (1997) *Blood*, **89**, 403–410.
- [109] O'Toole, J.E.; Esseltine, D.; Lynch, T.J.; Lambert, J.M. and Grossbard, M.L. (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **234**, 35–56.
- [110] Schnell, R.; Vitetta, E.; Schindler, J.; Barth, S.; Winkler, U.; Borchmann, P.; Hansmann, M.L.; Diehl, V.; Ghetie, V. and Engert, A. (1998) *Leuk. Lymphoma*, **30**, 525–537.
- [111] Carroll, S.F. and Collier, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8707–8711.
- [112] Kondo, T.; FitzGerald, D.; Chaudhary, V.K.; Adhya, S. and Pastan, I. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 9470–9475.
- [113] Kreitman, R.J.; Chaudhary, V.K.; Waldmann, T.; Willingham, M.C.; FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8291–8295.
- [114] Kreitman, R.J.; Batra, J.K.; Seetharam, S.; Chaudhary, V.K.; FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1993) *Bioconjug. Chem.*, **4**, 112–120.
- [115] Foss, F.M.; Saleh, M.N.; Krueger, J.G.; Nichols, J.C. and Murphy, J.R. (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **234**, 63–81.
- [116] LeMaistre, C.F.; Saleh, M.N.; Kuzel, T.M.; Foss, F.; Plataniias, L.C.; Schwartz, G.; Ratain, M.; Rook, A.; Freytes, C.O.; Craig, F.; Reuben, J. and Nichols, J.C. (1998) *Blood*, **91**, 399–405.
- [117] Rathore, D. and Batra, J.K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 58–63.
- [118] Orlandi, R.; Canevari, S.; Conde, F.P.; Leoni, F.; Mezzanzanica, D.; Ripamonti, M. and Colnaghi, M.I. (1988) *Cancer Immunol. Immunother.*, **26**, 114–120.
- [119] Conde, F.P.; Orlandi, R.; Canevari, S.; Mezzanzanica, D.; Ripamonti, M.; Muñoz, S.M.; Jorge, P. and Colnaghi, M.I. (1989) *Eur. J. Biochem.*, **178**, 795–802.
- [120] Hertler, A.A. and Frankel, A.E. (1989) *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1932–1942.
- [121] Wawrzynczak, E.J.; Henry, R.V.; Cumber, A.J.; Parnell, G.D.; Derbyshire, E.J. and Ulbrich, N. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **196**, 203–209.
- [122] Better, M.; Bernhard, S.L.; Lei, S.P.; Fishwild, D.M. and Carroll, S.F. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16712–16718.
- [123] Rathore, D. and Batra, J.K. (1997) *Biochem. J.*, **324**, 815–822.
- [124] Rathore, D. and Batra, J.K. (1997) *FEBS Lett.*, **407**, 275–279.
- [125] Rathore, D.; Nayak, S.K. and Batra, J.K. (1997) *Gene*, **190**, 31–35.
- [126] Goyal, A. and Batra, J.K. (2000) *Biochem. J.*, **345**, 247–254.
- [127] Pastan, I. and FitzGerald, D. (1991) *Science*, **254**, 1173–1177.
- [128] Brinkmann, U.; Pai, L.H.; FitzGerald, D.J.; Willingham, M. and Pastan, I. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8616–8620.
- [129] Pai, L.H.; Batra, J.K.; FitzGerald, D.J.; Willingham, M.C. and Pastan, I. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3358–3362.
- [130] Pai, L.H.; Wittes, R.; Setser, A.; Willingham, M.C. and Pastan, I. (1996) *Nat. Med.*, **2**, 350–353.
- [131] Benhar, I. and Pastan, I. (1995) *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1023–1029.
- [132] Benhar, I. and Pastan, I. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23373–23380.
- [133] Kuan, C.T. and Pastan, I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 974–978.
- [134] Bera, T.K. and Pastan, I. (1998) *Bioconjug. Chem.*, **9**, 736–743.
- [135] Brinkmann, U. (2000) *In Vivo*, **14**, 21–27.
- [136] Cregg, J.M.; Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. (1993) *Biotechnology*, **11**, 905–910.
- [137] Gurkan, C. and Ellar, D.J. (2003) *Protein Expr. Purif.*, **29**, 103–116.
- [138] Gurkan, C. and Ellar, D.J. (2005) *Microb. Cell. Fact.*, **4**, 33–40.
- [139] Cregg, J.M.; Madden, K.R.; Barringer, K.J.; Thill, G.P. and Stillman, C.A. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1316–1323.
- [140] Humphrey, W.; Dalke, A. and Schulten, K. (1996) *J. Mol. Graph.*, **14**, 33–38, 27–28.
- [141] Correll, C.C.; Munishkin, A.; Chan, Y.L.; Ren, Z.; Wool, I.G. and Steitz, T.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13436–13441.

# Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin $\alpha$ -sarcin

Nelson Carreras-Sangrà<sup>1,3†</sup>, Jaime Tomé-Amat<sup>1†</sup>,  
Lucía García-Ortega<sup>1</sup>, Carl A. Batt<sup>2</sup>,  
Mercedes Oñaderra<sup>1</sup>, Álvaro Martínez-del-Pozo<sup>1</sup>,  
José G. Gavilanes<sup>1</sup> and Javier Lacadena<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain, <sup>2</sup>Graduate Field of Biomedical Engineering, Cornell University, Ithaca, NY, USA and <sup>3</sup>Present address: Departamento Terapéutica y Patología Experimental, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: javierl@bbm1.ucm.es

Received January 13, 2012; revised April 29, 2012;  
accepted May 10, 2012

Edited by Andreas Matouschek

**A single-chain fusion protein that directed the cytolytic activity of  $\alpha$ -sarcin to A33 tumor antigen expressing cells was constructed and shown to effectively kill targeted cells. Glycoprotein A33 (GPA33) is a well-known colon cancer marker and a humanized antibody against it was used to target the  $\alpha$ -sarcin. The fungal ribotoxin  $\alpha$ -sarcin is one of the most potent and specific toxins known. It is small, protease resistant, thermostable and highly efficient towards the inactivation of ribosomes. This work describes the production and characterization of an immunotoxin resulting from fusing the single-chain variable fragment (scFv) of the monoclonal antibody that targets GPA33 to fungal  $\alpha$ -sarcin. This chimeric protein (scFvA33 $\alpha$ sarcin), produced in *Pichia pastoris* and purified in high yield was proven to be properly folded, active, specific and stable. It showed high specific toxicity against GPA33-positive tumoral cell lines providing scientific evidence to sustain that scFvA33 $\alpha$ sarcin is a good immunotherapeutic candidate against GPA33-positive colon carcinomas.**

**Keywords:** colon cancer/GPA33/immunotoxin/ribonuclease/ $\alpha$ -sarcin

## Introduction

Immunotoxins are highly specific therapeutic agents that hold promise as antitumoral agents (Pastan *et al.*, 2007; Dougan and Dranoff, 2009; Holzman, 2009; Kreitman, 2009). They are usually chimeric molecules composed of a specific antibody fragment, responsible for targeting, linked to a toxin moiety which promotes cellular death (Brinkmann and Pastan, 1994; Reiter and Pastan, 1998; Kreitman, 2001).

Initially, immunotoxins were prepared by conjugating toxic proteins to monoclonal antibodies, using the whole antibody molecule for targeting (Kreitman, 2000). As smaller molecular weight immunotoxins penetrate solid tumours better, new strategies use only the antibody variable domains, stabilized by a flexible peptide (single-chain variable fragment, scFv), a disulfide bridge (dsFv) or both (scdsFv) (Brinkmann, 2000; Kreitman, 2003; Li *et al.*, 2004; Carreras-Sangrà *et al.*, 2008).

In this regard, glycoprotein A33 (GPA33) is an extensively studied membrane antigen (Catimel *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 1997) which is overexpressed in 95% of the known primary and metastatic colorectal cancers while it is almost absent from any other tissue, tumoral or not. In addition, this antigen is persistently expressed at the cell membrane (Ackerman *et al.*, 2008) and shows a high degree of internalization after the formation of antigen–antibody complexes. Therefore, GPA33 represents an ideal target for immunotoxins aimed against colon cancer cells (Scott *et al.*, 2005). Within this idea, a humanized monoclonal antibody designed against GPA33 was prepared and characterized, showing all the features required to be incorporated into such an immunotoxin (Ritter *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005). As an additional advantage to develop such immunconjugate, a system to produce large amounts of its fully functional scFv (scFvA33) in the yeast *Pichia pastoris* has been also described (Damasceno *et al.*, 2004, 2009).

Regarding the toxic moiety, the most representative toxins so far employed have been ricin from plants (Pastan *et al.*, 1992; Ghetie *et al.*, 1993; Engert *et al.*, 1997; O'Toole *et al.*, 1998; Schnell *et al.*, 1998) and *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin from bacteria (Carroll and Collier, 1987; Kondo *et al.*, 1988; Kreitman *et al.*, 1990, 1993; Foss *et al.*, 1998; LeMaistre *et al.*, 1998). Although not so frequently employed, immunotoxins containing fungal ribotoxins have also been described (Orlandi *et al.*, 1988; Conde *et al.*, 1989; Hertler and Frankel, 1989; Wawrzynczak *et al.*, 1991; Better *et al.*, 1992; Rathore and Batra, 1996, 1997a,b; Rathore *et al.*, 1997; Goyal and Batra, 2000). These ribotoxins constitute a family of cytotoxic-secreted fungal RNases, best represented by  $\alpha$ -sarcin (Olson *et al.*, 1965; Gasset *et al.*, 1989, 1990, 1994; Oñaderra *et al.*, 1993; Lacadena *et al.*, 2007). They cleave a single phosphodiester bond of the larger molecule of rRNA. A unique bond because it appears at a universally conserved site, known as the sarcin/ricin loop (SRL), with important roles in ribosomal function (Schindler and Davies, 1977; Endo and Wool, 1982; Endo *et al.*, 1983; García-Ortega *et al.*, 2010). Cleavage of this SRL results in ribosome inactivation leading to protein biosynthesis inhibition and cell death by apoptosis (Gasset *et al.*, 1994; Kao *et al.*, 2001; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001; Olmo *et al.*, 2001; Lacadena *et al.*, 2007; García-Ortega *et al.*, 2010). The catalytic mechanism of  $\alpha$ -sarcin ribonucleolytic action has been

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

also studied in detail (Lacadena *et al.*, 1995, 1998, 1999; Masip *et al.*, 2000, 2003; Siemer *et al.*, 2004; Álvarez-García *et al.*, 2006).

Ribotoxins have several advantages for their use in the construction of immunotoxins, namely, their small size, high thermostability, poor immunogenicity, resistance to proteases and their highly efficient ability to inactivate ribosomes (Rathore and Batra, 1996; Goyal and Batra, 2000; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001; Lacadena *et al.*, 2007). It is accepted that only one molecule is needed to kill a cell (Lamy *et al.*, 1992). As stated above, different ribotoxins have also been used before as components of immunotoxins (Orlandi *et al.*, 1988; Conde *et al.*, 1989; Hertler and Frankel, 1989; Wawrzynczak *et al.*, 1991; Better *et al.*, 1992; Rathore and Batra, 1996, 1997a,b; Rathore *et al.*, 1997; Goyal and Batra, 2000). Unfortunately, none of the ribotoxin-based immunotoxins was studied beyond a preliminary characterization, most probably due to their large size, which could hinder their correct internalization into solid tumours, or to the low structural stability of the immunoconjugates prepared.

Colon cancer is among the most deadly ones with a significant worldwide incidence (Center *et al.*, 2009). Immunotherapy is becoming relatively successful for its treatment (Welt *et al.*, 2003; Chong *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2005), with three monoclonal antibodies already approved for clinical use (Enever *et al.*, 2009) but its late diagnosis and metastasis progression makes the development of more efficient drugs necessary. Here, we describe the production, isolation and characterization of a new, much smaller, ribotoxin-based single-chain immunotoxin directed against human colon cancer cells by the fusion of scFvA33 and  $\alpha$ -sarcin (scFvA33 $\alpha$ sarcin). The results herein presented in terms of its structural and functional characterization using different cell lines reveal promising perspectives for future applications.

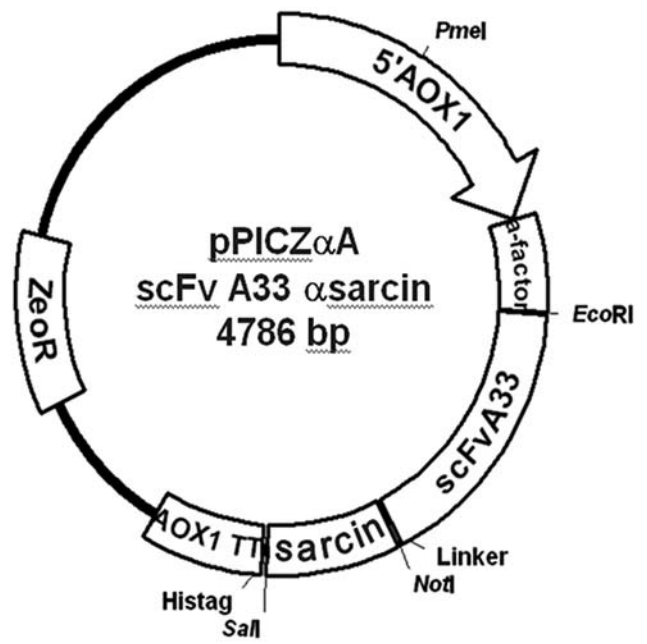
## Materials and methods

### Plasmid construction

Plasmids containing the cDNA sequences coding for  $\alpha$ -sarcin (Lacadena *et al.*, 1994) and scFvA33 (Damasceno *et al.*, 2004) were obtained before. Both cDNA sequences were conveniently amplified by PCR using these plasmids as templates, and the necessary primers containing flanking restriction sites for Eco RI, Not I and Sal I to facilitate vector cloning. The final scFvA33 $\alpha$ sarcin construct, corresponding to the scFvA33, bound to the N-terminus of  $\alpha$ -sarcin, through a three amino acid linker, was cloned into the plasmid pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen) for extracellular protein production in the yeast *P. pastoris* (Fig. 1). The linker amino acid sequence (Gly-Gly-Arg) was designed to provide flexibility and structural independence in order to allow the correct folding of both scFv and  $\alpha$ -sarcin proteins. A 6xHis tag was included at the C-terminus of the construct to facilitate its purification. The resulting plasmid (pPICZ $\alpha$ AscFvA33 $\alpha$ sarcin) was sequenced, confirming that the desired sequence was present, and propagated in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F<sup>+</sup> cells.

### Protein production

Electrocompetent *P. pastoris* KM71 cells were electroporated with 10  $\mu$ g of linear plasmid pPICZ $\alpha$ AscFvA33 $\alpha$ sarcin, as



**Fig. 1.** Diagram showing the plasmid pPICZ $\alpha$ AscFvA33 $\alpha$ sarcin employed to produce scFvA33 $\alpha$ sarcin in *Pichia pastoris* KM71 cells. Restriction enzyme sites used are shown: Eco RI, Not I and Sal I were needed to insert the corresponding cDNA, Pme I was used to linearize the plasmid for electroporation. The 6xHis tag was present in the original plasmid at the 3' site of the multicloning site. ZeoR, zeocin resistance gene. 5'AOX1 is a fragment containing the AOX1 promoter that allows methanol-inducible, high-level expression in *P. pastoris*.  $\alpha$ -Factor signal sequence allows for efficient secretion of the protein. AOX TT is the native transcription termination and polyadenylation signal from AOX1 gene that permits efficient 3' mRNA processing, including polyadenylation, for increased mRNA stability.

previously described (Martínez-Ruiz *et al.*, 1998; López-García *et al.*, 2010), using a Bio-Rad Gene pulser apparatus. Cells harbouring the desired construct were selected after plating the transformation mixture on yeast peptone dextrose sorbitol media containing different amounts (100–750  $\mu$ g/ml) of the antibiotic zeocin. Five independent clones were tested by small scale production to identify the best protein producing colony. With this purpose, they were grown at 30°C for 16 h in 5 ml of yeast peptone dextrose media containing 750  $\mu$ g/ml zeocin, and transferred to 100 ml of buffered media with glycerol for yeast (BMGY) for incubation at 30°C for an additional 16 h. The cells were then harvested by centrifugation and protein production was induced by resuspension in 20 ml of buffered media with methanol for yeast (BMMY). These cultures in BMMY were incubated for 120 h more at 25°C with vigorous shaking (220 rpm). In order to maintain a stable induction, methanol was repeatedly added every 24 h to a final concentration of 0.5% (v/v). Protein production secreted in the extracellular media over time was analyzed by 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)-15% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and western blotting. A rabbit anti- $\alpha$ -sarcin serum was used for specific detection of the ribotoxin moiety. The colony producing the highest amount of scFvA33 $\alpha$ sarcin was selected for larger scale production of the protein and also for long-term storage in glycerol at –80°C. Large-scale production of scFvA33 $\alpha$ sarcin was performed by inoculating 2-l baffled flasks containing 350 ml of

BMGY with 25 ml of preinoculum and incubating them overnight at 30°C and 220 rpm. The cells were again harvested by centrifugation at room temperature, resuspended in 250 ml of BMMY, and incubated at 25°C, 250 rpm shaking, for 72 h, supplementing with methanol every 24 h. Finally, the extracellular media was separated by centrifugation and dialyzed against buffer A (50 mM sodium phosphate buffer, containing 0.1 M NaCl, pH 7.5).

### Protein purification

The scFvA33 $\alpha$ sarcin fusion protein was purified from the dialyzed extracellular medium using a Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column (HisTrap™ FF Columns, GE Healthcare). The medium was applied to the column at 1 ml/min using a peristaltic pump. After washing with buffer A, and with the same buffer but containing 25 mM imidazole, the scFvA33 $\alpha$ sarcin was eluted with 250 mM imidazole (Fig. 2). Fractions containing the purified protein were pooled and applied to a PD-10 (GE Healthcare) column equilibrated in buffer A to remove the imidazole. When necessary, scFvA33 $\alpha$ sarcin was concentrated by ultrafiltration through Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (Millipore) devices.

### Biophysical characterization

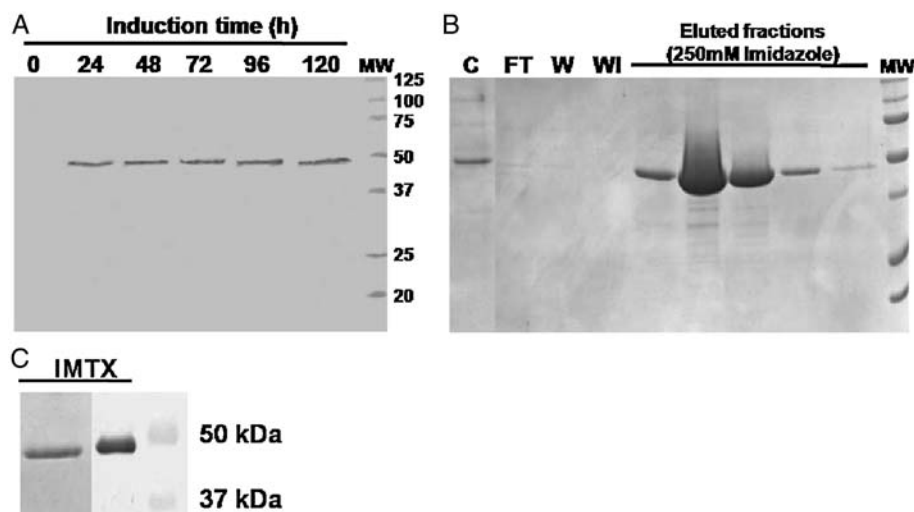
Structural characterization was performed as previously described (Gasset *et al.*, 1991; Lacadena *et al.*, 1999; García-Ortega *et al.*, 2002; Herrero-Galán *et al.*, 2008). In brief, amino acid analyses after acid hydrolysis of the proteins were performed on a Biochrom 20 (Pharmacia) automatic analyzer. The results were in agreement with those expected from translating the cloned cDNA into the corresponding amino acid sequence. Absorbance measurements were carried out on a Uvikon 930 spectrophotometer (Kontron Instruments). Far-UV circular dichroism (CD) spectra were obtained on a Jasco 715 spectropolarimeter at 50 nm/min scanning speed. Cells of 0.1-cm optical path were employed. At least four spectra were averaged to obtain the

final data. Analysis of protein stability by differential scanning calorimetry (DSC) was performed on a MicroCal VP-DSC at 0.5°C/min scanning speed.

### Ribonucleolytic activity assays

The highly specific ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin was followed as described before (Kao *et al.*, 2001; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001) by detecting the release of a characteristic 400 nt rRNA, known as  $\alpha$ -fragment, using ribosomes from a rabbit cell-free reticulocyte lysate as substrate. With this purpose, the lysate was first diluted 3-fold with 40 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 40 mM KCl and 10 mM EDTA. Then, 50- $\mu$ l aliquots of this dilution (containing 5–6 pmol of ribosomes approximately) were incubated for 15 min at room temperature with different concentrations of the test proteins. The reaction was stopped by addition of 250  $\mu$ l of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.5% (w/v) SDS followed by strong vortexing. RNA phenol/chloroform extraction was then performed and the RNA was precipitated from the aqueous phase by addition of isopropanol. The resulting pellet was washed with 70% (v/v) ethanol, dried and finally resuspended in 10  $\mu$ l of 0.5% (w/v) SDS. Production of the  $\alpha$ -fragment was visualized by ethidium bromide staining after electrophoresis of these samples, previously heated at 90°C for 5 min, on denaturing 2.4% agarose gels. Bands were quantified using the multi-gauge program.

The less specific ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin and scFvA33 $\alpha$ sarcin against homopolynucleotides (Endo *et al.*, 1983; Lacadena *et al.*, 1994, 1999) was detected in zymogram assays using poly(A) as substrate, also as described before (Kao *et al.*, 2001; García-Ortega *et al.*, 2002). The proteins were separated in 0.1% (w/v) SDS-15% (w/v) PAGE containing 0.3 mg/ml of the homopolynucleotide, using loading buffer without  $\beta$ -mercaptoethanol. After the electrophoresis, the gel was washed twice with 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, for 15 min at room temperature, and then once



**Fig. 2.** (A) Western blot analysis of aliquots from the extracellular medium of *Pichia pastoris* KM71 cells harbouring the pPICZ $\alpha$ AscFvA33 $\alpha$ sarcin construct. The immunotoxin was detected using an anti- $\alpha$ -sarcin rabbit serum. Aliquots were taken from 0 to 120 h after induction with 0.5% (v/v) methanol. (B) Coomassie Brilliant Blue staining of a 0.1% (w/v) SDS-15% (w/v) PAGE analysis of aliquots taken during the Ni-NTA chromatography performed to purify scFvA33 $\alpha$ sarcin. Aliquots correspond to: C, starting fraction; FT, not retained fraction; W, washed fraction; WI, washed with 25 mM imidazole fraction. Finally, the five first fractions eluted with buffer containing 250 mM imidazole are also shown. In both panels, A and B, lane labeled as MW corresponds to prestained Bio-Rad Precision Plus Protein standards. (C) Coomassie Brilliant Blue (left lane) and western blot (right lane) detection of the final purified scFvA33 $\alpha$ sarcin fraction, and the corresponding prestained Bio-Rad Precision Plus Protein standards.

more with the same buffer but containing 10% (v/v) isopropanol, to remove the SDS and allow renaturation. Two more washes with 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, were done to eliminate all isopropanol traces and then the gel was incubated at 25°C during 1 h in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, washed for 10 min with 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, and stained with 0.2% (w/v) toluidine blue. After destaining, the proteins exhibiting ribonuclease activity appeared as colorless bands due to degradation of the polynucleotide.

### Cell line culture

Human rhabdomyosarcoma RD86 (ATCC CCL 136), lung carcinoma A431 (ATCC: CRL-1555), colorectal cancer HT29 (ATCC: HTB-38) and breast cancer MCF-7 (ATCC: HTB-22) cellular lines were used as tumoral GPA33-negative cells, whereas colon carcinoma SW1222 was used as the GPA33-positive cellular line. All these cell lines were grown as described (Turnay *et al.*, 1993; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001) in Dulbecco's modified Eagle's medium, containing glutamine (300 µg/ml), 50 U/ml of penicillin, and 50 µg/ml of streptomycin, and supplemented with 10% fetal bovine serum. Incubation was performed at 37°C in a humidified atmosphere (CO<sub>2</sub>:air, 1 : 19, v:v). Harvesting and propagation of cultures were routinely performed by trypsinisation. The number of cells used was determined in all assays described using a haemocytometer.

### Flow cytometry studies

Trypsinised cells were conveniently distributed into several aliquots, each one containing  $1.5 \times 10^5$  cells/ml, and washed three times with phosphate buffered saline (PBS), containing 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.02% (w/v) sodium azide. These aliquots were incubated with 2 µM purified scFvA33αsarcin, or 20 µg/ml mAbA33 (Santa Cruz Biotechnologies) as a positive control, for 1 h at room temperature with gentle agitation. A second incubation was performed in the dark with anti-α-sarcin serum, in the case of scFvA33αsarcin, or fluorescent goat anti-rabbit antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (GAR-FITC), when mAbA33 was the protein used. A final third incubation was performed with GAR-FITC to detect the presence of the anti-α-sarcin antibody molecules. Then, the cells were sedimented by centrifugation (300 g, 4°C, 10 min), washed again with PBS, containing 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) sodium azide, and loaded onto the cytometer. Flow cytometry was performed on a FACScan (Becton Dickinson) and data were analyzed using the WinMDI software.

### Western blot detection of scFvA33αsarcin binding to the GPA33 antigen

SW1222 and A431 cell lines were lysed with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS, containing a cocktail of protease inhibitors (1 mM PMSF, 0.1 mM pepstatin, 0.1 mM leupeptin, and 0.1 U/ml aprotinin). The solubilized extracts were resolved by SDS-PAGE under non-reducing conditions, blotted to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore), and incubated with 0.05 µM of scFvA33αsarcin followed by rabbit anti-α-sarcin polyclonal serum. Specific binding of scFvA33αsarcin to the GPA33 antigen was finally visualized by enhanced chemiluminescence after incubation with GAR conjugated with peroxidase.

### FITC labeling of scFvA33αsarcin

The absence of primary amine-groups in the complementary determinant regions of the scFvA33 was first confirmed to prevent modifications that could result in defective binding (King *et al.*, 1995). Then, labeling was performed as previously described (Turnay *et al.*, 1993). scFvA33αsarcin at 2 mg/ml in phosphate buffer 50 mM pH 8.0 NaCl 0.1 M was conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; isomer I; Sigma) at 0.05 reagent/protein weight ratio. The reaction was maintained for 24 h in the dark at 4°C under continuous stirring. The unbound dye was removed using a PD-10 column equilibrated in PBS. The degree of labeling was determined by measuring the absorbance of the conjugated protein at 280 nm and 495 nm.

### Fluorescence microscopy

SW1222 cells were trypsinised, seeded at  $8 \times 10^5$  cells/well over cover-glasses placed into a 24-well plate, and incubated at 37°C overnight. The cells were then treated with scFvA33αsarcin-FITC at 25 µg/ml for different periods of time. This treatment took 20 min for binding experiments but was much longer (24 h) for internalization assays. To be able to visualize membranes, the cells were also labeled using an additional hour of incubation in the presence of anti-CD44 mAb (Yeung *et al.*, 2009). Then, the extracellular medium was removed and cells were fixed for 15 min with PBS containing 3% (v/v) p-formaldehyde, followed by 15-min incubation in PBS containing 50 mM ammonium chloride. These cells were finally permeabilized with digitonin at 0.01% (w/v) in PBS for 30 min. After incubating these preparations with PBS containing 1.0% (w/v) BSA for 1 h, CD44 donkey anti-mouse DAM-Alexa 647 was added and incubated for an additional hour, in order to target the membranes. Finally, the nuclei were visualized with 10 µl of Prolong Gold with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen). All these incubations were performed at room temperature but the final preparations were kept at 4°C. A Leica TCS SP2 confocal microscope and the corresponding LCS lite software were used to obtain the images.

### Protein biosynthesis inhibition

Ribotoxins exert their cellular cytotoxicity by inactivating ribosomes, leading to protein biosynthesis inhibition and cellular death (Lacadena *et al.*, 2007). Thus, protein biosynthesis is the activity routinely used to evaluate the toxic effect of this family of proteins (Martínez-Ruiz *et al.*, 2001; Olmo *et al.*, 2001). Consequently, to evaluate the effect of scFvA33αsarcin, the cells were seeded into 96-plates at  $1 \times 10^4$  cells per well in culture medium and maintained under standard culture conditions for 36 h. Then the monolayer cultures were incubated with 0.2 ml of fresh medium in presence of different concentrations of scFvA33αsarcin or free natural wild-type α-sarcin. Following 72 h of incubation at 37°C, the medium was removed and replaced with a fresh one supplemented with 1 µCi per well of L-[4,5-<sup>3</sup>H]-Leucine (166 Ci/mmol; Amersham, UK). After an additional incubation of 6 h, this medium was also removed; the cells were fixed with 5.0% (w/v) trichloroacetic acid and washed three times with cold ethanol. The resulting dried pellet was dissolved in 0.2 ml of 0.1 M NaOH containing 0.1% SDS, and its radioactivity was counted on a Beckman LS3801 liquid

scintillation counter. The results were expressed as percentage of the radioactivity incorporated in control samples incubated without either of the two proteins,  $\alpha$ -sarcin or the immunotoxin to calculate  $IC_{50}$  values (protein concentration inhibiting 50% protein synthesis) in the cytotoxicity assays. Three independent replicate assays were conducted to calculate the average  $IC_{50}$  values.

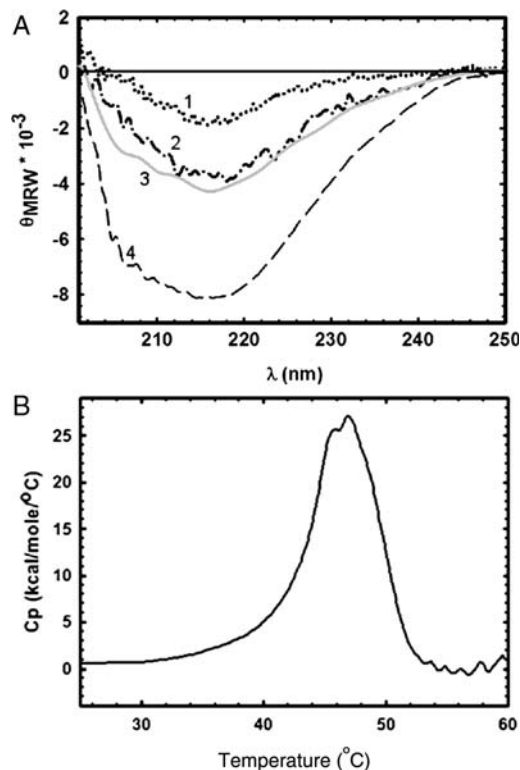
## Results

### Protein production and purification

The extracellular medium of the *P. pastoris* cells secreting the scFvA33 $\alpha$ sarcin immunotoxin was collected after 72 h of methanol induction (Fig. 2A). Then, the protein was purified to homogeneity by affinity chromatography using a  $Ni^{2+}$ -NTA agarose column (Fig. 2B and C). It showed an electrophoretic mobility in agreement with its expected molecular mass of 45 KDa and reacted with a specific anti- $\alpha$ -sarcin antibody in western blot analysis (Fig. 2). The purification yield was of 1–3 mg of protein per liter of induced medium culture.

### Biophysical characterization of the purified scFvA33 $\alpha$ sarcin

Far-UV CD spectrum of scFvA33 $\alpha$ sarcin (Fig. 3A) was consistent with the adoption of a globular fold composed chiefly of  $\beta$ -sheet, as expected from the individual three-dimensional structures of both scFvA33 and  $\alpha$ -sarcin (Martínez-del-Pozo *et al.*, 1988; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; Carmichael *et al.*,



**Fig. 3.** (A) Far-UV circular dichroism spectrum ( $\theta_{MRW}$ , mean residue weight ellipticities expressed as  $\text{degree} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ) of scFvA33 $\alpha$ sarcin (1), scFvA33 (2) and  $\alpha$ -sarcin (3). The solid gray line (4) corresponds to the calculated spectrum of scFvA33 $\alpha$ sarcin considering the relative contribution of spectra (2) and (3) in terms of the corresponding number of amino acids in the immunotoxin. All these spectra were made in PBS at 0.15 mg/ml. (B) DSC thermogram of scFvA33 $\alpha$ sarcin at 1.0 mg/ml in PBS.

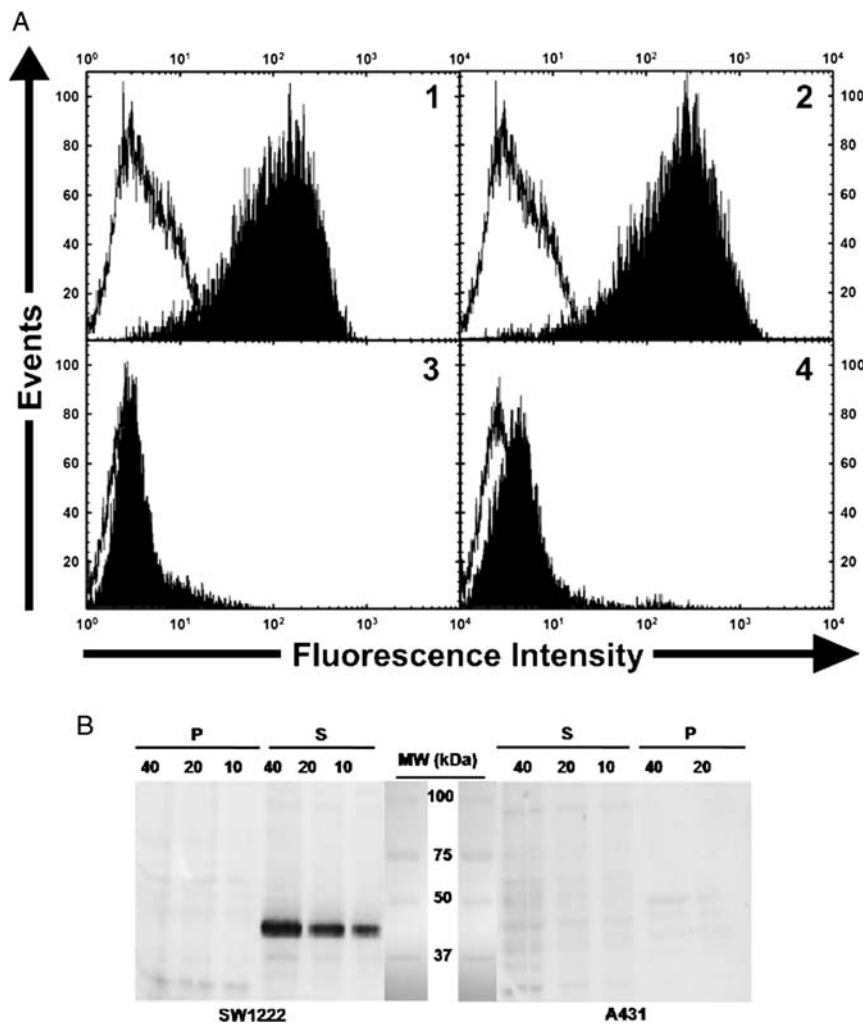
2003; Wilkinson *et al.*, 2009). Furthermore, the calculated spectrum of scFvA33 $\alpha$ sarcin obtained from those of their individual polypeptide components was in good agreement with the experimental one (Fig. 3A). Within the same idea, the DSC thermogram (Fig. 3B) was also consistent with the presence of a globular structure being denatured by a two-state native-unfolded transition, with a temperature value at the midpoint of the thermal transition of 47°C. Thermal denaturation resulted in protein precipitation preventing any calculation of thermodynamic parameters.

### Functional characterization of the purified scFvA33 $\alpha$ sarcin

A fully functional immunotoxin based on the fusion of scFvA33 and  $\alpha$ -sarcin must display at least two different activities. First, it must exhibit proper specific binding to the target antigen and, second, show the exquisite ribotoxin ribonucleolytic activity against ribosomes. Maintenance of these functions would confirm correct synthesis and folding of both antibody and ribotoxin moieties.

Specific binding of scFvA33 $\alpha$ sarcin or the monoclonal antibody mAbA33, used as a control, to the GPA33 antigen present on the cellular surface was first assessed by flow cytometry, using GPA33-positive SW1222 cells and GPA33-negative A431 cells (Fig. 4A). Accordingly, neither of the two proteins bound to the A431 cellular line assayed (<10% of binding in both cases). In contrast, both scFvA33 $\alpha$ sarcin and mAbA33 bound to the SW1222 cells (Fig. 4A) (>90% of binding in both cases). This scFvA33 $\alpha$ sarcin-specific antigen-binding ability was preserved for at least 72 h of preincubation of the protein at 37°C in the media before being added to the cells (Fig. 5). Specific binding of scFvA33 $\alpha$ sarcin to the GPA33 antigen was also confirmed by its immunodetection on polyvinylidene difluoride membranes using the scFvA33 $\alpha$ sarcin protein as the specific binding agent. As can be observed in Fig. 4B, binding of the immunotoxin to the antigen was observed only when the cells analyzed were GPA33 positive. A direct assessment of the immunotoxin affinity was achieved by enzyme-linked immunosorbent assay using cell extracts rendering a dissociation constant in the nM range (data not shown). Overall, these experiments showed that the immunotoxin was able to bind specifically to GPA33-containing cells, confirming the functionality of its scFv moiety.

The immunotoxin also maintained the highly specific ribonucleolytic activity against ribosomes to the same extent as wild-type  $\alpha$ -sarcin (Figs 6A and 7), revealing proper folding and substrate accessibility of the ribotoxin moiety in the scFvA33 $\alpha$ sarcin fusion protein. This specific activity was also preserved for at least 72 h of incubation of the protein at 37°C in media conditions previous to the assay (Fig. 7). Both results shown in Figs 5 and 7 suggest high protein stability for scFvA33 $\alpha$ sarcin in good accordance with the DSC results (Fig. 3B). Finally, the immunotoxin was also active when assayed in a zymogram against poly (A) (Fig. 6B) revealing that this much less specific activity was also preserved. In these experiments, however, scFvA33 $\alpha$ sarcin was significantly less active than  $\alpha$ -sarcin. This can be explained by a different efficacy of the renaturation process needed after the SDS-PAGE separation, given the larger size and structural complexity of the immunotoxin. This assay also revealed the



**Fig. 4.** (A) Flow cytometry analysis of mAbA33 (panels 1 and 3) or scFvA33αsarcin (panels 2 and 4) binding to GPA33-positive cells (SW1222, panels 1 and 2) and GPA33-negative cells (A431, panels 3 and 4). (B) Binding to the GPA33 antigen in extracts from SW1222 (left) and A431 (right) cells blotted to immobilized membranes. S-supernatant or P-pellet membranes were incubated with scFvA33αsarcin. The amount of total protein loaded onto the gels was between 10 and 40 μg in all assays performed. The mobility of the bands detected by scFvA33αsarcin in the supernatant of the SW1222 cell extracts (left panel) agrees with the expected molecular mass of the GPA33 (43 kDa) antigen. The central lanes correspond to Bio-Rad Precision Plus Protein standard markers.

absence of any other contaminating RNase-like activity in the scFvA33αsarcin preparation.

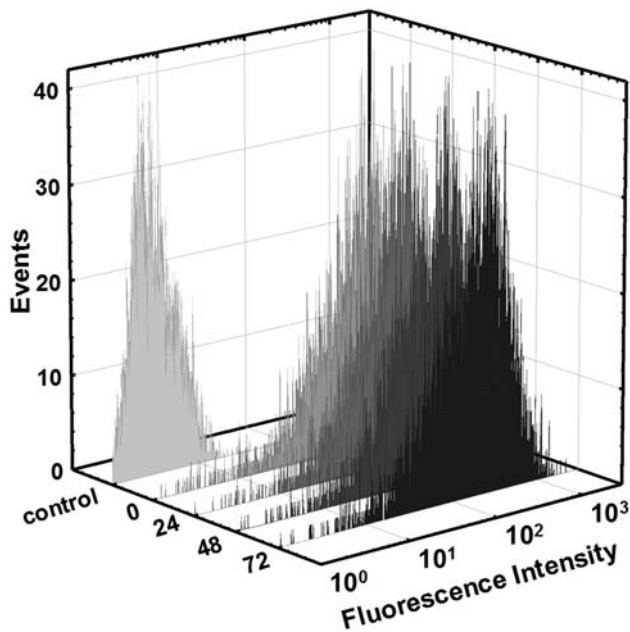
#### Cellular binding and internalization

Cellular binding and internalization of scFvA33αsarcin was studied using immunofluorescence and confocal microscopy with a FITC-labeled version of the immunotoxin which was previously characterized by flow-cytometry to confirm that its cell-binding specificity remained unaltered (data not shown).

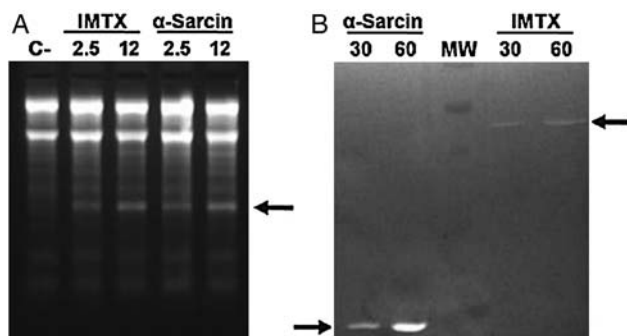
Immunofluorescence microscopy images showed how both scFvA33αsarcin-FITC and mAb A33, used as positive control, bound to the membrane of the GPA33-positive cells (Fig. 8). Images corresponding to the immunotoxin suggested that some scFvA33αsarcin internalization was also taking place (Fig. 8D, upper image). In order to confirm these observations, a much longer period of incubation time (24 h) was studied. These preparations were then analyzed by means of confocal microscopy confirming internalization (Fig. 9).

#### Protein biosynthesis inhibition activity

The antitumoral ability of α-sarcin has been described long time ago (Olson and Goerner, 1965; Olson *et al.*, 1965). Apparently, transformed cells display a higher amount of acid phospholipids on their outer leaflet membrane (Connor *et al.*, 1989; Zachowski, 1993; Ran *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2008) facilitating α-sarcin attachment (Gasset *et al.*, 1989, 1990, 1991) which is then internalized via endocytosis involving acidic endosomes and the Golgi (Olmo *et al.*, 2001). Once inside the cells, the protein exerts its specific cleavage at the ribosomes SRL inhibiting protein biosynthesis. Accordingly, free natural α-sarcin resulted cytotoxic against the three tumoral cell lines assayed (Fig. 10) with IC<sub>50</sub> values in the order of 1.0 μM (Table I), as expected (Olmo *et al.*, 2001). The cellular lines studied included GPA33-positive colon carcinoma SW1222 as well as GPA33-negative human rhabdomyosarcoma RD86 and lung carcinoma A431 cells. No significant differences were found among them, in terms of protein biosynthesis inhibition (Fig. 10).



**Fig. 5.** Flow cytometry analysis of scFvA33 $\alpha$ sarcin binding to GPA33-positive SW1222 cells after preincubation of the protein at 37°C in the media for 0, 24, 48, and 72 h. The control curve corresponds to cells only treated with the secondary antibody.



**Fig. 6.** RNase activity assays using (A) rabbit ribosomes or (B) poly(A) (zymogram) as substrates. The left panel shows the release of a 400 nt rRNA fragment ( $\alpha$ -fragment, indicated by an arrow) derived from the highly specific activity of  $\alpha$ -sarcin at the ribosomal SRL. In this case, 2.5 and 12 pmol were assayed for both proteins. The arrows at the zymogram indicate the colorless bands appeared as a consequence of the  $\alpha$ -sarcin non-specific ribonucleolytic activity on the polynucleotide used as substrate. In both cases 30 and 60 pmol of  $\alpha$ -sarcin or scFvA33 $\alpha$ sarcin (IMTX) were assayed.

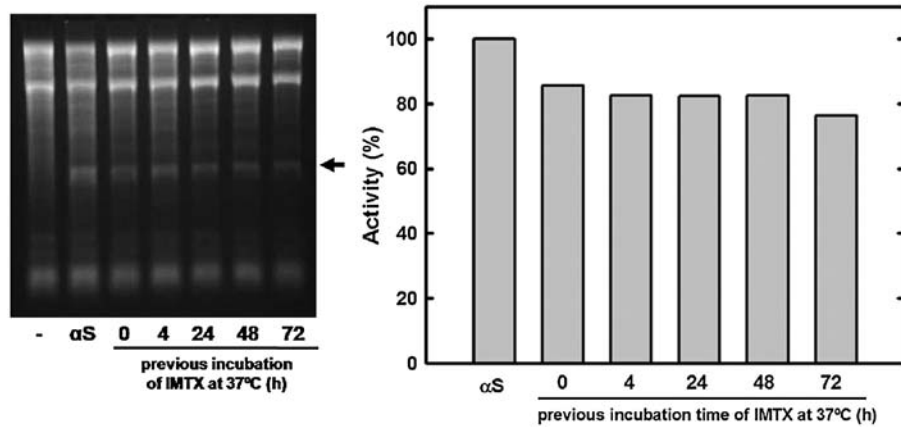
In contrast, when the scFvA33 $\alpha$ sarcin immunotoxin was the protein assayed, a remarkable enhancement in toxicity was found for the GPA33-positive SW1222 cells when compared with GPA33-negative tumoral cell lines assayed (Fig. 10). The IC<sub>50</sub> value found for SW1222 was of 0.03  $\mu$ M, much smaller than those ones calculated for the other four GPA33-negative cell lines assayed (Table I). This toxicity was also significantly higher in comparison with the  $\alpha$ -sarcin effect on the same SW1222 cellular line (Fig. 10, Table I). Overall, these results show an improved specificity of the immunotoxin for the GPA33-positive cells, in agreement with the observation that scFvA33 $\alpha$ sarcin specifically recognizes the antigen, binds to the membrane and is internalized (Figs 8 and 9).

## Discussion

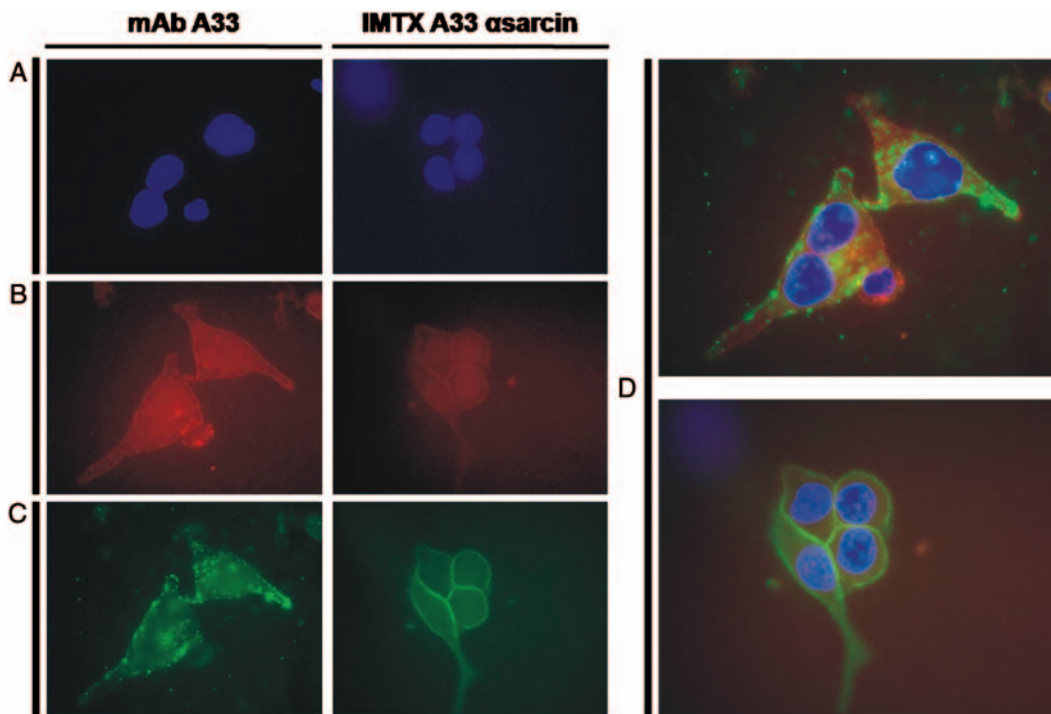
Ribotoxins were discovered during an antitumor screening program of the Michigan Department of Health started more than 50 years ago. The culture filtrate of the mould *Aspergillus giganteus* MDH18894, isolated from a sample of farm soil, was found to contain a protein inhibitory to both sarcoma 180 and carcinoma 755 induced in mice (Olson *et al.*, 1965). This protein, responsible for antitumoral effects, was named  $\alpha$ -sarcin for its antisarcoma activity (Olson and Goerner, 1965) and was later proved to be the first member of a family of extracellular fungal toxic RNases (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999). Unfortunately, later studies revealed an unspecific cytotoxicity of these proteins against non-tumoral cells, which limited their potential clinical use (Roga *et al.*, 1971). As a consequence of these results, the study of these ribotoxins was abandoned. Then, in 1977 it was published how ribotoxins were able to recognize and cleave the best conserved rRNA structure, the so-called SRL (Schindler and Davies, 1977). This observation renewed the interest in the understanding of their mechanism of action, a mechanism which is now known in quite good detail (Lacadena *et al.*, 2007). In the context of the work presented in this manuscript the most relevant feature of ribotoxins would be that they can recognize and inactivate any ribosome known, but cells are only killed if they cross their membranes to gain access to the ribosomes. So far, no protein receptors have been reported for  $\alpha$ -sarcin and its toxicity against tumours has been shown to be related with a differential interaction with the lipid components of the membranes (Gasset *et al.*, 1989, 1990, 1991, 1994; Oñaderra *et al.*, 1993; Olmo *et al.*, 2001).  $\alpha$ -Sarcin is an extremely powerful toxic agent, a 'natural killer' (Lacadena *et al.*, 2007), but only once inside the target cell. Accordingly, it constitutes an *a priori* ideal protein for the toxic moiety of an immunotoxin directed against specific tumoral cell lines, considering also its poor immunogenicity and high stability, as described to other ribotoxins (Goyal and Batra, 2000). Supporting this idea, it is worth mentioning the extended studies in this direction of other toxic RNases, although from a different origin, like onconase or ranpirnase (Rybak *et al.*, 2009; Schirrmann *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010).

This report describes the production, purification and characterization of a functional immunotoxin (scFvA33 $\alpha$ sarcin) based on the fusion of the monoclonal antibody scFvA33 domains and  $\alpha$ -sarcin. Previous studies dealing with this mAbA33 have shown how this protein, which is being assayed in clinical trials as part of radioimmunoconjugates, is a very plausible candidate for immunotherapy of colorectal cancer (Welt *et al.*, 2003; Chong *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2005). The results now described constitute the basis to develop an alternative therapy based on the exploitation of the advantages provided by the GPA33 specificity and the extremely efficient ribosome-inactivating activity of  $\alpha$ -sarcin (Lacadena *et al.*, 2007).

The scFvA33 $\alpha$ sarcin immunotoxin can be easily produced in the yeast *P. pastoris* system and purified to homogeneity with high yield (Fig. 2). This result and the possibility of employing fermenters for scaling up its production (Damasceno *et al.*, 2004) represent additional advantages for its potential clinical use. The purified immunotoxin appears to be stably and correctly folded according to its functional



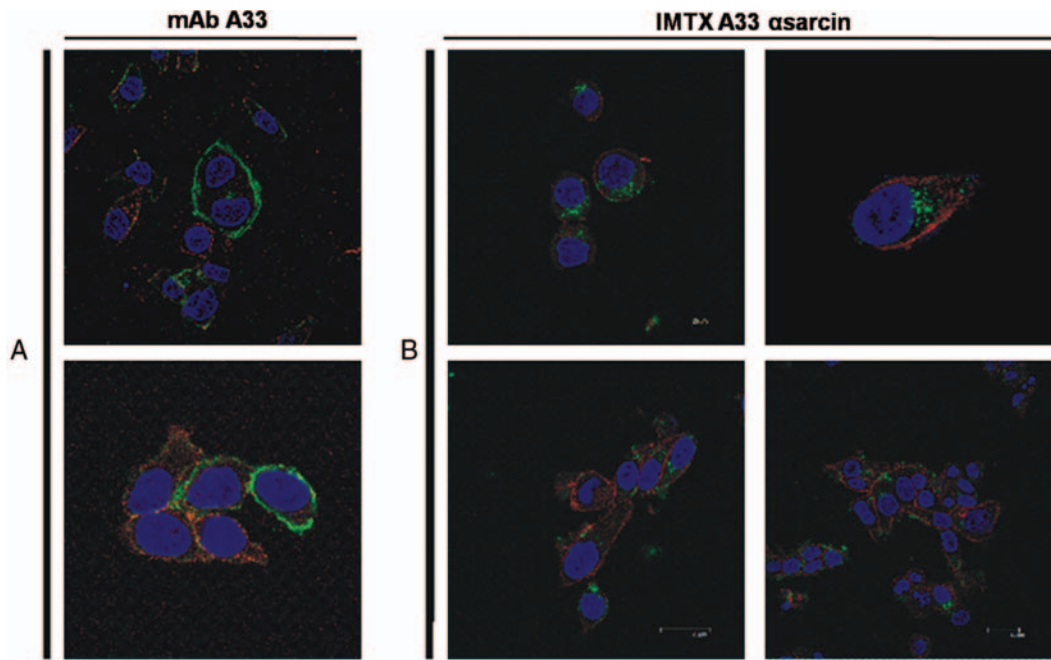
**Fig. 7.** Specific ribonucleolytic activity of scFvA33αsarcin against rabbit ribosomes after being previously incubated at 37°C for 0, 24, 48, and 72 h in the absence of this substrate. The arrow in the left panel shows the appearance of the α-fragment as a consequence of α-sarcin activity. The right panel shows quantification of this experiment. Results are expressed as percentage values taking as 100% the value obtained for natural wild-type α-sarcin (αS). (–), no protein added.



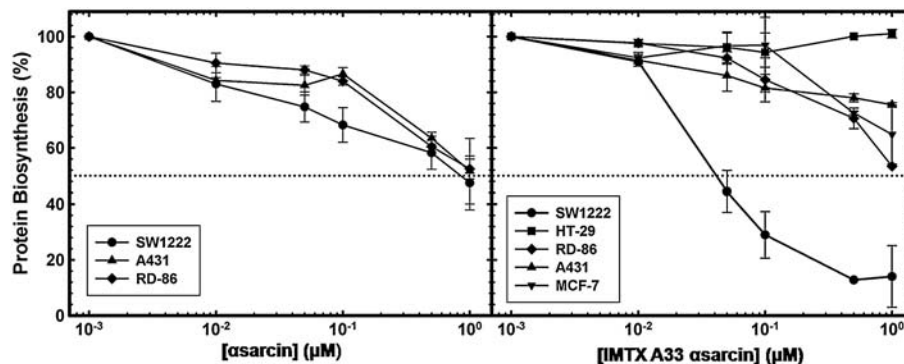
**Fig. 8.** Immunofluorescence microscopy images of SW1222 cells incubated for 20 min with scFvA33αsarcin-FITC at 25 μg/ml for 1 h in order to visualize protein binding to the cell surface. mAbA33 was used as control of the presence of the GPA33 antigen. (A) Nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. (B) Membranes visualized with antiCD-44 plus GAM-Alexa 647. (C) Fluorescence signal corresponding to scFvA33αsarcin-FITC (left panel) or mAbA33 plus GAR-FITC (right panel). (D) Images resulting from merging the three different channels.

and structural properties. Thus, it retains the GPA33-binding specificity (Fig. 4) with an estimated dissociation constant similar to those described for other scFvA33 constructs (Deckert *et al.*, 2003; Petrusch *et al.*, 2007), as well as the unique ribonucleolytic activity of fungal ribotoxins (Fig. 6). Moreover, stability is another advantage (Figs 3, 5 and 7) which is lacking in some other previously described similar immunotoxins (Kreitman, 2009). Furthermore, specific cellular uptake of the immun conjugate has been assessed by confocal microscopy, showing that the protein reaches the intracellular space (Figs 8 and 9), presumably allowing the α-sarcin moiety to act against ribosomes once released from

the target domain, probably by early and recycling endosomes, due to clathrin-independent endocytosis followed by different intracellular routes like lysosomal or Golgi apparatus retrograde pathway (Johannes and Decaudin, 2005; Ackerman *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2009). This internalization leads to specific protein biosynthesis inhibition and cell death. This cytotoxic action is much more effective than the one exerted by isolated α-sarcin when employed against the tumoral GPA33-positive cancer cells (Fig. 10 and Table I). In contrast, the immunotoxin results are practically innocuous when assayed against the GPA33-negative cell lines, suggesting that at least it accomplishes the minimum safety



**Fig. 9.** Images obtained by confocal microscopy. The images were taken with cells treated in identical conditions as those ones shown in Fig. 8 but incubated for 24 h, with mAbA33 (A) or scFvA33 $\alpha$ sarcin-FITC (B). Colors codes correspond to those described in Fig. 8 legend.



**Fig. 10.** Protein biosynthesis inhibition assays against GPA33-positive (SW1222) and GPA33-negative (HT29, RD86, A431, and MCF7) tumoral cellular lines. The right panel shows the results for the scFvA33 $\alpha$ sarcin immunotoxin whereas the left one displays the activity of natural wild-type  $\alpha$ -sarcin. The dotted line indicates the 50% level of protein biosynthesis inhibition used to calculate the IC<sub>50</sub> values (Table I).

**Table I.** IC<sub>50</sub> (protein concentration inhibiting 50% of protein synthesis) values ( $\mu$ M) obtained for the different proteins and cellular lines assayed.

	SW1222	A431	RD-86	MCF-7	HT-29
scFvA33 $\alpha$ sarcin	0.03	>1.00	>1.00	>1.00	>>1.00
$\alpha$ -sarcin	0.80	1.00	1.00	ND	ND

ND, not determined.

features required for continuing the studies directed to a potential therapeutic application.

As a conclusion, it can be summarized that this new scFvA33 $\alpha$ sarcin represents a step further in the design of ribotoxin-based immunotoxins in terms of purification yield, specificity, thermostability and safety.

### Acknowledgements

The anti-human CD44 hyaluronate receptor (CD44 H4C4) monoclonal antibody developed by August J.T. and Hildreth J.E.K. was obtained from the

Developmental Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the NICHD, and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA. 58242.

### Funding

This work was supported by a grant from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación [BFU2009-10185]. J.T.-A. is a recipient of a FPI predoctoral fellowship and L.G.-O. was appointed within the ‘Juan de la Cierva’ program, both from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

### References

- Ackerman, M.E., Chalouni, C., Schmidt, M.M., Raman, V.V., Ritter, G., Old, L.J., Mellman, I. and Wittrup, K.D. (2008) *Cancer Immunol. Immunother.*, **57**, 1017–1027.
- Álvarez-García, E., García-Ortega, L., Verdún, Y., Bruix, M., Martínez-del-Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2006) *Biol. Chem.*, **387**, 535–541.

- Better,M., Bernhard,S.L., Lei,S.P., Fishwild,D.M. and Carroll,S.F. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 16712–16718.
- Brinkmann,U. (2000) *In Vivo*, **14**, 21–27.
- Brinkmann,U. and Pastan,I. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1198**, 27–45.
- Carmichael,J.A., Power,B.E., Garrett,T.P.J., Yazaki,P.J., Shively,J.E., Raubischek,A.A., Wu,A.M. and Hudson,P.J. (2003) *J. Mol. Biol.*, **326**, 341–351.
- Carreras-Sangrà,N., Álvarez-García,E., Herrero-Galán,E., Tomé,J., Lacadena,J., Alegre-Cebollada,J., Oñaderra,M., Gavilanes,J.G. and Martínez-Del-Pozo,A. (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 153–160.
- Carroll,S.F. and Collier,R.J. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8707–8711.
- Catimel,B., Ritter,G., Welt,S., et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 25664–25670.
- Center,M.M., Jemal,A., Smith,R.A. and Ward,E. (2009) *CA Cancer J. Clin.*, **59**, 366–378.
- Chang,C.H., Gupta,P., Michel,R., Loo,M., Wang,Y., Cardillo,T.M. and Goldenberg,D.M. (2010) *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 2276–2286.
- Chong,G., Lee,F.T., Hopkins,W., et al. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 4818–4826.
- Conde,F.P., Orlandi,R., Canevari,S., Mezzanzanica,D., Ripamonti,M., Muñoz,S.M., Jorge,P. and Colnaghi,M.I. (1989) *Eur. J. Biochem.*, **178**, 795–802.
- Connor,J., Bucana,C., Fidler,I.J. and Schroit,A.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 3184–3188.
- Damasceno,L.M., Lee,F., Ritter,G., Old,L. and Batt,C.A. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **562**, 225–236.
- Damasceno,L.M., Pla,I., Chaung,H.J., Cohen,L., Ritter,G., Old,L. and Batt,C.A. (2004) *Protein Expr. Purif.*, **37**, 18–26.
- Deckert,P.M., Renner,C., Cohen,L.S., Jungbluth,A., Ritter,G., Bertino,J.R., Old,L.J. and Welt,S. (2003) *Br. J. Cancer*, **88**, 937–939.
- Dougan,M. and Dranoff,G. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 83–117.
- Endo,Y. and Wool,I.G. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 9054–9060.
- Endo,Y., Huber,P.W. and Wool,I.G. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 2662–2667.
- Enever,C., Batuwangala,T., Plummer,C. and Sepp,A. (2009) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 405–411.
- Engert,A., Diehl,V., Schnell,R., et al. (1997) *Blood*, **89**, 403–410.
- Foss,F.M., Saleh,M.N., Krueger,J.G., Nichols,J.C. and Murphy,J.R. (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **234**, 63–81.
- García-Ortega,L., Masip,M., Mancheño,J.M., Oñaderra,M., Lizarbe,M.A., García-Mayoral,M.F., Bruix,M., Martínez-del-Pozo,A. and Gavilanes,J.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 18632–18639.
- García-Ortega,L., Álvarez-García,E., Gavilanes,J.G., Martínez-del-Pozo,A. and Joseph,S. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4108–4119.
- Gasset,M., Martínez-del-Pozo,A., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (1989) *Biochem. J.*, **258**, 569–575.
- Gasset,M., Oñaderra,M., Thomas,P.G. and Gavilanes,J.G. (1990) *Biochem. J.*, **265**, 815–822.
- Gasset,M., Oñaderra,M., Goormaghtigh,E. and Gavilanes,J.G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1080**, 51–58.
- Gasset,M., Mancheño,J.M., Lacadena,J., Turnay,J., Olmo,N., Lizarbe,M.A., Martínez-del-Pozo,A., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (1994) *Curr. Top. Pept. Protein Res.*, **1**, 99–104.
- Ghetie,V., Swindell,E., Uhr,J.W. and Vitetta,E.S. (1993) *J. Immunol. Methods*, **166**, 117–122.
- Goyal,A. and Batra,J.K. (2000) *Biochem. J.*, **345**, 247–254.
- Heath,J.K., White,S.J., Johnstone,C.N., et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 469–474.
- Herrero-Galán,E., Lacadena,J., Martínez-del-Pozo,A., Boucias,D.G., Olmo,N., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (2008) *Proteins*, **72**, 217–228.
- Hertler,A.A. and Frankel,A.E. (1989) *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1932–1942.
- Holzman,D.C. (2009) *J. Natl. Cancer Inst.*, **101**, 624–625.
- Johannes,L. and Decaudin,D. (2005) *Gene Ther.*, **12**, 1360–1368.
- Kao,R., Martínez-Ruiz,A., Martínez-del-Pozo,A., Crameri,R. and Davies,J. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 324–335.
- King,D.J., Antoniow,P., Owens,R.J., et al. (1995) *Br. J. Cancer*, **72**, 1364–1372.
- Kondo,T., FitzGerald,D., Chaudhary,V.K., Adhya,S. and Pastan,I. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 9470–9475.
- Kreitman,R.J. (2000) *Expert. Opin. Pharmacother.*, **1**, 1117–1129.
- Kreitman,R.J. (2001) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2**, 313–325.
- Kreitman,R.J. (2003) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **5**, 44–51.
- Kreitman,R.J. (2009) *BioDrugs*, **23**, 1–13.
- Kreitman,R.J., Chaudhary,V.K., Waldmann,T., Willingham,M.C., FitzGerald,D.J. and Pastan,I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **87**, 8291–8295.
- Kreitman,R.J., Batra,J.K., Seetharam,S., Chaudhary,V.K., Fitz-Gerald,D.J. and Pastan,I. (1993) *Bioconjug. Chem.*, **4**, 112–120.
- Kuo,S.R., Alfano,R.W., Frankel,A.E. and Liu,J.S. (2009) *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1975–1982.
- Lacadena,J., Mancheño,J.M., Martínez-Ruiz,A., Martínez-del-Pozo,A., Gasset,M., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (1995) *Biochem. J.*, **309**, 581–586.
- Lacadena,J., Martínez-del-Pozo,A., Barbero,J.L., et al. (1994) *Gene*, **142**, 147–151.
- Lacadena,J., Martínez-del-Pozo,A., Lacadena,V., Martínez-Ruiz,A., Mancheño,J.M., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (1998) *FEBS Lett.*, **424**, 46–48.
- Lacadena,J., Martínez-del-Pozo,A., Martínez-Ruiz,A., Pérez-Cañadillas,J.M., Bruix,M., Mancheño,J.M., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (1999) *Proteins*, **37**, 474–484.
- Lacadena,J., Álvarez-García,E., Carreras-Sangrà,N., Herrero-Galán,E., Alegre-Cebollada,J., García-Ortega,L., Oñaderra,M., Gavilanes,J.G. and Martínez-del-Pozo,A. (2007) *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 212–237.
- Lamy,B., Davies,J. and Schindler,D. (1992) In Frankel,A.E. (ed.), *Genetically engineered toxins*. Marcel Dekker, New York, pp. 237–258.
- LeMaistre,C.F., Saleh,M.N., Kuzel,T.M., et al. (1998) *Blood*, **91**, 399–405.
- Li,Q., Verschraegen,C.F., Mendoza,J. and Hassan,R. (2004) *Anticancer Res.*, **24**, 1327–1335.
- López-García,B., Moreno,A.B., San Segundo,B., De los Ríos,V., Manning,J.M., Gavilanes,J.G. and Martínez-del-Pozo,A. (2010) *Protein Expr. Purif.*, **70**, 206–210.
- Martínez-del-Pozo,A., Gasset,M., Oñaderra,M. and Gavilanes,J.G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **953**, 280–288.
- Martínez-Ruiz,A., Martínez-del-Pozo,A., Lacadena,J., Mancheño,J.M., Oñaderra,M., López-Otín,C. and Gavilanes,J.G. (1998) *Protein. Expr. Purif.*, **12**, 315–322.
- Martínez-Ruiz,A., Kao,R., Davies,J. and Martínez del Pozo,A. (1999) *Toxicol.*, **37**, 1549–1563.
- Martínez-Ruiz,A., García-Ortega,L., Kao,R., Lacadena,J., Oñaderra,M., Mancheño,J.M., Davies,J., Martínez-del-Pozo,A. and Gavilanes,J.G. (2001) *Methods Enzymol.*, **341**, 335–351.
- Masip,M., Lacadena,J., Mancheño,J.M., Oñaderra,M., Martínez-Ruiz,A., Martínez-del-Pozo,A. and Gavilanes,J.G. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6190–6196.
- Masip,M., García-Ortega,L., Olmo,N., García-Mayoral,M.F., Pérez-Cañadillas,J.M., Bruix,M., Oñaderra,M., Martínez-del-Pozo,A. and Gavilanes,J.G. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 161–169.
- Olmo,N., Turnay,J., González de Buitrago,G., López de Silanes,I., Gavilanes,J.G. and Lizarbe,M.A. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2113–2123.
- Olson,B.H. and Goerner,G.L. (1965) *Appl. Microbiol.*, **13**, 314–321.
- Olson,B.H., Jennings,J.C., Roga,V., Junek,A.J. and Schuurmans,D.M. (1965) *Appl. Microbiol.*, **13**, 322–326.
- Oñaderra,M., Mancheño,J.M., Gasset,M., Lacadena,J., Schiavo,G., Martínez-del-Pozo,A. and Gavilanes,J.G. (1993) *Biochem. J.*, **295**, 221–225.
- Orlandi,R., Canevari,S., Conde,F.P., Leoni,F., Mezzanzanica,D., Ripamonti,M. and Colnaghi,M.I. (1988) *Cancer Immunol. Immunother.*, **26**, 114–120.
- O'Toole,J.E., Esseltine,D., Lynch,T.J., Lambert,J.M. and Grossbard,M.L. (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **234**, 35–56.
- Pastan,I., Chaudhary,V. and FitzGerald,D.J. (1992) *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 331–354.
- Pastan,I., Hassan,R., FitzGerald,D.J. and Kreitman,R.J. (2007) *Annu. Rev. Med.*, **58**, 221–237.
- Pérez-Cañadillas,J.M., Santoro,J., Campos-Olivas,R., Lacadena,J., Martínez-del-Pozo,A., Gavilanes,J.G., Rico,M. and Bruix,M. (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 1061–1073.
- Petrausch,U., Darnedde,J., Coelho,V., Panjideh,H., Frey,D., Fuchs,H., Thiel,E. and Deckert,P.M. (2007) *Protein Eng. Des. Sel.*, **20**, 583–590.
- Ran,S., Downes,A. and Thorpe,P.E. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 6132–6140.
- Rathore,D. and Batra,J.K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 58–63.
- Rathore,D. and Batra,J.K. (1997a) *Biochem. J.*, **324**, 815–822.
- Rathore,D. and Batra,J.K. (1997b) *FEBS Lett.*, **407**, 275–279.
- Rathore,D., Nayak,S.K. and Batra,J.K. (1997) *Gene*, **190**, 31–35.
- Reiter,Y. and Pastan,I. (1998) *Trends Biotechnol.*, **16**, 513–520.
- Ritter,G., Cohen,L.S., Williams,C.J.R., Richards,E.C., Old,L.J. and Welt,S. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 6851–6859.
- Roga,V., Hedeman,L.P. and Olson,B.H. (1971) *Cancer Chemother. Rep.*, **55**, 101–113.
- Rybak,S.M., Arndt,M.A., Schirrmann,T., Dübel,S. and Krauss,J. (2009) *Curr. Pharm. Des.*, **15**, 2665–2675.
- Schindler,D.G. and Davies,J.E. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1097–1100.

- Schirrmann,T., Krauss,J., Arndt,M.A., Rybak,S.M. and Dübel,S. (2009) *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9**, 79–95.
- Schnell,R., Vitetta,E., Schindler,J., *et al.* (1998) *Leuk. Lymphoma*, **30**, 525–537.
- Scott,A.M., Lee,F.T., Jones,R., *et al.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 4810–4817.
- Siemer,A., Masip,M., Carreras,N., García-Ortega,L., Oñaderra,M., Bruix,M., Martínez-del-Pozo,A. and Gavilanes,J.G. (2004) *Biol. Chem.*, **385**, 1165–1170.
- Turnay,J., Olmo,N., Jiménez,A., Lizarbe,M.A. and Gavilanes,J.G. (1993) *Mol. Cell Biochem.*, **122**, 39–47.
- Wawrzynczak,E.J., Henry,R.V., Cumber,A.J., Parnell,G.D., Derbyshire,E.J. and Ulbrich,N. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **196**, 203–209.
- Welt,S., Ritter,G., Williams,C., Jr, Cohen,L.S., John,M., Jungbluth,A., Richards,E.A., Old,L.J. and Kemeny,N.E. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1338–1346.
- Wilkinson,I.C., Hall,C.J., Veverka,V., Shi,J.Y., Muskett,F.W., Stephens,P.E., Taylor,H.A.J. and Carr,M.D. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 31928–31935.
- Yeung,T., Gilbert,G.E., Shi,J., Silvius,J., Kapus,A. and Grinstein,S. (2008) *Science*, **319**, 210–213.
- Yeung,T.M., Shaan,C.G., Wilding,J.L., Muschel,R. and Bodmer,W.F. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 3722–3727.
- Zachowski,A. (1993) *Biochem. J.*, **294**, 1–14.

# Production and characterization of scFvA33T1, an immunoRNase targeting colon cancer cells

Jaime Tomé-Amat<sup>1</sup>, Aida Menéndez-Méndez<sup>1</sup>, Lucía García-Ortega<sup>1</sup>, Carl A. Batt<sup>2</sup>, Mercedes Oñaderra<sup>1</sup>, Álvaro Martínez-del-Pozo<sup>1</sup>, José G. Gavilanes<sup>1</sup> and Javier Lacadena<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Graduate Field of Biomedical Engineering, Cornell University, Ithaca, NY, USA

## Keywords

colon cancer; GPA33; immunoRNase; RNase T1; scFvA33

## Correspondence

J. Lacadena, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain  
Fax: +34 9 1394 4159  
Tel: +34 9 1394 4259  
E-mail: javierl@bbm1.ucm.es

(Received 13 January 2012, revised 14 May 2012, accepted 27 June 2012)

doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08683.x

Within the last 10 years, the use of different RNases as therapeutic agents for various diseases has been pursued. Furthermore, the advancements of recombinant technology have allowed the assembly of proteins with different functions. In this regard, immunoribonucleases (immunoRNases) stand out as some of the most promising therapeutic candidates given their enzymatic and non-mutagenic character. Accordingly, the work reported here describes fusing RNase T1, one of the most studied members of the microbial RNase family, to the single-chain variable fragment (scFv) of a monoclonal antibody that targets the glycoprotein A33 antigen (GPA33) from human colon cancer cells. A heterologous production system, which employs the yeast *Pichia pastoris*, has been optimized to produce this immunoRNase (scFvA33T1) with yields of  $\sim 5\text{--}10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The purified protein appears to be correctly folded as it retains its antigen specificity and ribonucleolytic activity. Finally, it also shows specific binding to, internalization into and toxicity against GPA33-positive cell lines compared with the control, GPA33-negative cells. Overall, it can be concluded that scFvA33T1 is a promising therapeutic fusion protein with the additional advantage that presumably it can be produced and purified in large amounts using an easily scalable yeast-based system.

## Introduction

Many different immunotherapeutic approaches have been lately developed against tumoral processes and many antibody-based therapies have reached the clinic [1,2]. Among them, immunotoxins based on toxic polypeptides linked to an antibody moiety represent some of the most promising candidates against cancer cells, due to their cytotoxic specificity [3–5]. The nature of the toxic protein employed varies, but ricin, exotoxin A and diphtheria toxin have been thoroughly employed [4]. Immunotoxins containing fungal ribotoxins such as  $\alpha$ -sarcin or restrictocin have also been described with different levels of success [6]. However,

these immunotoxins are not always completely free of non-specific undesirable effects, in many instances provided by the nature of their toxic cargo. Indeed, the large size of the antibodies usually employed represents an additional problem to overcome because it hinders their diffusion into solid tumors, decreasing their presumed effectiveness. To circumvent these handicaps, new generations of chimeric immunoconjugates such as single-chain immunotoxins are being developed. These recombinant immunotoxins are usually constructed by fusing small monoclonal antibody fragments to proteins which only become toxic after

## Abbreviations

BMGY, buffered medium with glycerol for yeast; BMMY, buffered medium with methanol for yeast; EEA1, early endosome marker A1; GPA33, glycoprotein A33 antigen; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; NTA, nitrilotriacetic acid; scFv, single-chain variable fragment; scFvA33T1, immunoRNase based on mAb A33 and RNase T1.

entering the targeted cells. When these constructions become successful [7,8], the resulting fusion protein retains high specificity to recognize the corresponding antigen but is free of undesirable side effects. In this regard, immunoRNases, i.e. the result of fusing the single-chain variable fragment (scFv) of a monoclonal antibody to a non-cytotoxic RNase, are being revealed as new highly promising immunotherapeutic agents [7–12].

Glycoprotein A33 antigen (GPA33) is an extensively studied membrane antigen [13] which is overexpressed in 95% of the known primary and metastatic colorectal cancers whereas it is almost absent from any other tissue, tumoral or not. In addition, this antigen is persistently expressed at the cell membrane [14] and shows a high degree of internalization after formation of antigen–antibody complexes. Therefore, GPA33 represents an ideal target for immunotoxins or immunoRNases aimed against colon cancer cells [15]. Following this idea, a humanized monoclonal antibody designed against GPA33 has been produced in mouse myeloma NS0 cells [16], characterized and assayed against different human cancer lines [15–17]. Additionally, a system to produce large amounts of its fully functional scFv (scFvA33) in the yeast *Pichia pastoris* has been described [18,19].

Ribonuclease T1 (RNase T1), produced by the mold *Aspergillus oryzae*, is the best known and most thoroughly studied member of a large family of very similar microbial RNases [20,21]. Features such as its small size, resistance to proteolysis, thermostability, low immunogenicity and lack of toxicity [22,23] suggested that RNase T1 could be successfully used as part of an efficient immunoRNase. In fact, it has already been assayed as part of some antitumoral conjugates [24].

Following this idea, the work herein reported deals with the production, isolation and characterization of a new immunoRNase, based on the fusion of scFvA33 and RNase T1 (scFvA33T1), directed against human colon cancer cells. This type of cancer is among the most deadly ones with a significant incidence in the worldwide population [25]. Immunotherapy is being relatively successful for treatment, with three monoclonal antibodies already approved for clinical use [26]. However, late diagnosis and metastasis progression make necessary the development of more efficient drugs. In this regard, scFvA33T1 could be an improved alternative to the radiolabeled immunoconjugates that have been investigated recently [15,27,28]. The results presented, obtained from its structural and functional characterization using different cell lines, reveal promising perspectives for future applications.

## Results

### Protein production and purification

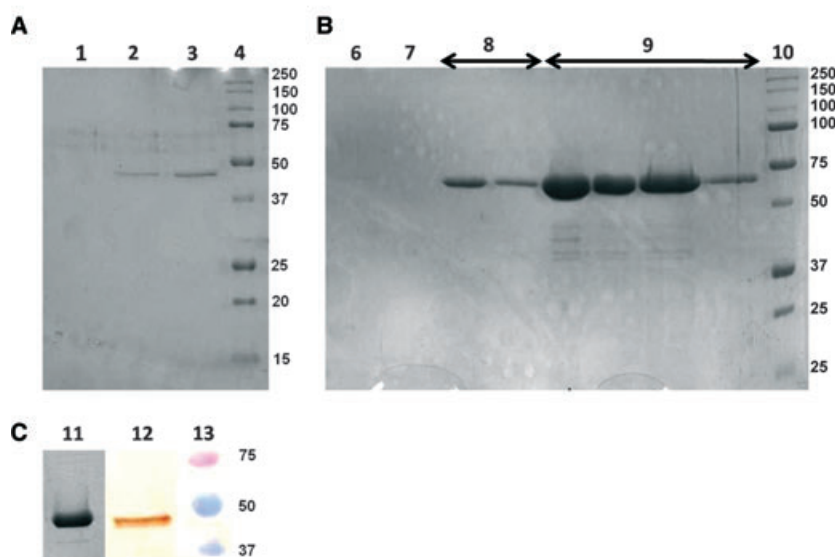
Production of scFvA33T1 was optimal 48 h after beginning methanol induction (Fig. 1). Then, the culture supernatant was collected and the protein was purified to homogeneity by affinity chromatography using an Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose column (Fig. 1). The isolated scFvA33T1 fusion protein showed an electrophoretic mobility in agreement with its expected molecular mass of 38.5 kDa and reacted with anti-His-tag IgG in western blot analysis (Fig. 1). Purification yield was 5–10 mg·L<sup>-1</sup> of induced medium culture.

### Structural characterization of the purified scFvA33T1

The far-UV CD spectrum of the isolated protein (Fig. S1A) was consistent with the adoption of a globular fold made of a large  $\beta$ -sheet contribution, as expected from the individual three-dimensional structures of both scFv and RNase T1 [29–31]. Furthermore, the predicted spectrum of scFvA33T1 calculated from those of the individual polypeptide components was in good agreement with the experimental one (Fig. S1A). With the same idea, the differential scanning calorimetry thermogram (Fig. S1B) was also coherent with the presence of a globular structure being denatured by a two-state native-unfolded transition, with a temperature value at the midpoint of the thermal transition of 53 °C. Thermal denaturation resulted in protein precipitation preventing calculation of thermodynamic parameters.

### Functional characterization of the purified scFvA33T1

Regarding its functionality, an immunoRNase must display at least two different functions to show correct synthesis and folding of both antibody and RNase moieties: specific binding to the target antigen and ribonucleolytic activity. Specific binding of scFvA33T1 to the GPA33 antigen was confirmed by flow cytometry using the GPA33-positive SW1222 and AsPC-1 cells (Fig. 2A, 85% of binding). Accordingly, scFvA33T1 did not bind to any of the two GPA33-negative cellular lines assayed (Fig. 2A, 4% of binding). This behavior matched nicely that shown by the monoclonal antibody mAbA33 used as a positive control (Fig. S2). This scFvA33T1 specific antigen binding ability was preserved for at least 72 h of preincubation



**Fig. 1.** Coomassie Brilliant Blue staining of 0.1% (w/v) SDS/15% (w/v) PAGE. (A) Analysis of aliquots from the extracellular medium of *P. pastoris* KM71 cells harboring the pPICZ $\alpha$ AscFvA33-RNaseT1 construct. Aliquots were taken at 0 h (lane 1), 24 h (lane 2) and 48 h (lane 3) after induction. Lane 4 corresponds to Bio-Rad Precision Plus Protein standards. (B) Analysis of aliquots from Ni-NTA affinity chromatography: flow through (lane 6), wash with sodium phosphate buffer (lane 7), wash with buffer containing 25 mM imidazole (lane 8) and elution with buffer containing 250 mM imidazole (lane 9). (C) Lane 11 is the result of loading 1  $\mu$ g of the purified scFvA33T1 after elution from the Ni-NTA column and dialysis; western blot analysis of this purified protein (lane 12) and the corresponding prestained Bio-Rad Precision Plus Protein standards (lane 13) are shown.

of the protein at 37 °C in the culture medium in the absence of cells (Fig. 2B). These experiments were also indicative that the linker between the two moieties of the fusion protein remained stable enough to withstand the analyses performed, since the antibody used was specific for the His-tag, located at the carboxyl end of the protein. In agreement with this observation, no contaminant ribonucleolytic activities were detected when the immunoconjugate was subjected to zymogram analysis against poly(G), a typical substrate used for RNase T1 (Fig. 3). Finally, scFvA33T1 also displayed non-distinguishable ribonucleolytic activity as free RNase T1 when assayed in solution and in identical conditions (Fig. 3A), revealing proper folding of the RNase moiety in the scFvA33T1 fusion protein.

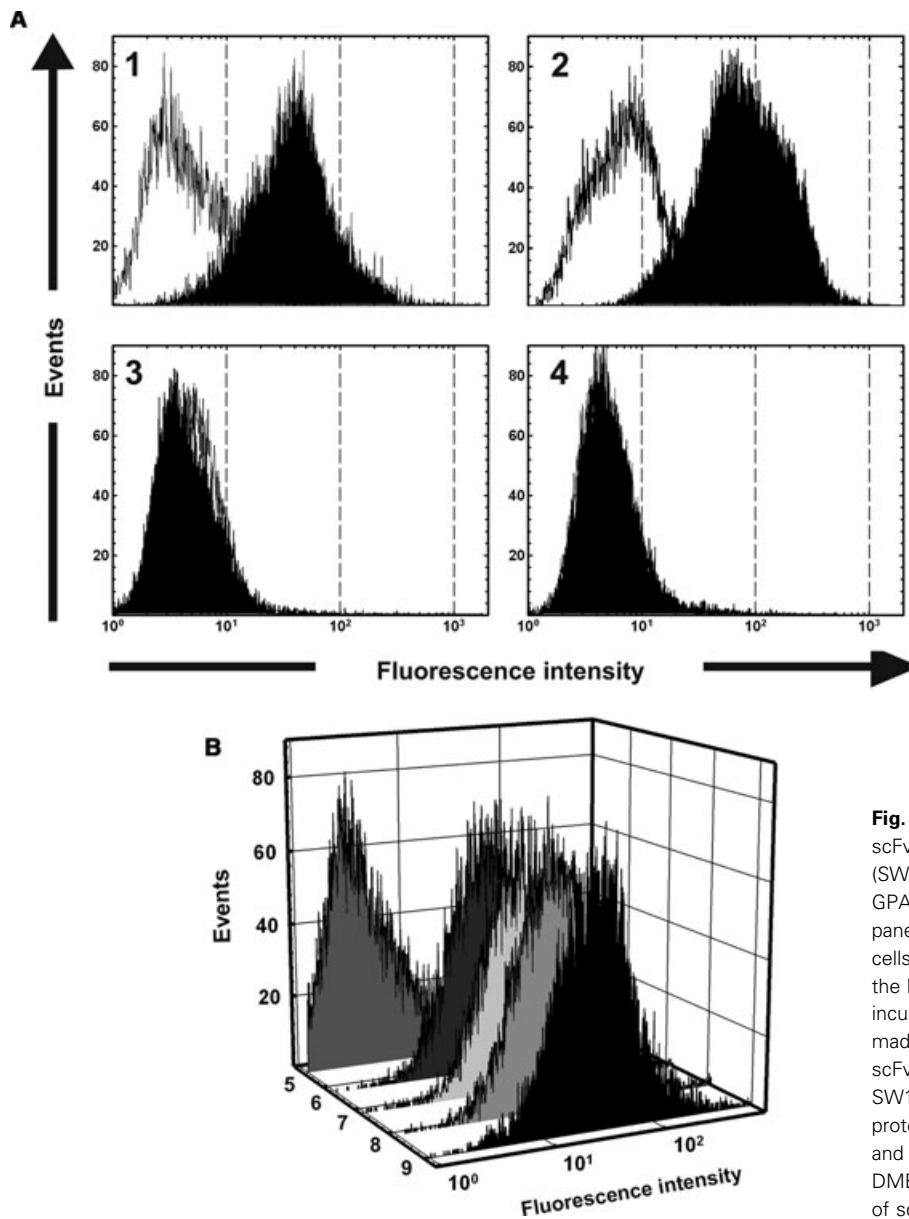
### Cellular binding and internalization

Cellular binding and internalization of scFvA33T1 was studied using confocal microscopy and an Alexa 555 labeled version of the immunoRNase which was previously characterized to confirm that it retained its original features. Thus, the far-UV CD spectrum revealed preservation of its original conformation (Fig. S1)

while flow cytometry studies showed unaltered cell binding specificity (Fig. S3). Then, confocal microscopy imaging confirmed binding of scFvA33T1-Alexa 555 to its SW1222 target cells (Fig. 4), followed by protein internalization, suggesting partial colocalization with membrane vesicles (maybe early endosomes) when incubations were performed for longer periods of time (Fig. 5).

### Cytotoxic activity

Cytotoxicity of scFvA33T1 against cells in culture was measured by estimating cell viability using the widely accepted 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay (Fig. 6). Two different cell lines were employed in these assays: GPA33-positive (SW1222) and GPA33-negative (HT29) cells. Both cellular lines were incubated in the absence and in the presence of the immunoRNase at different concentrations, as well as free RNase T1, and for several incubation times. Maximum effect was observed after 120 h of incubation. In agreement with all the previously described results, scFvA33T1 only displayed concentration-dependent cytotoxicity against the GPA33-positive cellular line. The IC<sub>50</sub> value was estimated to be 0.3  $\mu$ M



**Fig. 2.** (A) Flow cytometry analysis of scFvA33T1 binding to GPA33-positive (SW1222, panel 1, and AsPC-1, panel 2) and GPA33-negative (HT-29, panel 3, and MCF-7, panel 4) cells. White plots correspond to cells in the absence of the protein, while the black ones are due to cells previously incubated with scFvA33T1. (B) Stability test made using flow cytometry analysis of scFvA33T1 binding to GPA33-positive SW1222 cells after preincubation of the protein in the culture medium for 0, 24, 48 and 72 h (plots 6–9 respectively) at 37 °C in DMEM. Plot 5 was obtained in the absence of scFvA33T1.

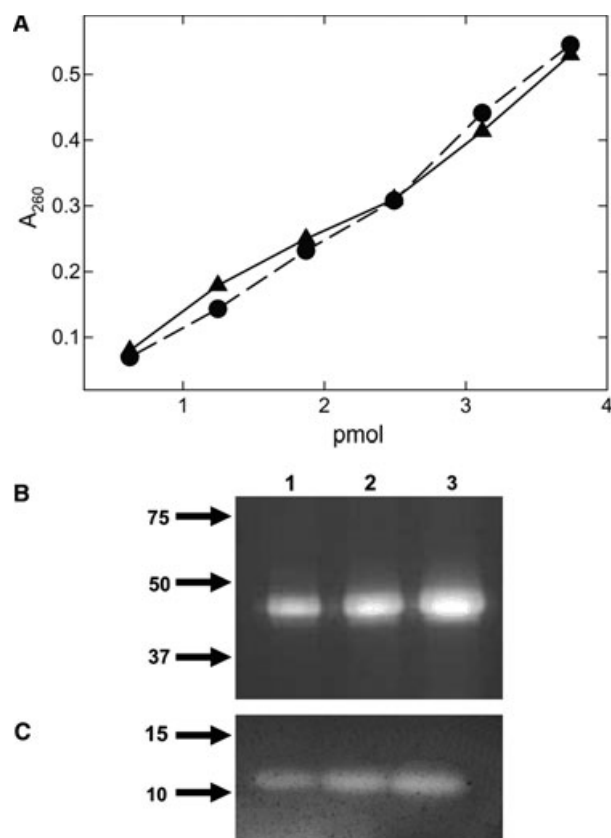
(Fig. 6). When assayed in identical conditions the cytotoxicity displayed by the free RNase T1 was negligible (Fig. 6).

## Discussion

This paper describes the production, purification and characterization of a functional immunoRNase (scFvA33T1) based on fusion of the humanized monoclonal antibody scFvA33 domains and RNase T1. Extensive studies had shown previously how this mAbA33, which is being assayed in clinical trials as part of radioimmunoconjugates, is a very plausible

candidate for immunotherapy of colorectal cancer [15,27,28]. The results now described open the alternative of a new therapy based on combination of the advantages provided by the GPA33 specificity and the effective ribonucleolytic activity of the non-toxic RNase T1 [20,32]. This new immunoconjugate is indeed produced and purified in relatively high yield and, above all, using a *P. pastoris* based system that should be easily scalable to large volume fermenters [18], which represents an additional advantage for its potential clinical use.

The protein appears to be stably and correctly folded and, accordingly, retains its binding specificity



**Fig. 3.** RNase activity assays of purified scFvA33T1. (A) Yeast RNA degradation assay. Absorbance at 260 nm values (resulting from the soluble oligonucleotides produced by the RNase activity on the RNA) versus the different amounts of scFvA33T1 (circles) and RNase T1 (triangles) assayed. (B) Poly(G) zymogram assay after SDS/PAGE of scFvA33T1: 3.9 pmol (lane 1), 12.9 pmol (lane 2) and 25.9 pmol (lane 3) of protein assayed. (C) Poly(G) zymogram assay after SDS/PAGE of RNase T1 (pmol in lanes 1–3 as in B). Arrows show the position of the corresponding electrophoretic molecular mass markers (kDa). RNase T1 leaks out of the gel during the incubations required to perform the assay because RNase T1 is highly acidic and much smaller than the immunoRNase [41]. This observation might explain why the intensities of the bands corresponding to scFvA33T1 and RNase T1 are different.

to the GPA33 antigen (Fig. 2), as well as its ribonucleolytic enzymatic activity (Fig. 3). Moreover, both moieties of the immunoconjugate remain bound up to cell binding (Fig. 4), suggesting that stability is another advantage which is lacking in some other previously described immunotoxins [3]. Furthermore, intracellular localization of the scFvA33T1 immunoconjugate has been assessed by confocal microscopy, showing that the protein reaches the intracellular space, associating to some apparently vesicular compartments (Fig. 5), presumably allowing the unspecific RNase moiety to act against intracellular RNA. It is well known how

negatively charged RNases such as RNase T1 are not toxic when added to the extracellular medium but become lethal when internalized [21,24].

Future studies should be aimed to increase this immunoRNase toxicity in order to reduce the amount required for therapy. In this regard, better chimeric designs might be achieved using a more easily hydrolyzable linker for an improved release of the RNase moiety to the cytosol [33]. Adding two identical modules of RNase to the chimeric protein, instead of one as is the case described here, has also been proved to increase toxicity in other constructions [11,12].

Interestingly, the non-toxic character of its ribonucleolytic moiety, and its lack of susceptibility to inhibition by the human ribonuclease inhibitor, suggest that scFvA33T1 might also be a more useful immunotherapeutic agent than most described so far for GPA33-positive colon cancers [15,28,34,35], including those containing human RNases [7,8,10]. Further studies based on the analysis of its cytotoxic properties are still needed, however, in order to confirm its potential therapeutic use.

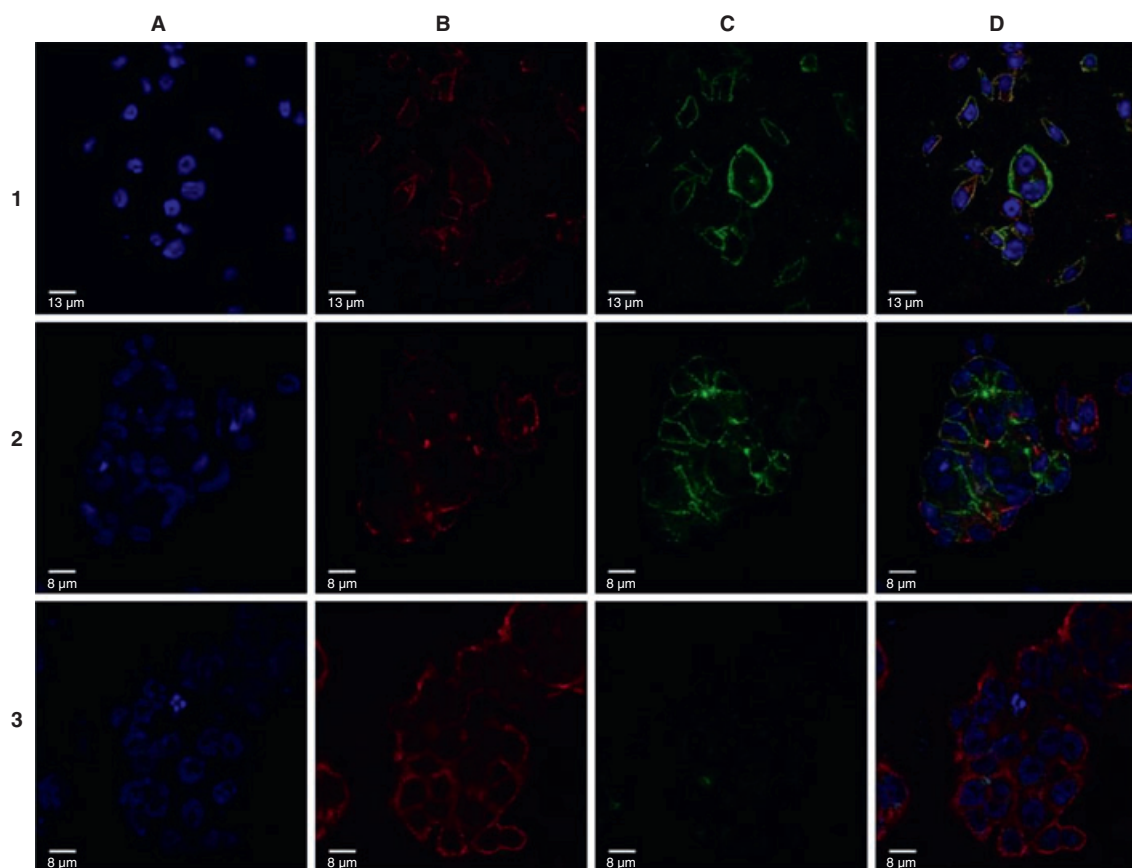
## Materials and methods

### Plasmid construction

C. N. Pace from Texas A&M University kindly provided the plasmid containing the cDNA sequence coding for RNase T1 [36]. The plasmid corresponding to the cDNA coding for scFvA33 was obtained before [18]. Both cDNA sequences were conveniently amplified by PCR using these plasmids as templates and the necessary primers containing the adequate flanking restriction sites *EcoRI*, *NotI* and *SalI* for vector cloning. The final scFvA33T1 construct, corresponding to the single-chain variable fragment A33 (scFvA33), RNase T1 and the linker between them, was cloned into pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Fig. S4) for extracellular protein production in the yeast *P. pastoris*. The linker amino acid sequence (Gly-Gly-Arg) was designed to provide flexibility and structural independence in order to allow the correct folding of both scFv and RNase T1 proteins. A 6xHis-tag was included at the C-terminal end of the construction to facilitate its purification. The resulting plasmid (pPICZ $\alpha$ AscFvA33-RNaseT1) was propagated in *Escherichia coli* cells DH5 $\alpha$ F' and transfected by electroporation into *P. pastoris* strain KM71 as described below.

### Protein production

Electrocompetent *P. pastoris* KM71 cells were electroporated with 10  $\mu$ g of linear plasmid as previously described [37,38], using a Bio-Rad Gene pulser apparatus (Bio-Rad,

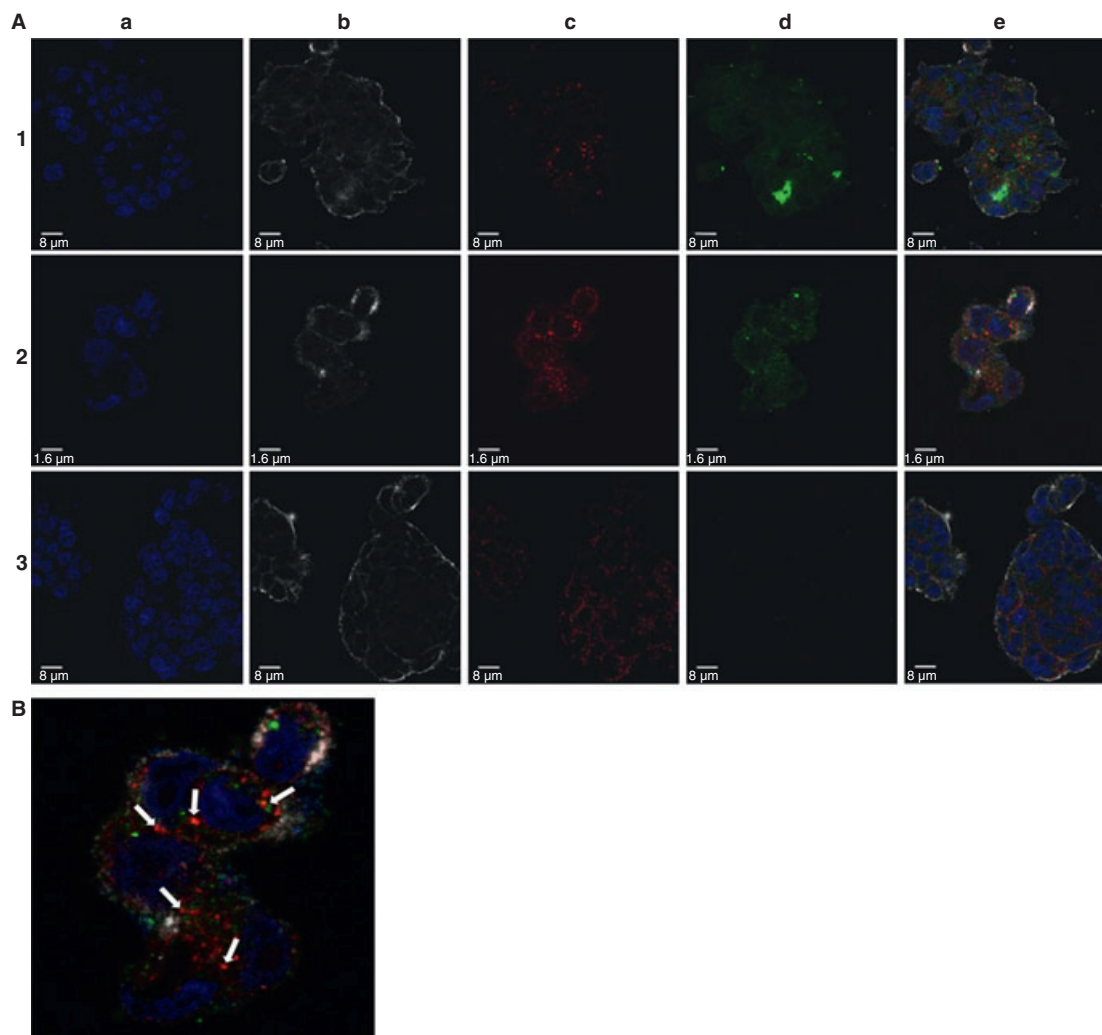


**Fig. 4.** Immunofluorescence confocal microscopy images of cells incubated for 30 min with scFvA33T1-Alexa 555 ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in order to visualize protein binding to the cell surface. The monoclonal antibody mAbA33 was used as a control of the presence of the GPA33 antigen. (A) Nuclei stained with DAPI; (B) membranes visualized with anti-CD-44 plus GAM-Alexa 647; (C) fluorescence signal corresponding to mAbA33 (row 1) or scFvA33T1-Alexa 555 (rows 2, 3); (D) images resulting from merging the three different channels. The different lines shown correspond to GPA33 containing SW1222 cells incubated with mAbA33 (row 1) or scFvA33T1-Alexa 555 (row 2) or GPA33-negative HT29 cells treated with scFvA33T1-Alexa 555 (row 3).

Berkeley, CA, USA). Cells harboring the desired construct were selected after plating the transformation mixture on yeast peptone dextrose sorbitol plates containing different amounts ( $100\text{--}750 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of the antibiotic zeocin. Five independent clones were tested for production. After growing them at  $30^\circ\text{C}$  for 16 h in 5 mL of yeast peptone dextrose containing  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  zeocin, the cultures were placed in 100 mL of buffered medium with glycerol for yeast (BMGY) and incubated at  $30^\circ\text{C}$  for an additional 16 h. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 20 mL of buffered medium with methanol for yeast (BMMY) for induction of protein expression. These cultures in BMMY were incubated for 120 h more at  $25^\circ\text{C}$ , shaking at 220 rpm. In order to maintain a stable induction, methanol was repeatedly added every 24 h to a final concentration of 0.5% (v/v). Aliquots were also taken every 24 h after induction for analysis of protein production by 0.1% (w/v) SDS/15% (w/v) PAGE and western blotting. An anti-6xHis-tag IgG, conjugated to peroxidase,

was used for specific protein detection. The colony producing the highest amount of scFvA33T1 was selected for larger scale production of the protein and also for long-term storage in glycerol at  $-80^\circ\text{C}$ . Large-scale production of scFvA33T1 was performed by inoculating a 2-L baffled flask containing 350 mL of BMGY with 25 mL of pre-inoculum, incubating overnight at  $30^\circ\text{C}$  and shaking at 220 rpm. Again, cells were harvested by centrifugation at room temperature, resuspended in 250 mL of BMMY, and incubated at  $25^\circ\text{C}$ , 250 rpm shaking, for 48 h supplementing with methanol every 24 h. Finally, the extracellular culture medium was separated by centrifugation and dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 M NaCl, pH 8.0.

An ammonium sulfate suspension of RNase T1 was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). This protein was exhaustively dialyzed against convenient buffers before being used as control in some of the experiments described below.



**Fig. 5.** Immunofluorescence confocal microscopy images of cells incubated 5 h with scFvA33T1-Alexa 555 ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in order to visualize protein internalization. Starting at the basal zone of the cells and ending at the apical one, 10 different images were taken along the z-axis for each preparation. Images shown correspond to slices 4–6, i.e. the optical planes corresponding to the internal content of the cells analyzed. (A) (a) Nuclei stained with DAPI; (b) membranes visualized with anti-CD-44 plus GAM-Alexa 647; (c) early endosomes visualized with anti-EEA1; (d) fluorescence signal corresponding to scFvA33T1-Alexa 555; (e) images resulting from merging the four different channels. The different rows shown correspond to GPA33 containing SW1222 cells (1, 2) or GPA33-negative HT29 cells (3). Rows 1 and 2 show different fields and enlargements of the same cells. (B) Zoom enlargement of panel 2e in (A) with white arrows showing scFvA33T1-Alexa 555 and anti-EEA1 colocalization.

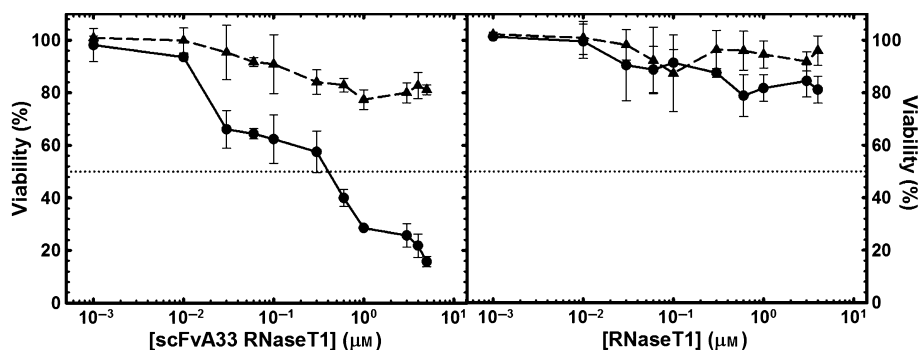
### Protein purification

The scFvA33T1 fusion protein was purified using an Ni-NTA agarose column (HisTrap™ FF Columns; GE Healthcare, Fairfield, CT, USA). The dialyzed culture supernatant was passed through the column at  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  using a peristaltic pump. The column was first washed with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 0.1 M NaCl, and then with the same buffer but containing 25 mM imidazole. Finally, the immunoRNase was eluted with 250 mM imidazole. The pooled protein fractions were applied to a PD-10 (GE Healthcare) column equilibrated in

50 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 M NaCl, pH 8.0, to remove the imidazole. When necessary, the purified scFvA33T1 was concentrated by ultrafiltration through Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) devices.

### Structural characterization

Structural characterization was performed as previously described [39–42]. Briefly, amino acid analyses after acid hydrolysis of the proteins were performed on a Biochrom 20 (Pharmacia-Pfizer, New York, NY, USA) automatic



**Fig. 6.** Cell viability of GPA33-positive SW1222 (●) or GPA33-negative HT-29 (▲) cellular lines in the presence of different scFvA33T1 or RNase T1 concentrations, after 120 h of incubation. The left graph corresponds to cells incubated in presence of the immunoRNase while the right one shows cells incubated with RNase T1 (see Materials and methods). The error bars were calculated using four independent determinations.

analyzer. The results were in agreement with those expected from translating the cloned cDNA into the corresponding amino acid sequence. They were also used to calculate the extinction coefficient of the protein. Absorbance measurements were carried out on an Uvikon 930 spectrophotometer (Kontron AG, Eching, Germany). Far-UV CD spectra were obtained on a Jasco 715 spectropolarimeter at 50 nm·min<sup>-1</sup> scanning speed. Cells of 0.1 cm optical path were employed. At least four spectra were averaged to obtain the final data. Analysis of protein stability by differential scanning calorimetry was performed on a MicroCal VP-DSC at 0.5 °C·min<sup>-1</sup> scanning speed.

### Cell line culture

Colorectal cancer HT29 (ATCC HTB-38) and breast cancer MCF-7 (ATCC HTB-22) cellular lines were used as GPA33-negative cells, while colon carcinoma SW1222 and pancreatic cancer, derived from colon metastasis, AsPC-1 (ATCC CRL-1682) were used as GPA33-positive cells. All four cell lines were grown as described previously [43,44] in DMEM containing glutamine (300 μg·mL<sup>-1</sup>), 50 U·mL<sup>-1</sup> of penicillin and 50 μg·mL<sup>-1</sup> of streptomycin. These cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum. Incubation was performed at 37 °C in a humidified atmosphere (CO<sub>2</sub> : air, 1 : 19, v/v). Harvesting and propagation of the cells were routinely performed by trypsinization. The number of cells used was determined in all assays described using a hemocytometer.

### Flow cytometry studies

Trypsinized cells were conveniently distributed into several aliquots, each containing 1.5 × 10<sup>5</sup> cells·mL<sup>-1</sup>, and washed three times with NaCl/P<sub>i</sub> containing 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) sodium azide. These aliquots were incubated with 2 μM purified scFvA33T1, or 1.4 μM mAbA33 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) as a positive

control, for 1 h at room temperature with gentle agitation. A second incubation was then performed in the dark, using fluorescent anti-His-tag Alexa 488 for scFvA33T1 or fluorescent goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (GAR-FITC) for mAbA33. After this incubation, the cells were separated by centrifugation (300 g, 4 °C, 10 min) and washed again with NaCl/P<sub>i</sub> containing 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) sodium azide. Flow cytometry was performed on a FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and data were analyzed using the WINMDI software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

### Ribonuclease activity assays

Two different assays were performed to analyze the ribonucleolytic activities of scFvA33T1 and free RNase T1. First, the activity was measured against purified *Torula* yeast RNA (Sigma, type VI) in solution. The RNA preparation used was previously fractionated to be enriched in the larger size fragments. The assay was essentially performed as described earlier [45]. The resulting absorbance values are proportional to the concentration of soluble small oligonucleotides resulting from the ribonuclease activity. Results obtained for the RNA samples assayed (2 mg·mL<sup>-1</sup>) in the absence of protein were used to take into account non-enzymatic RNA degradation.

Second, the activity of purified scFvA33T1 and RNase T1 after SDS/PAGE in 15% polyacrylamide gels containing 0.1% (w/v) SDS and 0.3 mg·mL<sup>-1</sup> poly(G) homopolyribonucleotide [20] was also evaluated using a method previously described [41]. Proteins exhibiting ribonuclease activity appeared as colorless bands in a dark blue background due to the local degradation of the polyribonucleotide.

### Alexa 555 labeling of scFvA33T1

The absence of primary amine groups in the complementary determinant regions of the scFvA33 was first checked

to prevent modifications that could result in defective binding [16]. Then, the Alexa Fluor 555 Protein Labeling Kit (Invitrogen) was employed to label the proteins by incubating 2.6 nmol of scFvA33T1 with 44.6 nmol of Alexa 555 for 15 min at room temperature. The buffer used was 0.1 M sodium carbonate, pH 8.3. scFvA33T1-Alexa 555 conjugate was purified using the resin provided by the kit. Finally, the degree of labeling was calculated according to the kit instructions.

### Fluorescence microscopy

Colon carcinoma SW1222 and HT29 cells were trypsinized and seeded at  $8 \times 10^5$  cells-well<sup>-1</sup> over coverglasses placed into a 24-well plate. Plates were then incubated overnight at 37 °C. The next day cells were treated with 0.5 μM of scFvA33T1-Alexa 555 for different times: 30 min for binding experiments or 5 h for internalization assays. Before fixing the cells, anti-CD-44 mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) [46] was added to the medium and incubated for 30 min at room temperature to visualize the membrane. Medium was then removed and cells were fixed with NaCl/P<sub>i</sub> containing 3% (v/v) *p*-formaldehyde for 15 min at room temperature. This reagent was quenched with 50 mM ammonium chloride in NaCl/P<sub>i</sub> and incubated at room temperature for 15 min more. These cells were then permeabilized with 0.01% (w/v) digitonine in NaCl/P<sub>i</sub> for 30 min at room temperature. After trimming the preparations with NaCl/P<sub>i</sub> containing 1% (w/v) BSA for 1 h more at room temperature, anti-early endosome marker A1 (anti-EEA1) IgG (Abcam, Cambridge, UK) was incubated for 1 h at room temperature. Then, preparations were washed three times with NaCl/P<sub>i</sub>-BSA 1%, and goat anti-rabbit GAR-488 (Invitrogen) and donkey anti-mouse DAM-Alexa 647 was added and incubated for an additional hour. Finally, 10 μL of Prolong Gold with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) was used to cover the slides. The preparations were kept at 4 °C. A Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and the corresponding Leica confocal software were used to obtain the images.

### MTT viability assay

Cell viability was evaluated by MTT using the Cell Proliferation Kit I (Roche, Basel, Switzerland). This assay is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt MTT to purple formazan crystals by metabolic active cells. Trypsinized  $5 \times 10^3$  cells-well<sup>-1</sup> were seeded into a 96-well plate and incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere. Then, the medium was removed and replaced with a new one containing scFvA33RNaseT1 or RNase T1 at different concentrations in 200 μL final volume. After an incubation time of 120 h, cells were further incubated with MTT at 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> during 2 h at 37 °C, following the MTT kit

instructions. Once this incubation was finished, the solubilization buffer was added and viability was measured in terms of absorbance at 550 nm. The higher amount of viable cells corresponds to the higher  $A_{550}$  values. Thus, readings obtained for cells incubated only with medium, in the absence of either scFvA33RNaseT1 or RNase T1, were taken as 100% viability. Results shown are the average of four independent assays.

### Acknowledgements

This work was supported by grant BFU2009-10185 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. JT-A is recipient of an FPI predoctoral fellowship and LG-O is appointed within the 'Juan de la Cierva' program, both from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Adams GP & Weiner LM (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**, 1147–1157.
- Dougan M & Dranoff G (2009) Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* **27**, 83–117.
- Kreitman RJ (2009) Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs* **23**, 1–13.
- Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ & Kreitman RJ (2007) Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med* **58**, 221–237.
- Holzman DC (2009) Whatever happened to immunotoxins? Research and hope are still alive. *J Natl Cancer Inst* **101**, 624–625.
- Carreras-Sangrà N, Alvarez-García E, Herrero-Galán E, Tomé J, Lacadena J, Alegre-Cebollada J, Oñaderra M, Gavilanes JG & Martínez-Del-Pozo A (2008) The therapeutic potential of fungal ribotoxins. *Curr Pharm Biotechnol* **9**, 153–160.
- Rybak SM, Arndt MA, Schirrmann T, Dübel S & Krauss J (2009) Ribonucleases and immunoRNases as anticancer drugs. *Curr Pharm Des* **15**, 2665–2675.
- Schirrmann T, Krauss J, Arndt MAE, Rybak SM & Dubel S (2009) Targeted therapeutic RNases (immunoRNases). *Expert Opin Biol Ther* **9**, 79–95.
- Ardelt W, Ardel B & Darzynkiewicz Z (2009) Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur J Pharmacol* **625**, 181–189.
- De Lorenzo C & D'Alessio G (2009) Human anti-ErbB2 immunoagents-immunoRNases and compact antibodies. *FEBS J* **276**, 1527–1535.

- 11 Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova JL, Lutsenko GV, Leonova OG, Popenko VI, Sapozhnikov AM & Deyev SM (2008) Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. *PLoS One* **3**, e2434.
- 12 Shlyakhovenko VA (2009) Ribonucleases in tumor growth. *Exp Oncol* **31**, 127–133.
- 13 Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, Tu GF, Ji H, Whitehead RH, Groenen LC *et al.* (1997) The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 469–474.
- 14 Ackerman ME, Chalouni C, Schmidt MM, Raman VV, Ritter G, Old LJ, Mellman I & Wittrup KD (2008) A33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1017–1027.
- 15 Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon JS, Hannah A, Chong GUP, Papenfuss A, Rigopoulos A *et al.* (2005) A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. *Clin Cancer Res* **11**, 4810–4817.
- 16 King DJ, Antoniw P, Owens RJ, Adair JR, Haines AM, Farnsworth AP, Finney H, Lawson AD, Lyons A, Baker TS *et al.* (1995) Preparation and preclinical evaluation of humanised A33 immunoconjugates for radio-immunotherapy. *Br J Cancer* **72**, 1364–1372.
- 17 Ritter G, Cohen LS, Williams CJR, Richards EC, Old LJ & Welt S (2001) Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res* **61**, 6851–6859.
- 18 Damasceno LM, Pla I, Chung HJ, Cohen L, Ritter G, Old L & Batt CA (2004) An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **37**, 18–26.
- 19 Damasceno LM, Lee F, Ritter G, Old L & Batt C (2009) High-level expression of a phage display-derived scFv in *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* **562**, 225–236.
- 20 Steyaert J (1997) A decade of protein engineering on ribonuclease T1-atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur J Biochem* **247**, 1–11.
- 21 Yoshida H (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol* **341**, 28–41.
- 22 Uchida T (1970) Immunochemical properties of ribonuclease T1 in relation to other ribonucleases. *J Biochem* **68**, 255–264.
- 23 Balandin TG, Edelweiss E, Andronova NV, Treshalina EM, Sapozhnikov AM & Deyev SM (2011) Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts. *Invest New Drugs* **29**, 22–32.
- 24 Yuki S, Kondo Y, Kato F, Kato M & Matsuo N (2004) Noncytotoxic ribonuclease, RNase T1, induces tumor cell death via hemagglutinating virus of Japan envelope vector. *Eur J Biochem* **271**, 3567–3572.
- 25 Center MM, Jemal A, Smith RA & Ward E (2009) Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* **59**, 366–378.
- 26 Enever C, Batuwangala T, Plummer C & Sepp A (2009) Next generation immunotherapeutics-honing the magic bullet. *Cur Opin Biotechnol* **20**, 405–411.
- 27 Chong G, Lee FT, Hopkins W, Tebbutt N, Cebon JS, Mountain AJ, Chappell B, Papenfuss A, Schleyer PUP, Murphy R *et al.* (2005) Phase I trial of 131I-huA33 in patients with advanced colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**, 4818–4826.
- 28 Welt S, Ritter G, Williams C Jr, Cohen LS, John M, Jungbluth A, Richards EA, Old LJ & Kemeny NE (2003) Phase I study of anticolon cancer humanized antibody A33. *Clin Cancer Res* **9**, 1338–1346.
- 29 Carmichael JA, Power BE, Garrett TPJ, Yazaki PJ, Shively JE, Raubischek AA, Wu AM & Hudson PJ (2003) The crystal structure of an anti-CEA scFv diabody assembled from T84.66 scFvs in V(L)-to-V(H) orientation: implications for diabody flexibility. *J Mol Biol* **326**, 341–351.
- 30 Pace CN, Heinemann U, Hahn U & Saenger W (1991) Ribonuclease T1: structure, function and stability. *Angew Chem Int Ed Engl* **30**, 343–454.
- 31 Wilkinson IC, Hall CJ, Veverka V, Shi JY, Muskett FW, Stephens PE, Taylor RJ, Henry AJ & Carr MD (2009) High Resolution NMR-based model for the structure of a scFv-IL-1 $\beta$  complex. *J Biol Chem* **284**, 31928–31935.
- 32 Daghighian F, Barendswaard E, Welt S, Humm J, Scott A, Willingham MC, McGuffie E, Lloyd JO & Larson SM (1996) Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of iodine-125-labelled A33 monoclonal antibody. *J Nucl Med* **37**, 1052–1057.
- 33 Goyal A & Batra JK (2000) Inclusion of a furin-sensitive spacer enhances the cytotoxicity of ribotoxina restrictocin containing recombinant single-chain immunotoxin. *Biochem J* **345**, 247–254.
- 34 Deckert PM, Renner C, Cohen LS, Jungbluth A, Ritter G, Bertino JR, Old LJ & Welt S (2003) A33scFv-cytosine deaminase: a recombinant protein construct for antibody-directed enzyme-prodrug therapy. *Br J Cancer* **88**, 937–939.
- 35 Kirui DK, Rey DA & Batt CA (2010) Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. *Nanotechnology* **21**, 105–115.
- 36 Shirley BA & Laurents DV (1990) Purification of recombinant ribonuclease T1 expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem Biophys Methods* **20**, 181–188.
- 37 Martínez-Ruiz A, Martínez-del-Pozo A, Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, López-Otín C & Gavilanes JG (1998) Secretion of recombinant pro- and

- mature fungal  $\alpha$ -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr Purif* **12**, 315–322.
- 38 López-García B, Moreno AB, San Segundo B, De los Ríos V, Manning JM, Gavilanes JG & Martínez-del-Pozo A (2010) Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **70**, 206–210.
- 39 Gasset M, Oñaderra M, Goormaghtigh E & Gavilanes JG (1991) Acid phospholipid vesicles produce conformational changes on the antitumor protein  $\alpha$ -sarcin. *Biochim Biophys Acta* **1080**, 51–58.
- 40 Lacadena J, Martínez-del-Pozo A, Martínez-Ruiz A, Pérez-Cañadillas JM, Bruix M, Mancheño JM, Oñaderra M & Gavilanes JG (1999) Role of histidine-50, glutamic acid-96, and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Proteins* **37**, 474–484.
- 41 García-Ortega L, Masip M, Mancheño JM, Oñaderra M, Lizarbe MA, García-Mayoral MF, Bruix M, Martínez-del-Pozo A & Gavilanes JG (2002) Deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease. *J Biol Chem* **277**, 18632–18639.
- 42 Herrero-Galán E, Lacadena J, Martínez-del-Pozo A, Boucias DG, Olmo N, Oñaderra M & Gavilanes JG (2008) The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin. *Proteins* **72**, 217–228.
- 43 Olmo N, Turnay J, González de Buitrago G, López de Silanes I, Gavilanes JG & Lizarbe MA (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem* **268**, 2113–2123.
- 44 Turnay J, Olmo N, Jiménez A, Lizarbe MA & Gavilanes JG (1993) Kinetic study of the cytotoxic effect of  $\alpha$ -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*, on tumor cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Mol Cell Biochem* **122**, 39–47.
- 45 Martínez-Ruiz A, García-Ortega L, Kao R, Lacadena J, Oñaderra M, Mancheño JM, Davies J, Martínez del Pozo A & Gavilanes JG (2001) RNase U2 and  $\alpha$ -sarcin: a study of relationships. *Methods Enzymol* **341**, 335–351.
- 46 Yeung TM, Shaan CG, Wilding JL, Muschel R & Bodmer WF (2009) Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 3722–3727.

## Supporting information

The following supplementary material is available:

**Fig. S1.** (A) Far-UV CD spectra of scFvA33T1, modified scFvA33T1-Alexa 555, scFvA33 and RNase T1. (B) Differential scanning calorimetry thermogram of scFvA33T1.

**Fig. S2.** Flow cytometry analysis of monoclonal antibody mAbA33 binding to GPA33-positive or GPA33-negative cellular lines.

**Fig. S3.** Flow cytometry analysis of scFvA33T1-Alexa 555 binding to GPA33-positive SW1222 cells.

**Fig. S4.** Diagram showing the plasmid pPICZ $\alpha$  AscFvA33-RNaseT1 employed to produce scFvA33T1 in *P. pastoris* KM71 cells.

This supplementary material can be found in the online version of this article.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be reorganized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.



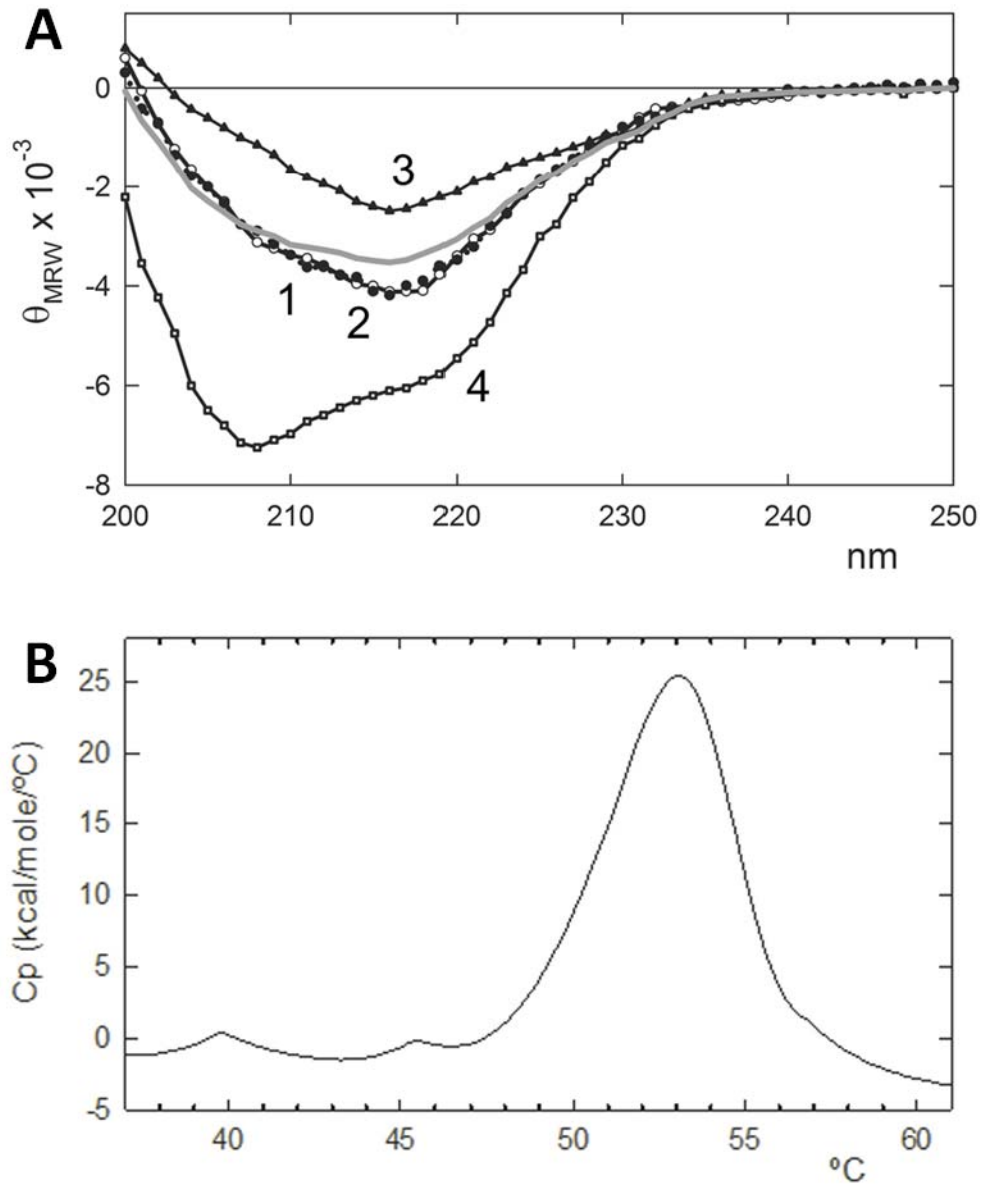
the **FEBS**  
Journal

[www.febsjournal.org](http://www.febsjournal.org)

## **Production and characterization of scFvA33T1, an immunoRNase targeting colon cancer cells**

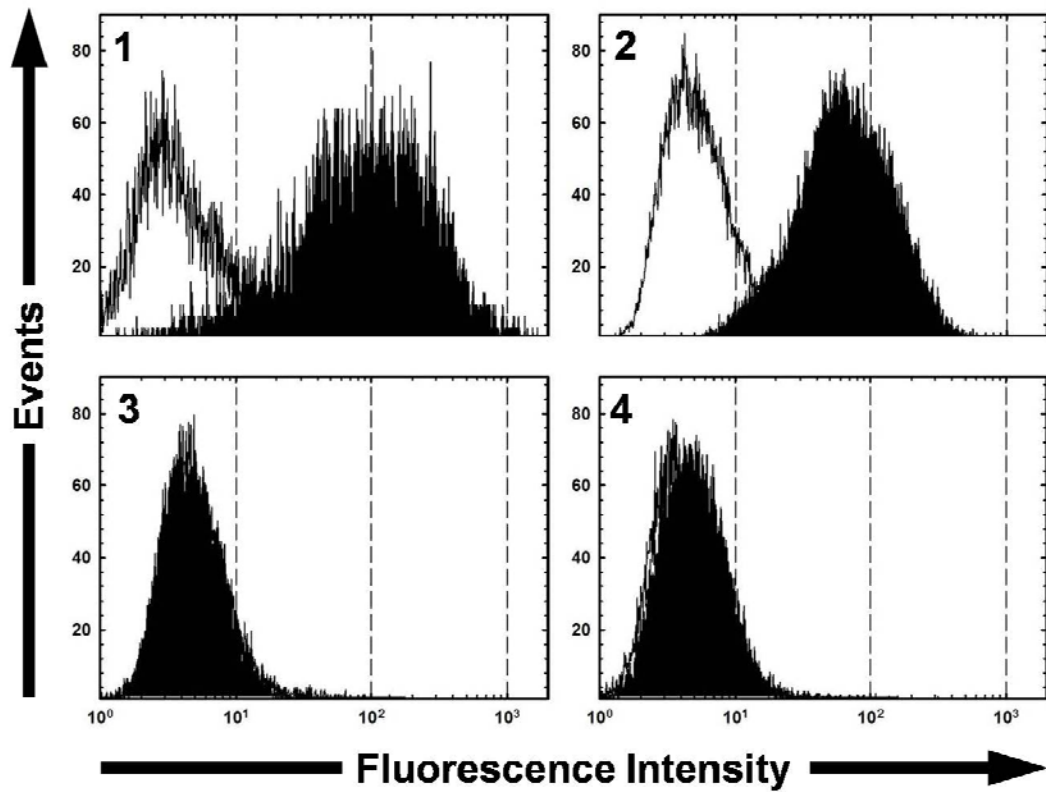
Jaime Tomé-Amat, Aida Menéndez-Méndez, Lucía García-Ortega, Carl A. Batt, Mercedes Oñaderra, Álvaro Martínez-del-Pozo, José G. Gavilanes and Javier Lacadena

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08683.x



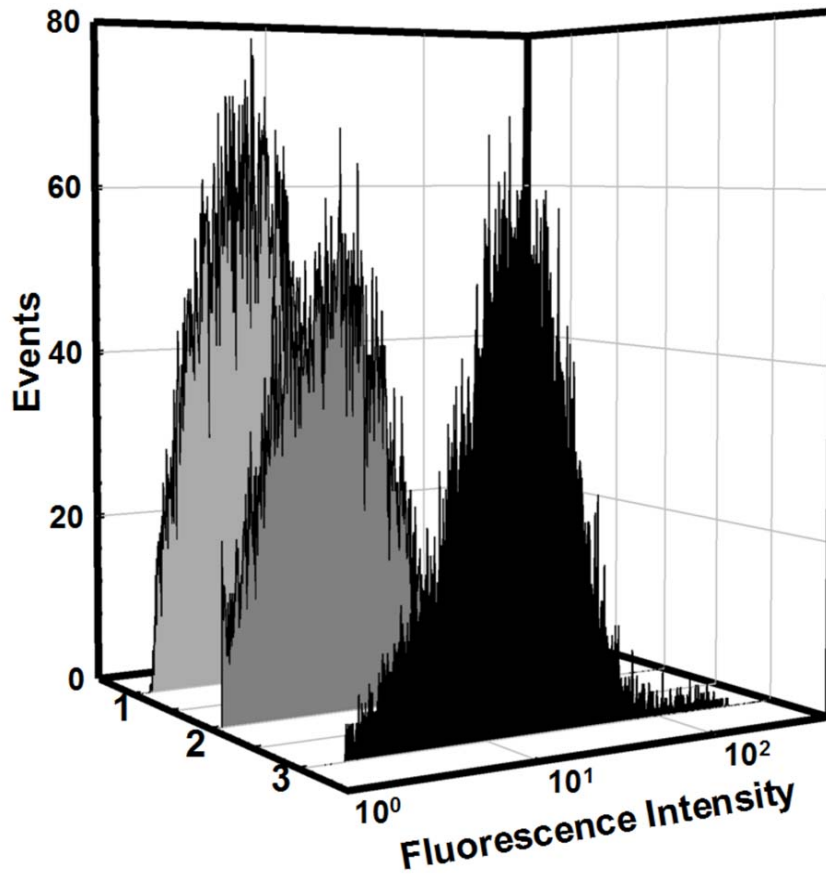
**Figure S1**

Fig. S1 a) Far-UV circular dichroism spectra ( $\theta_{MRW}$ , mean residue weight ellipticities expressed as degree  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>) of scFvA33T1 (1, empty circles), modified scFvA33T1-Alexa 555 (2, solid circles), scFvA33 (3) and RNase T1 (4). The grey line corresponds to the predicted spectrum of scFvA33T1 calculated considering the relative contribution of spectra (3) and (4) in terms of the corresponding number of amino acids in the immunoRNase. b) DSC thermogram of scFvA33T1. The estimated denaturation temperature of the protein was 53 °C (average value of three independent determinations). All these experiments were performed in PBS.



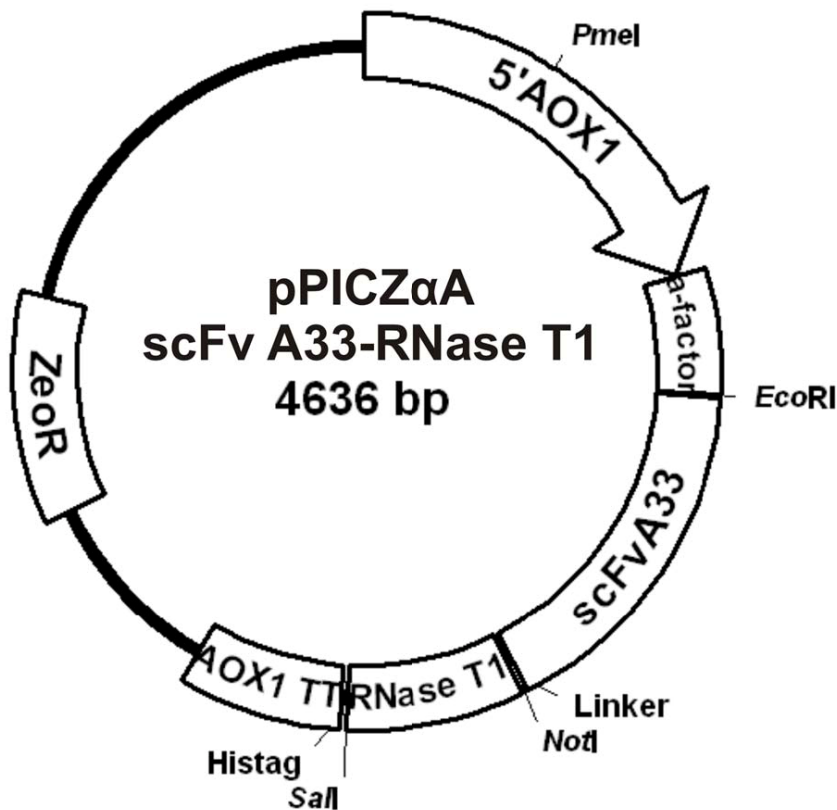
**Figure S2**

Fig. S2 Flow cytometry analysis of monoclonal antibody mAbA33 binding to GPA33-positive (panel 1: SW1222; panel 2: AsPC) or negative (panel 3: HT29; panel 4: MCF7) cellular lines.



**Figure S3**

Fig. S3 Flow cytometry analysis of scFvA33T1-Alexa 555 binding to GPA33-positive SW1222 cells. As a control for the Alexa 555 background, cells were also incubated with only the labeled protein (Plot 1). The secondary antibody control was made incubating the cells with anti-HisTag Alexa 488 in the absence of scFvA33T1-Alexa 555 (Plot 2). Plot 3 shows the cells incubated with both scFvA33T1-Alexa 555 and anti-HisTag Alexa 488.



**Figure S4**

Fig. S4 Diagram showing the plasmid pPICZαAscFvA33-RNaseT1 employed to produce scFvA33T1 in *P. pastoris* KM71 cells. Restriction enzyme sites used are shown: Eco RI, Not I, and Sal I were needed to insert the corresponding cDNA, Pme I was used to linearize the plasmid for electroporation. The 6xHistag was present in the original plasmid at the 3' site of the multicloning site. ZeoR: Zeocin resistance gene. 5'AOX1 is a fragment containing the AOX1 promoter that allows methanol-inducible, high-level expression in *P. pastoris*. α-Factor signal sequence allows for efficient secretion of the protein. AOX TT is the native transcription termination and polyadenylation signal from AOX1 gene that permits efficient 3' mRNA processing, including polyadenylation, for increased mRNA stability.