

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Aplicaciones terapéuticas de inmunotoxinas:
cáncer y alergia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rodrigo Lázaro Gorines

Directores

Francisco Javier Lacadena García-Gallo
María Teresa Villalba Díaz

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Aplicaciones terapéuticas de inmunotoxinas:
cáncer y alergia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rodrigo Lázaro Gorines

Directores

Francisco Javier Lacadena García-Gallo
María Teresa Villalba Díaz

Madrid, 2020

“La ciencia es un mito, sólo que es el mito más hermoso, el único generalizable a toda la especie y quizás el más digno de respetarse. La ciencia es un mito, y cuando pretende decir que está más allá del mito está mintiendo. La ciencia es la humildad en la búsqueda de lo verdadero y en cuanto pierda esa humildad ya no es más que una forma de embaucamiento.”

-Antonio Escohotado

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Javier Lacadena y Mayte Villalba por haberme dado la oportunidad de realizar el grueso de mi investigación predoctoral en su laboratorio y bajo su supervisión. Por vuestra dedicación conjunta, en especial en esta última etapa, consumida en la tarea de cerrar y sacar el trabajo adelante.

Del Departamento, también gracias a Álvaro por ese entusiasmo y dedicación, por demostrarme que no hay nada como tener pasión por lo que uno hace. A Nieves, Javier Turnay y Maria Antonia por facilitarme el trabajo en el cuarto de cultivos y todo lo que eso conlleva, también a Nacho, Julian, Mercedes, Teresa.. por sus ayudas puntuales.

Tampoco puedo olvidarme de mis compañeros de poyata y mesa durante este periodo, tanto del grupo de proteínas tóxicas como del grupo de alérgenos. Gracias a todos, por aprender conmigo y por enseñarme a la vez tantas cosas de la biología y de la vida. Una especial mención para los “inmunotóxicómanos”, Diego, Andrés y, sobre todo, Rorri, con quien para mal o para bien, pero sobre todo para siempre, di mis primeros pasos entre ácidos nucleicos y proteínas. En gran parte va dedicado a ti. Tantas horas. Ya sabes todo lo que esto significa. También a Juan Carlos, con quien me inicié en las cosas de las alergias, por transmitirme siempre su energía, dedicación y rigor, y sobre todo apoyo. En tantos momentos necesario. A otros muchos de los que ya se han ido y de los que aún quedan: JaviN, Pablo, Carmen, Laura Martín, Espe, Cris, Juan... A todos, sin un orden especial, simplemente por compartir tiempo dentro y fuera de la Facultad, por ayudarme a conectar y desconectar, por tener preparado el café a tiempo o simplemente por perdonar que hubiesen “desaparecido” ciertas llaves.

Gracias a Esti e Isra por estar ahí, por acompañar durante tanto tiempo, por las conversaciones más o menos científicas y sobre todo por las comidas de los jueves. Gracias a esta Tesis os he conocido. Ha merecido la pena.

A Lina, Miguel y Rubén del Hospital Civil de Málaga por su ayuda, supervisión y consejos durante. Hay una parte importante del trabajo que es fruto directo de vuestra acogida y dedicación durante mis dos temporadas malagüeñas. Gracias también a Laura, Luis y Marta del Grupo de Inmunología Molecular del Hospital Puerta de Hierro Majadahonda por la ayuda y colaboración durante estos años en el trabajo sobre las inmunotoxinas antitumorales.

A mis amigos del instituto, barrio, Facultad...Pablo, Goncho, Elena, Sergio, Nuria, Khalifi y, tantos otros. Gracias por las conversaciones, el apoyo, la generosidad, la paciencia y en conjunto vuestros momentos de diversión, éxtasis o tristeza compartida durante estos

años. Desde el final de la carrera a la entrada en la vida adulta. Es todo un placer. No lo cambiaba por nada. También a los “Cuñadanos” con quien tantas batallas baloncestísticas he librado, en especial estos últimos meses tan ajetreados y distraídos.

Gracias, David, por tanto vivido, aquí y allí, por recordarme insistentemente en horas de conversaciones que hay más mundo del que mi flipada cabeza puede abarcar. Cada día juntos es un auténtico placer. Gracias por estimularme y aguantarme. Espero que no termine nunca.

Gracias, Laura. Por todo. Por estar, estar y persistir. Por saber callar y por saber hablar, por saber hacer que mis oídos te escuchen. Por acompañarme con una sonrisa aún cuando no quería que nadie me acompañase. Pero sobre todo por aparecer así, cruzando un pasillo a saltitos, y provocar que me cayese por el hueco del ascensor. No hay manera en que pueda escribir lo que debería escribirte. *Sei solare, lo sai?*

Por último, quiero terminar por lo primero, agradeciendo a mi familia su apoyo y confianza. Gracias por creer en mí, por esforzaros por mi en tantas cosas, por vuestra dedicación y crianza que me han traído hasta aquí. Gracias *papa* y *mama*, en especial; pero también a mis abuelos, mis tíos (Juan, Juan Carlos, Marisa, Inma...) por mostrarme la ilusión y la exigencia. Gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	23
ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN.....	31
1.-Inmunoterapia	33
1.1.-Anticuerpos monoclonales	33
1.2.-Ingeniería de anticuerpos	34
2.-Inmunotoxinas	40
2.1.-Evolución.....	41
2.2.-Mecanismo de acción	43
2.3.-Optimización de los diseños: estabilidad, tamaño y humanización	47
3.-Ribotoxinas.....	49
3.1.-Características estructurales.....	50
3.2.-Características de su actividad ribonucleolítica.....	52
3.3.-Interacción con membranas y citotoxicidad.....	54
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1.-Materiales	63
1.1.-Tipos celulares.....	63
1.1.1.-Cepas de <i>Escherichia coli</i>	63
1.1.2.-Cepas de <i>Pichia pastoris</i>	63
1.1.3.-Líneas celulares de mamífero	64
1.2.-Organismos modelo <i>in vivo</i>	65
1.3.-Vectores de clonación y expresión	66
1.3.1.- <i>Pichia pastoris</i>	66
1.4.-Fragmentos de cDNA	66
1.5.-Medios de cultivo.....	67
1.5.1.-Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	67
1.5.2.-Medios de cultivo para <i>P. pastoris</i>	68
1.5.3.-Medios de cultivo para células de mamífero.....	68
1.6.-Antibióticos	69
1.7.-Soluciones y tampones de uso general.....	70
1.7.1.-Electroforesis de ácidos nucleicos	70
1.7.2.-Electroforesis de proteínas PAGE-SDS	70
1.7.3.-Inmunodetección (<i>Western blot</i>).....	70

1.7.4.-Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)	71
1.7.5.-Ensayo de actividad ribonucleolítica sobre ribosomas eucariotas	71
1.7.6.-Citometría de flujo	71
1.7.7.-Inmunofluorescencia	71
1.7.8.-Ensayo activación de basófilos (BAT)	72
1.7.9.-Ensayo de Anexina V-FITC/IP	72
1.8.-Columnas de cromatografía.....	72
1.9.-Sondas fluorescentes	73
1.10.-Relación de anticuerpos.....	74
1.11.-Relación de oligonucleótidos.....	75
2.-Metodología.....	76
2.1.-Amplificación, modificación, purificación y caracterización de ácidos nucleicos.....	76
2.1.1.-Electroforesis en geles de agarosa.....	76
2.1.2.-Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa	76
2.1.3.-Digestión con endonucleasas de restricción.....	77
2.1.4.-Ligación de fragmentos DNA	77
2.1.5.-Purificación de DNA plasmídico a pequeña escala	77
2.1.6.-Purificación de fragmentos de DNA.....	78
2.1.7.-Fenolización y precipitación de DNA plasmídico	78
2.1.8.-Preparación células de <i>E. coli</i> competentes	78
2.1.9.-Transformación <i>E. coli</i>	79
2.1.10.-Preparación <i>P. pastoris</i> competentes	79
2.1.11.-Electroporación <i>P.pastoris</i>	79
2.2.-Producción, purificación y caracterización estructural de proteínas recombinantes ...	80
2.2.1.-Producción de proteínas recombinantes.....	80
2.2.2.-Purificación de proteínas recombinantes	81
2.2.3.-Caracterización de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	81
2.2.4.-Inmunodetección (Western blot)	82
2.2.5.-Cálculo de coeficiente de extinción	82
2.2.6.-Espectrometría de masas.....	82
2.2.7.-Espectrometría de dicroísmo circular	83
2.2.8.-Cromatografía FPLC	83
2.3.-Caracterización de la interacción antígeno-anticuerpo	84
2.3.1.-ELISA sobre antígeno inmovilizado	84
2.3.2.-Marcaje de inmunotoxinas con sondas Alexa Fluor	84
2.3.3.-Citometría de flujo	85

2.3.4.-Ensayos de internación del complejo antígeno-inmunotoxina	85
2.3.5.-Inmunofluorescencia	86
2.4.-Caracterización de la actividad catalítica de Der p 1	86
2.4.1.-Ensayo del péptido fluorogénico Boc-QAR-AMC.....	86
2.5.-Caracterización del reconocimiento por IgE	87
2.5.1.-ELISA detección IgE alérgeno específica	87
2.5.2.-ELISA de inhibición con sueros.....	87
2.5.3.-Ensayo de desgranulación con células hRBL-2H3	88
2.5.4.-Test de Activación de Basófilos (BAT)	89
2.5.5.-Ensayo de internación del complejo alérgeno-IgE-FcεRI	90
2.6.-Caracterización de la unión de IL-33 al receptor ST2/IL-1RAcP	90
2.6.1. Ensayos de citometría de flujo	90
2.6.2.-Ensayos de estimulación de células Raw 264.7 con mL-33/IL33αS	90
2.7.-Caracterización de la actividad ribonucleolítica	91
2.7.1.-Ensayo frente a ribosomas de mamífero.....	91
2.8.-Estudio de la estabilidad de las inmunotoxinas en condiciones fisiológicas	92
2.8.1.-Ensayos de estabilidad en suero.....	92
2.9.-Caracterización de la actividad citotóxica.....	92
2.9.1- Ensayo de incorporación de leucina tritiada.....	92
2.9.2.-Ensayo de viabilidad celular	93
2.9.3.-Ensayo de Anexina V-FITC/IP	94
2.10.-Caracterización de la actividad antitumoral <i>in vivo</i>	95
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
BLOQUE I. INMUNOTOXINAS ANTITUMORALES DIRIGIDAS AL ANTÍGENO CEA: OPTIMIZACIÓN DE FORMATOS PARA EL TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i>.....	101
1.-Antecedentes	103
1.1.-Inmunotoxinas antitumorales basadas en RNAsas fúngicas	103
1.2.-Antígeno carcinoembrionario	105
1.3.-Anticuerpo MFE23 scFv.....	109
1.4.-Anticuerpo de dominio único VHHCEA5v2	111
1.5.-Formato de anticuerpo <i>trimerbody</i>	112
2.-Resultados.....	115
2.1.-IMTXCEAαS e IMTXTRICEAαS.....	115
2.1.1.-Diseño y obtención de plásmidos de expresión	116
2.1.2.-Producción y purificación de las inmunotoxinas	117
2.1.3.-Caracterización estructural	118
2.1.4.-Caracterización funcional.....	120
2.1.5.-Caracterización del efecto antitumoral <i>in vivo</i>	127

2.2.-VHHCEA5v2 α S.....	131
2.2.1.-Diseño y obtención de los plásmidos de expresión.....	131
2.2.2.-Producción y purificación de la inmunotoxina.....	132
2.2.3.-Caracterización estructural.....	133
2.2.4.-Caracterización funcional.....	135
3.-Discusión.....	140
BLOQUE II. DESARROLLO DE DOS INMUNOTOXINAS DIRIGIDAS FRENTE A LA ALERGIA.....	147
1.-Antecedentes.....	149
1.1.-Enfermedad alérgica respiratoria.....	149
1.1.1.-Mecanismo etiopatológico.....	150
1.1.2.-Células innatas linfoides tipo 2.....	152
1.1.3.-Señalización por IL-33/ST2.....	155
1.2.-Tratamiento de la enfermedad alérgica respiratoria.....	157
1.2.1.-Terapias mediante agentes biológicos.....	158
1.2.2.-Aproximaciones terapéuticas dirigidas a la señalización vía IL-33/ST2.....	162
1.3.-Inmunotoxinas frente a la enfermedad alérgica respiratoria: dos nuevas estrategias terapéuticas.....	163
1.3.1.-Estrategia alérgeno-dependiente: proDerp1 α S.....	165
1.3.2.-Estrategia alérgeno-independiente: IL33 α S.....	166
2.-Resultados.....	168
2.1.-proDerp1 α S.....	168
2.1.1.-Diseño y obtención de los plásmidos de expresión.....	168
2.1.2.-Producción y purificación de proDerp1 α S.....	169
2.1.3.-Caracterización estructural.....	171
2.1.4.-Caracterización funcional.....	172
2.2.-IL33 α S.....	182
2.2.1.-Diseño y obtención de los plásmidos de expresión.....	182
2.2.2.-Producción y purificación de IL33 α S.....	183
2.2.3.-Caracterización estructural.....	185
2.2.4.-Caracterización funcional.....	186
3.-Discusión.....	188
3.1.-proDerp1 α S.....	188
3.2.-IL33 α S.....	195
CONCLUSIONES.....	201
BIBLIOGRAFÍA.....	205

RESUMEN

Las inmunotoxinas son moléculas quiméricas que se incluyen dentro del grupo de los agentes terapéuticos biológicos. Constan de un dominio marcador, formado habitualmente por un anticuerpo o un fragmento de éste, aunque también por otras moléculas con capacidad de unión celular específica, como interleuquinas o factores de crecimiento, fusionados a un dominio tóxico, normalmente compuesto por una toxina proteica capaz de producir muerte una vez en el interior celular. De este modo, el dominio marcador dirige específicamente la actividad enzimática del dominio tóxico sobre sus células diana. En conjunto, su elevada especificidad de acción, combinada con su extraordinaria potencia citotóxica y la ausencia de mecanismos específicos de resistencia dotan a las inmunotoxinas de unas características óptimas para su aplicación como agentes terapéuticos frente al cáncer y otras enfermedades.

Treinta años después del desarrollo de las primeras inmunotoxinas, los avances realizados en el diseño, producción y efectividad de estas moléculas están permitiendo superar las limitaciones que en los orígenes de su investigación restringían sus posibilidades de aplicación clínica; entre ellas su elevada inmunogenicidad, su excesivo tamaño molecular o la aparición de efectos adversos asociados a cierta citotoxicidad inespecífica. De este modo, aunque todavía existen algunos impedimentos que dificultan la expansión de sus aplicaciones terapéuticas, principalmente relacionados con una limitada efectividad antitumoral *in vivo*; en los últimos años ha surgido un renovado interés en el estudio, optimización funcional y aplicación clínica de las inmunotoxinas, cuya consecuencia más importante ha sido la aprobación por la FDA de las tres primeras inmunotoxinas antitumorales para uso clínico. Así, actualmente, la investigación sobre estas moléculas bifuncionales se centra en aspectos como el desarrollo de nuevos formatos optimizados para el tratamiento de tumores sólidos, la mejora de sus propiedades farmacocinéticas y el diseño de nuevas construcciones con especificidad por nuevas dianas terapéuticas, encaminadas no sólo al tratamiento del cáncer, sino también al de otras patologías de tipo infeccioso, parasitario e inflamatorio.

La Tesis doctoral que se presenta, se centra en el desarrollo de varios diseños de inmunotoxinas recombinantes basadas en la fusión de la ribotoxina α -sarcina a diversos dominios marcadores con especificidad por antígenos celulares relevantes en algunos procesos tumorales o alérgicos, incluyendo el desarrollo de formatos estructurales novedosos. En este sentido, los objetivos concretos se han dividido en dos bloques independientes: 1) Generación de una nueva línea de inmunotoxinas antitumorales CEA-específicas, utilizando diversos formatos de anticuerpo -VHH, scFv o scFv-

trimerbody-, tratando de conseguir la optimización de su capacidad citotóxica antígeno-específica y de su efecto antitumoral *in vivo*; y 2) Desarrollo de dos estrategias novedosas, alérgeno-dependiente e independiente, basadas en inmunotoxinas para el tratamiento de la enfermedad alérgica. La primera, mediante un formato alérgeno-toxina, Der p 1- α -sarcina, centra su acción en las células efectoras de la alergia (mastocitos y basófilos) que presenten como diana terapéutica IgE Der p 1-específica en su membrana plasmática. La segunda, IL-33-dirigida, es una estrategia alérgeno-independiente cuya diana celular son las células ST2-positivas, en especial las células ILC2s, implicadas en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación Th2 durante la respuesta alérgica respiratoria crónica.

Los resultados obtenidos abarcan la producción de las construcciones mediante expresión heteróloga en la levadura *P. pastoris*, su purificación y posterior caracterización estructural y funcional. Los estudios de caracterización estructural evidenciaron su identidad molecular, así como un plegamiento globular en disolución acorde a los componentes que integran los dominios de las diversas inmunotoxinas. Además, todas las quimeras preservaron la capacidad de unión celular antígeno-específica de sus dominios marcadores, que combinada con la actividad inhibidora de la biosíntesis proteica y promotora de apoptosis de α -sarcina, dotó al conjunto de las construcciones de un potente efecto citotóxico específico sobre sus células diana.

En particular, las inmunotoxinas antitumorales IMTXCEA α S, IMTXTRICEA α S y VHHCEA5v2 α S mostraron un potente efecto citotóxico CEA-específico, que se mostró acorde a su capacidad de marcaje antigénico. Además, la inmunotoxina trimérica IMTXTRICEA α S, basada en el formato de anticuerpo scFv-*trimerbody*, demostró una capacidad de unión a CEA, una citotoxicidad específica *in vitro* y una actividad antitumoral *in vivo* frente a tumores de cáncer de colon inoculados en ratones BALB/c significativamente superiores a su análogo monomérico, IMTXCEA α S. Así, los resultados obtenidos con IMTXTRICEA α S suponen una prueba de concepto mostrando la generación de inmunotoxinas basadas en el formato *trimerbody* como una estrategia adecuada para el desarrollo de nuevos inmunoterapéuticos optimizados frente al cáncer.

Respecto a las inmunotoxinas para el tratamiento de la enfermedad alérgica, proDerp1 α S presentó un comportamiento enzimático y un reconocimiento por IgE específica similar al alérgeno Der p 1, incorporando además la actividad ribonucleolítica de α -sarcina. Así, en los ensayos sobre la línea celular RBL-2H3 hFc ϵ RI, semejante a los mastocitos tisulares, proDerp1 α S produjo un efecto citotóxico, únicamente sobre aquellos cultivos celulares sensibilizadas con IgE Der p 1-específica. En cuanto a la

segunda estrategia, la inmunotoxina IL33 α S mostró una capacidad de unión celular ST2-específica semejante a IL-33, si bien no desencadenó la activación celular propia de IL-33. Por último, su efecto promotor de la apoptosis sobre las células Raw 264.7, ST2-positivas, sugiere un efecto citotóxico *in vivo* sobre las células ILC2s dotado de potencial de aplicación terapéutica.

En conjunto, estos resultados no sólo confirman las posibilidades terapéuticas de las inmunotoxinas basadas en la fusión de α -sarcina a dominios marcadores de diferente naturaleza y especificidad; sino que además abren la puerta al diseño de inmunotoxinas triméricas funcionalmente optimizadas para el tratamiento de diversas enfermedades que, como el cáncer o la alergia, presentan determinadas poblaciones celulares susceptibles de ser eliminados mediante una acción citotóxica antígeno-específica.

ABSTRACT

Immunotoxins are a novel class of therapeutic agents consisting of a targeting domain (usually an antibody, a cytokine or growth factor, but also another cell-binding proteins) recombinantly fused to a cytotoxic domain, which is composed by protein toxin capable of promoting cell death once inside the cell. In this way, targeting domain marker directs the enzymatic activity of the toxic domain to specifically cause the death of its target cells. Taking together, the high specificity of their action, combined with their extraordinary cytotoxic potency and the absence of any specific resistance mechanisms endow immunotoxins with optimal properties for their application as therapeutic agents against cancer and other diseases.

After thirty years since the development of the first immunotoxins, the advances made in the design, production and effectiveness of these molecules have allowed us to overcome the main limitations that restricted their previous possibilities of clinical application (e.g. high immunogenicity, excessive molecular size and certain cytotoxicity nonspecific). Thereby, although there are still some impediments that hinder the expansion of its therapeutic applications (e.g. inefficient cytotoxic capacity or limited antitumor effectiveness *in vivo*), in recent years there has been renewed interest in the study, functional implementation and clinical application of immunotoxins. One of whose most important consequences has been the FDA approval of the first three antitumor immunotoxins for clinical use. As a consequence, current immunotoxin research focuses on aspects such as the development of optimized formats for enhancing the treatment of solid tumors and the improvement of their pharmacokinetic properties; but also searching for new designs with specificity for innovative therapeutic targets, aimed not just at the treatment of cancer, but also infectious, parasitic and inflammatory disorders.

Regarding the objective of this project we proposed the development of multiple recombinant immunotoxins based on the ribotoxin α -sarcin and various marker domains with specificity for cellular antigens relevant in the pathology of some tumor processes or allergic disease. The specific objectives are divided in two blocks: 1) the generation of a line of CEA-specific antitumor immunotoxins, based on various antibody formats (VHH, scFv or scFv-trimerbody) for the optimization of its antigen-specific cytotoxic activity and its antitumor *in vivo* effect; and 2) the development of two new immunotoxins for the treatment of allergic disease. The first is based on an allergen-dependent strategy (Der p 1-targeted) directed against allergy effector cells (mast cells and basophils) presenting IgE Der p 1-specific in their plasma membrane. The second one belongs to a allergen independent strategy (IL-33-targeted) acting on ST2-positive cells, especially

ILC2s cells, that are involved in the development and maintenance of Th2 inflammation occurring during chronic respiratory allergic disease.

The results obtained show the production of the different constructs by its heterologous expression in the yeast *P. pastoris* and its effective purification by conventional chromatographic techniques. Structural characterization studies evidenced the molecular identity of immunotoxins, while their secondary folding and conformation in solution corresponded to those expected according to the components of each construction. In addition, all immunotoxins preserved the antigen-specific cell binding capacity of their marker domains, which in combination with the apoptosis promoting activity of α -sarcin caused a potent specific cytotoxic effect on their target cells.

Regarding antitumor designs, IMTXCEA α S, IMTXTRICEA α S and VHHCEA5v2 α S showed a potent CEA-specific cytotoxic effect, which was shown to be consistent with their antigenic labelling ability. Moreover, the trimeric IMTXTRICEA α S, based on the scFv-trimerbody antibody format, showed a CEA-binding capacity, an *in vitro* specific cytotoxicity and *in vivo* antitumor activity against colon cancer xenografts enhanced to its monomer analogue, IMTXCEA α S. Therefore, trimeric immunotoxins represent a further step in the development of next-generation therapeutic immunotoxins.

Regarding the proposals for the treatment of allergic disease, proDerp1 α S presented an enzymatic behaviour and a specific IgE recognition pattern similar to the Der p 1 allergen, incorporating in addition the ribonucleolytic activity of α -sarcin. As a consequence, in the trials characterizing its effect on the hFc ϵ RI RBL-2H3 cell line, similar to mast cells, proDerp1 α S produced a cytotoxic effect only on those cell cultures sensitized with Der p 1-specific IgE. On the other hand, IL33 α S showed a ST2-specific cell binding capacity similar to IL-33, which also it did not trigger the cellular activation of IL-33. Finally, its apoptosis-promoting effect on Raw 264.7 cells, ST2-positive, predicts an *in vivo* cytotoxic effect on ILC2s cells that presents IL33 α S as a potential therapeutic tool.

Together, these results demonstrate the potential possibilities of α -sarcin-based immunotoxins for the treatment of various diseases, such as cancer or allergy, which are characterized by the pathological function of certain cell populations that can be effectively eliminated by cytotoxic agents specifically adapted to the particular requirements of each pathology.

ABREVIATURAS

- ADEPT:** terapia de profármaco y enzima dirigida por anticuerpo (*antibody directed enzyme prodrug therapy*)
- AIT:** inmunoterapia alérgeno-específica (*allergen-specific immunotherapy*)
- APC:** célula presentadora de antígeno (*antigen presenting cell*)
- BAT:** test de activación de basófilos (*basophil activation test*)
- BMGY:** medio tamponado con glicerol para levaduras (*buffered media glycerol for yeast*)
- BMMY:** medio tamponado con metanol para levaduras (*buffered media methanol for yeast*)
- BMGMY:** medio tamponado con glicerol metanol para levaduras (*buffered media glycerol methanol for yeast*)
- BSA:** albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)
- CBS:** tinción con azul de Coomassie (*Coomassie Blue staining*)
- CC3:** caspasa 3 escindida (*cleaved caspase 3*)
- CD:** dicroísmo circular (*circular dichroism*)
- CDR:** región determinante de complementariedad (*complementary determinant region*)
- CEA:** antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*)
- DAB:** diaminobenzidina
- dsFv:** dominios variables estabilizados por puentes disulfuro
- DTT:** ditioneitol
- ECL:** electroquimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence*)
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracell signal-regulated kinases*)
- Fab:** fragmentos de unión a antígeno
- FBS:** suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)
- Fc:** fracción cristalizante de la molécula de inmunoglobulina
- Fc ϵ RI:** receptor de alta afinidad de la Fc de la IgE
- Fc ϵ RII:** receptor de baja afinidad de la Fc de la IgE
- FDA:** *Food and Drug Administration* de los EEUU
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FPLC:** cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (*fast protein liquid chromatography*)
- Fv:** fragmento variable de la Ig
- HDM:** ácaros del polvo doméstico (*house dust mite*)

HRP: enzima peroxidasa (*horseradish peroxidase*)

HSA: albúmina de suero humana (*human serum albumin*)

Ig: inmunoglobulina

ILC: célula linfoide innata (*innate lymphoid cell*)

IP: yoduro de propidio

IMTX: inmunotoxina

IRAK: quinasa asociada al receptor de IL-1

JNK: quinasas c-Jun N-terminal

β-ME: β-mercaptoetanol (2-mercaptoetanol)

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

NC1: región de trimerización no colagenosa del colágeno

nt: nucleótido

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)

pb: pares de bases (referido a fragmento de DNA)

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PFA: paraformaldehído

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

RIP: proteína inactivadora de ribosomas (*ribosome-inactivating protein*)

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

scFv: dominios variables en formato de cadena única (*single chain fragment variable*)

scFab: fragmento de unión a antígeno en formato de cadena única

SDS: dodecilsulfato sódico (*sodium dodecylsulphate*)

SRL: Lazo Sarcina Ricina (*sarcin ricin loop*)

ST2: receptor específico de IL-33

sST2: forma soluble del receptor ST2

TAE: tampón tris acético EDTA

TSLP: linfopoyetina estromal tímica (*thymic stromal lymphopoietin*)

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

VH: dominio variable de la cadena pesada de la Ig

VHH: dominio variable monocatenario o nanoanticuerpo

VL: dominio variable de la cadena ligera de la Ig

WB: *Western blot*

YNB: base de nitrógeno para levaduras (*yeast nitrogen base*)

INTRODUCCIÓN

1.-Inmunoterapia

La inmunoterapia es un conjunto de estrategias terapéuticas que, mediante la actuación sobre el sistema inmune o la utilización de alguno de sus componentes, promueven la modulación específica del mecanismo patogénico de una enfermedad con el objetivo de provocar una mejora en su curso y/o sintomatología. En la actualidad estas terapias están siendo empleadas satisfactoriamente en el tratamiento de numerosos procesos tumorales, determinadas enfermedades infecciosas y algunas patologías autoinmunes e inflamatorias (**Emens et al., 2017; Wraith, 2017; Naran et al., 2018**).

Según su mecanismo de acción, existe una inmunoterapia dirigida directamente frente a determinados marcadores moleculares (específica) y otra que actúa mediante un efecto global sobre el sistema inmune (inespecífica). Para ambos casos, según las herramientas biotecnológicas que se utilicen, existe una inmunoterapia pasiva, basada en la transferencia de células o anticuerpos generados previamente *in vitro*, y una inmunoterapia activa, en la que se pretende inducir *in vivo* una respuesta inmune determinada (**Dougan & Dranoff, 2009; Galluzzi et al., 2014**).

Entre las variedades de inmunoterapia pasiva específica destaca la utilización de anticuerpos monoclonales (**Chames et al., 2009; Suzuki et al., 2015, Tsumoto et al., 2018**). En el tratamiento del cáncer, estos anticuerpos terapéuticos están frecuentemente diseñados para dirigirse a dianas específicas de las células tumorales, llamadas antígenos tumorales, marcando estas células, y facilitando su detección y destrucción por el sistema inmune. Por el contrario, otros anticuerpos monoclonales usados en el tratamiento del cáncer no causan una respuesta inmune sobre la célula tumoral, sino que únicamente bloquean la función biológica de su diana molecular, frecuentemente implicada en el desarrollo, progresión, invasión o metástasis tumoral. Además, también existen estrategias terapéuticas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales para dirigir de forma específica la actividad de una molécula tóxica o de un radioisótopo frente a las células tumorales con el objetivo de promover su eliminación (**Weiner et al., 2009; Scott et al., 2012; Kimiz-Gebologlu et al., 2018**).

1.1.-Anticuerpos monoclonales

En la actualidad, los anticuerpos monoclonales constituyen el grupo de agentes biológicos que han experimentado un mayor crecimiento en la clínica, debido a sus enormes posibilidades de aplicación en el diagnóstico y terapia de múltiples enfermedades (**Nelson et al., 2010; Singh et al., 2018**). Entre las razones de este

INTRODUCCIÓN

fenómeno se incluyen los importantes avances realizados en su desarrollo y optimización funcional; pero sobre todo, la sobresaliente capacidad de estas moléculas para apuntar a las mutaciones específicas o los defectos en la estructura y expresión proteica asociados a una gran diversidad de condiciones patológicas. Además, dada su naturaleza proteica, los anticuerpos monoclonales presentan un elevado potencial de manipulación, que incluye tanto la modificación de su estructura -buscando una mejora en sus propiedades farmacocinéticas, de difusión tisular, inmunogénicas o de afinidad por antígeno- como su “funcionalización” mediante la incorporación a estos de moléculas con diferentes naturalezas y actividades.

En este sentido, el desarrollo de la tecnología del hibridoma significó una verdadera revolución en todos los campos de la biomedicina, permitiendo obtener anticuerpos producidos por un clon celular derivado de un único linfocito B (monoclonales) y, por tanto, homogéneos, específicos de epítomos individuales y producibles en grandes cantidades (**Köhler & Milstein, 1975**).

A pesar del innegable éxito de esta primera generación de anticuerpos monoclonales, su aplicación clínica presenta importantes limitaciones debidas principalmente a su origen no humano: corta vida media sérica, ineficiente reclutamiento de las funciones efectoras y problemas inmunogénicos. De este modo, una proporción importante de los pacientes tratados con anticuerpos murinos desarrollan respuestas inmunes dirigidas frente a estos, provocando desde una reducción o pérdida de su eficacia hasta una reacción inmune adversa generalizada (**Klee, 2000**).

Con el fin de salvar estos obstáculos y proveer de nuevas variantes de anticuerpo optimizadas para la clínica se han ensayado diversas aproximaciones. Entre ellas destaca la obtención de anticuerpos monoclonales de origen humano y, en mayor medida, aquellas basadas en la aplicación de técnicas de ingeniería genética para la modificación estructural y funcional de los anticuerpos monoclonales murinos (**Chames et al., 2009; Mellman et al., 2011**).

1.2.-Ingeniería de anticuerpos

La ingeniería de anticuerpos consiste en el diseño y producción de anticuerpos monoclonales recombinantes optimizados, con el objetivo de superar las limitaciones de los anticuerpos monoclonales de primera generación en la terapia y diagnóstico *in vivo* (**Chames et al., 2009; Mellman et al., 2011**). El conocimiento adquirido sobre la estructura molecular y organización genética de las inmunoglobulinas (Igs), junto a los avances realizados en las técnicas de clonación y transferencia génica, han permitido

el desarrollo de esta segunda generación de anticuerpos monoclonales, en la que se incluyen fragmentos de anticuerpo, anticuerpos quiméricos y humanizados, y anticuerpos de formato multivalente.

Las razones a estos nuevos desarrollos responden a tres tipos de justificaciones: a) terapéuticas, buscando quimerizar o humanizar un anticuerpo monoclonal efectivo en modelos preclínicos; b) estratégicas, puesto que algunas aplicaciones requieren de la modificación de su estructura (formato), y c) prácticas, debido a los problemas de rendimiento de algunos hibridomas (**Hudson & Souriau, 2003**).

Fragmentos recombinantes

El hallazgo de que la capacidad de reconocimiento antígeno-específica de los anticuerpos reside en las regiones determinantes de complementariedad (CDR), localizadas en el fragmento variable (Fv), condujo al aislamiento de las secuencias génicas de este, permitiendo su incorporación en diferentes formatos de anticuerpo recombinante.

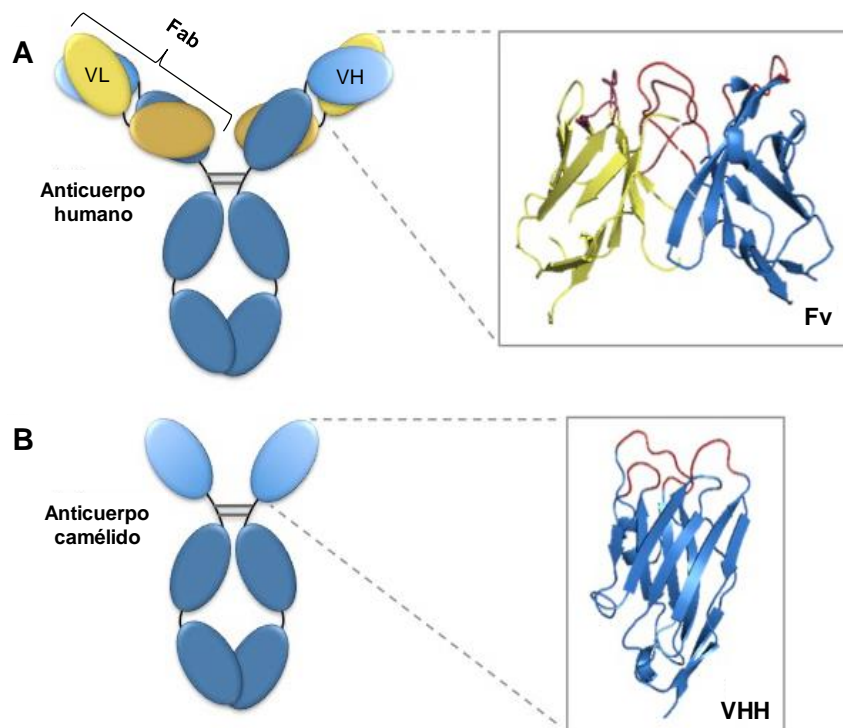


Figura 1. A) Diagrama esquemático de un anticuerpo humano tipo IgG mostrando resaltados los dominios V_H (azul) y V_L (amarillo) del fragmento variable (Fv). B) Diagrama esquemático de un anticuerpo de camélido, con el dominio variable monocatenario VHH resaltado (azul claro). En ambos casos, las CDR se indican en rojo.

El fragmento Fv, formado por las regiones V_H y V_L de la IgG, presenta un tamaño (25 kDa) que lo hace ideal para numerosas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (**Figura 1 A**). Sin embargo, las interacciones débiles que unen ambas regiones variables lo hacen inestable a temperaturas fisiológicas. Entre las diferentes estrategias

INTRODUCCIÓN

desarrolladas para mejorar su estabilidad destaca la introducción de puentes disulfuro intercatenarios, dominios variables estabilizados por puentes disulfuro (dsFv), y la unión de los dominios V_H y V_L mediante un conector peptídico flexible (*linker*) que permite su acoplamiento intramolecular para formar un sitio de unión al antígeno funcional. Estas construcciones, denominadas dominios variables en formato de cadena única (scFv) han sido expresados satisfactoriamente en bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero (**Hudson & Souriau, 2003**) y se han mostrado completamente funcionales para el reconocimiento específico y eficaz de antígeno (**Nelson et al., 2010**).

Por su parte, los anticuerpos de dominio variable monocatenario, denominados VHH, nanoanticuerpos o *nanobodies*, constituyen los dominios de reconocimiento antigénico de las inmunoglobulinas de cadena pesada única de los camélidos (HCAbs) (**Figura 1 B**) (**Hamers-Casterman et al., 1993**). Pese a su pequeño tamaño (12-15 kDa), este formato posee afinidades en el mismo rango que los anticuerpos convencionales formados por dominios duales V_H/V_L (**Muyldermans, 2013; De Meyer et al., 2014**); siendo además capaz de penetrar en tejidos densos e interactuar eficazmente con antígenos reconocidos débilmente por los anticuerpos de dominio dual V_H/V_L . Debido a su alta similitud de secuencia -superior al 80%- con las regiones constantes del fragmento V_H humano y a su baja permanencia en la sangre debido a su pequeño tamaño, estas moléculas presentan una baja inmunogenicidad (**Muyldermans et al., 2001; Cortez-Retamozo et al., 2002**) combinada con una elevada estabilidad térmica, solubilidad y resistencia a proteasas (**Arbabi Ghahroudi et al., 1997; Dumoulin et al., 2002**).

En conjunto, los anticuerpos recombinantes scFv y VHH se presentan como importantes herramientas biotecnológicas con un gran potencial para el diagnóstico y la terapia de diversas patologías tumorales, inflamatorias, neurodegenerativas e infecciosas. Por otro lado, la simplicidad de sus estructuras, permite integrarlos con facilidad en diferentes formatos modulares, como estructuras multivalentes y biespecíficas (**Cuesta et al., 2010; Shan et al., 2014; Compte et al., 2018**), proteínas de fusión junto a dominios citotóxicos o formando inmunoconjugados mediante su combinación con fármacos o radionúclidos (**Kreitman et al., 2006; Bachran et al., 2017**). Además, entre los beneficios de estos formatos también se incluyen las múltiples vías de administración que admiten, sus posibilidades de desarrollo en construcciones completamente humanizadas y su bajo coste de producción, justificado por un elevado rendimiento en sistemas de expresión heterólogos (**Li et al., 2016; Bachran et al., 2017; Fernandes et al., 2017; Ma & O'Kennedy, 2017; Bemani et al., 2018**).

Quimerización y humanización

La eliminación de la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales murinos se ha abordado principalmente mediante la construcción de quimeras (**Neuberger *et al.*, 1985**, **Reichert *et al.*, 2005**) y mediante su humanización a través de *CDR-grafting* (**Figura 2**) (**Jones *et al.*, 1986**). Ambos procedimientos han demostrado reducir eficazmente la inmunogenicidad y potencia efectora de la molécula de Ig murina, manteniendo la especificidad y afinidad del anticuerpo original; si bien, en determinadas ocasiones pueden observarse ciertas respuestas inmunes frente a las regiones murinas preservadas o un descenso en su capacidad de unión al antígeno (**Winter & Harris, 1993**; **Hudson & Souriau, 2003**).

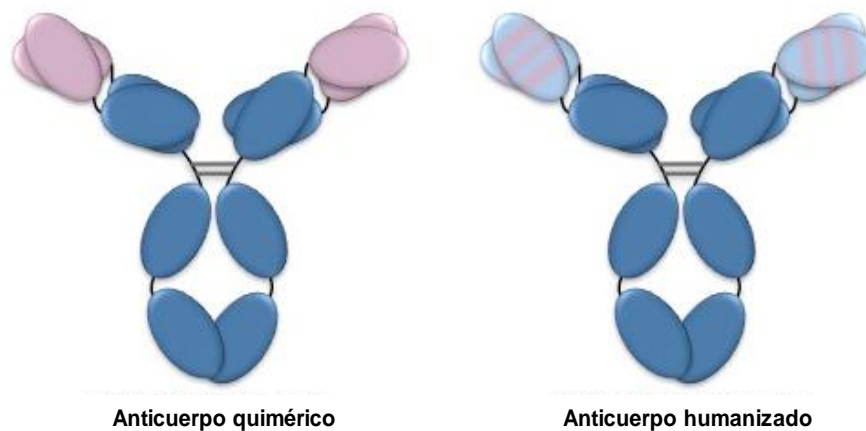


Figura 2. Diagrama esquemático de los anticuerpos quiméricos y humanizados. Los anticuerpos quiméricos están formados por las regiones variables de una Ig de origen murino (violeta) y las regiones constantes de una Ig humana (azul). Los anticuerpos humanizados contienen las CDRs de un anticuerpo monoclonal murino (violeta) sustituidas en un dominio Fv humano (azul claro).

Generación de anticuerpos monoclonales *in vitro*

Otro de los grandes hitos en el campo de la ingeniería de anticuerpos lo supuso el desarrollo y posterior implementación de la tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos o tecnología *phage display* (**Smith, 1985**; **McCaferty *et al.*, 1990**; **Kang *et al.*, 1991**; **Gao *et al.*, 2002**). Mediante su aplicación se ha logrado la generación de anticuerpos *in vitro* y su optimización funcional hasta alcanzar afinidades específicas por antígeno equiparables a las de los anticuerpos nativos generados *in vivo* (**Frenzel *et al.*, 2017**). Además de la tecnología del *phage display*, existen otras estrategias de presentación basadas en la utilización de levaduras (*yeast surface display*) (**Boder & Wittrup, 1997**), bacterias (*bacteria display*) (**Martineau *et al.*, 1998**) o células de mamífero (*mammalian cell display*) (**Zhang *et al.*, 2004**) que han sido utilizadas con diverso resultado para la generación de anticuerpos con diferentes propiedades y aplicaciones.

INTRODUCCIÓN

Modificación de sus características funcionales y físico-químicas

Los anticuerpos monoclonales nativos presentan algunas características, como su tamaño y vida media, que constituyen una limitación para su utilización *in vivo*. Estas propiedades derivan en gran parte de la presencia de la región Fc, que protege a las Igs de su degradación endosomal y condiciona su elevado tamaño molecular -superior al umbral de filtración glomerular-, dotándoles en conjunto de una elevada vida media en el torrente sanguíneo, una ineficiente extravasación y una limitada capacidad de penetración tisular (Cuesta *et al.*, 2010).

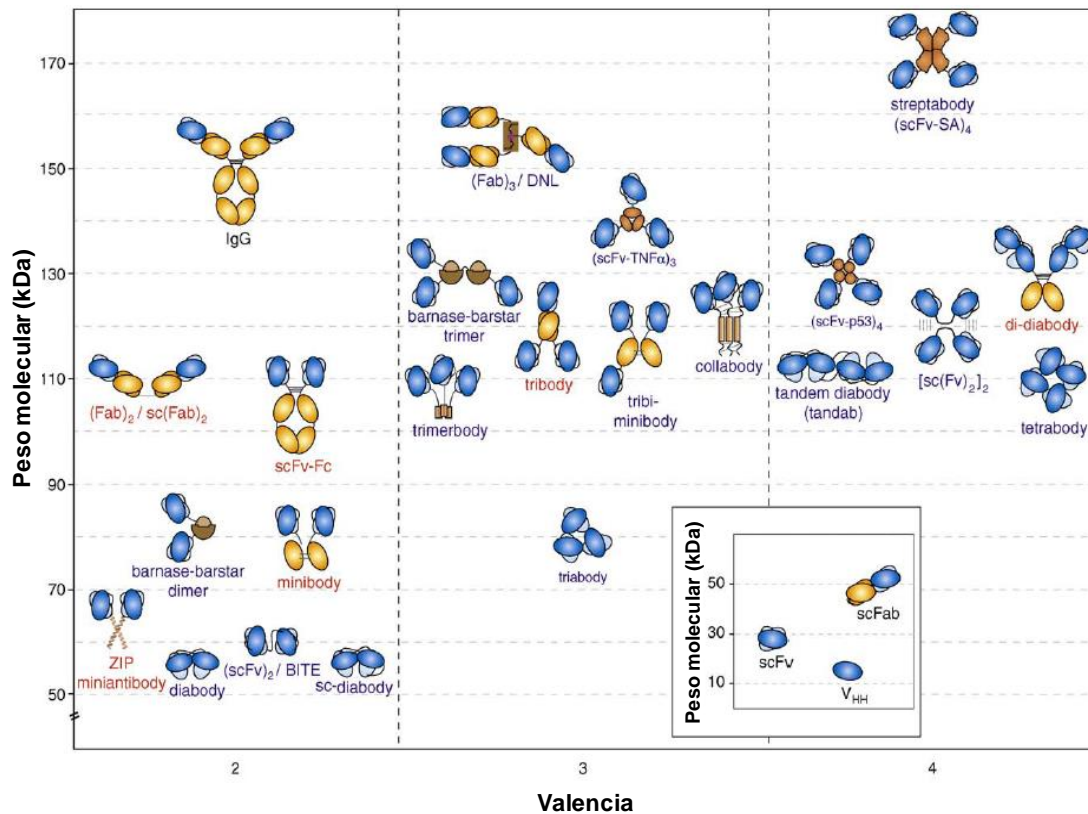


Figura 3. Los diferentes formatos de anticuerpo multiméricos clasificados en base a su peso molecular y valencia (número de posiciones de unión a antígeno). En el recuadro inferior derecho se muestran los fragmentos de anticuerpo utilizados como elementos modulares del resto de construcciones. Modificado de Cuesta *et al.*, 2010.

Con el objetivo de superar estas limitaciones de las propiedades funcionales y farmacocinéticas de los anticuerpos nativos, se han desarrollado diferentes estrategias basadas en la multimerización de los diversos fragmentos de anticuerpo recombinante (scFab, dsFv, scFv, V_{HH}). Entre ellas sobresale la utilización de dominios de oligomerización, tanto procariontas como eucariotas, que fusionados al dominio anticuerpo otorgan a este una conformación multimérica en disolución, de mayor tamaño y multivalente; dotándole en conjunto de una avidéz por antígeno y marcaje tumoral superior a los anticuerpos recombinantes parentales, junto a unas mejores propiedades farmacocinéticas (Cuesta *et al.*, 2010; Nuñez-Prado *et al.*, 2015).

Según la naturaleza de este dominio de oligomerización, los anticuerpos recombinantes multiméricos se dividen en: a) diseños ortodoxos (continuistas), que utilizan los dominios constantes de la cadena pesada de la IgG, manteniendo la fisonomía del anticuerpo nativo; y b) diseños heterodoxos (rupturistas), que utilizan proteínas de diversa índole (**Figura 3**). En el primer grupo se incluyen, entre otros los formatos *minibody*, *tribody* y *di-diabody*, formados respectivamente mediante la dimerización y trimerización anticuerpos scFv (**Shahied et al., 2004**) o *diabody* (**Lu et al., 2003**). Por su parte, algunos de los dominios de multimerización utilizados en el segundo grupo incluyen el complejo barnasa-*barstar* (**Deyev et al., 2003**), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (**Borsi et al., 2003**), el complejo estreptavidina-biotina (**Kipriyanov et al., 1996**) y el dominio de tetramerización de p53 (**M Rheinneck, 1996**). Además, recientemente también se han generado anticuerpos multiméricos utilizando dominios de oligomerización derivados de la matriz extracelular. Entre estas construcciones destacan el formato *collabody*, constituido por un esqueleto de péptidos cortos similares al colágeno V (**Fan et al., 2008**), y el formato *trimerbody*, basado en el uso del dominio de trimerización del colágeno XV o XVIII (**Blanco-Toribio et al., 2013**); capaces en ambos casos de promover la trimerización funcional de anticuerpos scFv y VHH.

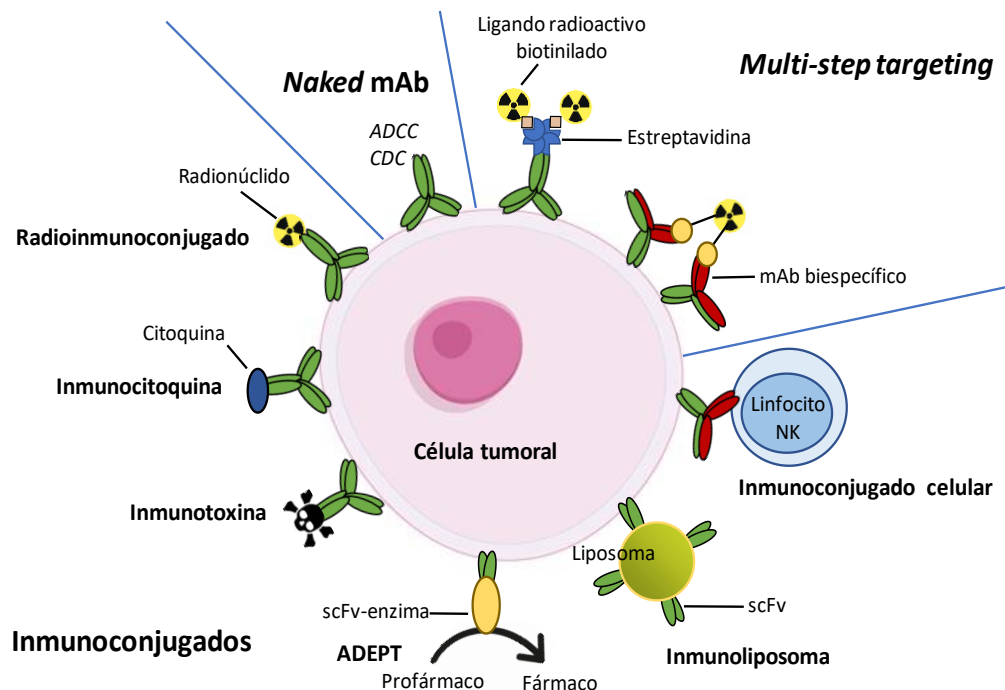


Figura 4. Aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales frente al cáncer.

En conjunto, los progresos realizados en el desarrollo de anticuerpos monoclonales con propiedades farmacocinéticas, inmunogénicas y funcionales optimizadas para su aplicación *in vivo*, han provocado que en 2018 se alcanzasen los 68 anticuerpos

INTRODUCCIÓN

terapéuticos aprobados por la FDA (**Tsumoto et al., 2018**), con cerca de 30 de ellos dedicados al tratamiento del cáncer (**Kimiz-Gebologlu et al., 2018**).

Además de sus aplicaciones directas, como anticuerpos “desnudos”, los anticuerpos monoclonales pueden ser “funcionalizados” eficazmente para su aplicación con fines diagnósticos o terapéuticos mediante la incorporación a su estructura de elementos o moléculas específicas que les otorguen una funcionalidad adicional. Entre estas herramientas biotecnológicas con aplicaciones clínicas derivadas del anticuerpo monoclonal destacan los inmunoconjugados (**Figura 4**), entre los que se incluyen las inmunotoxinas, objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

2.-Inmunotoxinas

Las inmunotoxinas son una clase de proteínas terapéuticas, relativamente novedosas, formadas por la fusión de un dominio marcador, usualmente un anticuerpo o un fragmento de este -pero también una interleuquina o un factor de crecimiento-, a un dominio tóxico, compuesto por una toxina proteica que una vez en el interior celular provoca la muerte de la célula diana. Mediante esta estructura quimérica, las inmunotoxinas integran en una sola molécula la especificidad de los anticuerpos terapéuticos frente a sus células diana con la citotoxicidad de algunas de las proteínas más tóxicas de la naturaleza (**Kreitman, 2009; Shan et al., 2013; Allewine et al., 2015**).

Entre las aplicaciones potenciales de las inmunotoxinas destaca su propuesta originaria como agentes antitumorales, aunque también se han sugerido y evaluado otras utilidades -para un resumen interesante de estas aproximaciones véase **Shapira & Benhar, 2010**-. Entre ellas se incluyen diversos usos basados en la modulación de la respuesta inmune: como la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped (**Stong et al., 1985; Vallera et al., 1996**), la eliminación de células T de los injertos (**Thompson et al., 1995; Weetal et a., 2002**) o la eliminación de células T reguladoras (**Powell et al., 2007; 2008**). Además, también se ha realizado cierto progreso en la producción de inmunotoxinas con actividad antiviral (**Berger et al., 2010; Spiess et al., 2016**) y antiparasitaria (**Li et al., 2011**); así como para la eliminación *ex vivo* de poblaciones celulares indeseadas antes de infundir preparaciones de médula ósea o de células *stem* (**Uckun et al., 1990**).

En base a su estructura y mecanismo de acción, las inmunotoxinas poseen ciertas características únicas que las hacen superiores a los quimioterapéuticos convencionales, incluyendo una alta especificidad, una extraordinaria potencia

citotóxica y ningún mecanismo de resistencia específico conocido (**Shan et al., 2013**). Además, debido a que estas moléculas suelen provocar la muerte de sus células diana mediante la inhibición de la biosíntesis proteica, presentan un mecanismo de acción tóxico tanto para células en división como para aquellas que no lo están (**Allewine et al., 2015**).

En la actualidad, 30 años después del desarrollo de las primeras inmunotoxinas, la investigación acerca de sus aplicaciones como agentes antitumorales ha progresado desde la obtención de unos resultados prometedores frente a cultivos celulares, a su evaluación *in vivo* en diversos modelos animales portando tumores; para finalmente, tras la incorporación de estudios de toxicología y farmacología, alcanzar la fase de ensayos clínicos. Aunque numerosos de estos ensayos en humanos han sido publicados describiendo resultados alentadores (**Kreitman et al., 2010; Kunwar et al., 2010; Schindler et al., 2011; Alewine et al., 2015; Li et al., 2017**), todavía persisten algunas limitaciones que dificultan la aplicación terapéutica efectiva de las inmunotoxinas; entre ellos: una limitada capacidad de penetración y marcaje tumoral, algunos problemas de inmunogenicidad y cierta toxicidad inespecífica (**Hassan et al., 2007; Schindler et al., 2011; Alewine et al., 2015**).

Pese a esto, los importantes avances realizados en el diseño, posibilidades de administración sistémica y capacidad antitumoral *in vivo* de las nuevas variantes de inmunotoxina están contribuyendo a superar las limitaciones históricas de este tipo de moléculas, conduciendo a un renovado interés en su estudio, desarrollo y aplicación terapéutica. Además, en la actualidad, múltiples construcciones están siendo evaluadas en ensayos clínicos de Fase II y III (**Li et al., 2017**), habiendo sido aprobada recientemente por la FDA la primera inmunotoxina basada en un anticuerpo (*moxetumomab pasudotox*), compuesta por un scFv anti-CD22 fusionado a una forma truncada de la exotoxina A de *Pseudomonas*, e indicada para el tratamiento de la leucemia de células pilosas (**Kreitman et al., 2018**).

2.1.-Evolución

Las primeras inmunotoxinas se desarrollaron en la década de los 80s, tras la publicación de tres artículos seminales para la fundación de su campo de investigación. Por una parte, se confirmó la potencia de la toxina diftérica frente a las células humanas (**Yamaizumi et al., 1978**), reflejada en la famosa frase “una molécula de toxina diftérica puede matar una célula”. En segundo lugar, se introdujo el concepto de la utilización de anticuerpos para dirigir la actividad citotóxica de una toxina (**Thorpe et al., 1978**),

INTRODUCCIÓN

describiendo específicamente el uso de anticuerpos “anti-linfocito” para matar células tumorales linfoblastoides. Por último, el surgimiento del anticuerpo monoclonal (**Kohler & Milstein, 1975**) permitió el desarrollo de agentes formados por toxinas conjugadas químicamente con anticuerpos de una única especificidad (**Blythman et al., 1981**).

Las inmunotoxinas de primera generación, enfocadas principalmente a la terapia del cáncer, se produjeron mediante la conjugación de un anticuerpo monoclonal nativo con una toxina a través de un enlace disulfuro (**Figura 5 A**) (**Vitteta et al., 1983, 1985; Pastan et al., 1986**). Pese a la especificidad conferida por el anticuerpo, estas primeras construcciones solían inducir efectos severos al ser administradas a humanos, debido a que incluían las formas naturales de toxinas capaces de unirse inespecíficamente a las células no tumorales (**Antignani & Fitzgerald, 2013**). Entre estas toxinas destacaron la exotoxina A de *Pseudomonas* (**Kondo et al., 1988; Kreitman et al., 1990; 1993**), la toxina diftérica (**Ross et al., 1980; Foss et al., 1998**) y la ricina (**Wawrzynczak et al., 1990; Ghetie et al., 1993**).

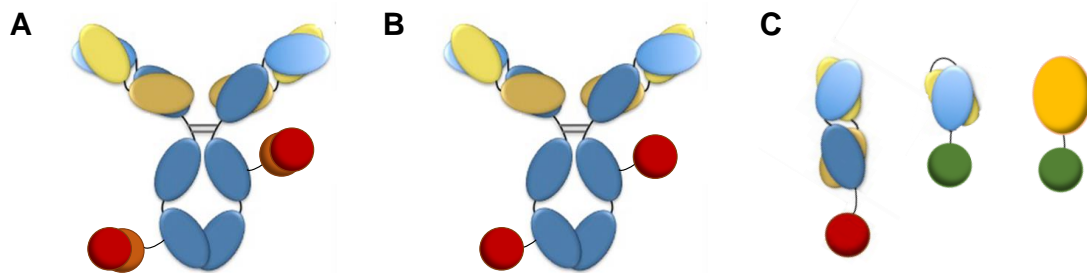


Figura 5. Diagramas mostrando la evolución de los diseños de inmunotoxina. A) Las inmunotoxinas de primera generación están formadas por una molécula de IgG nativa combinada con la forma natural de una toxina (esfera roja/marrón). B) Los diseños de segunda generación incorporan toxinas únicamente formadas por sus dominios catalíticos (esfera roja), habiéndose eliminado los dominios de unión celular. C) Las inmunotoxinas recombinantes o de tercera generación presentan una amplia variedad de estructuras que incluyen la utilización de diferentes dominios marcadores, entre ellos -diversos fragmentos de anticuerpo (izquierda: Fab, centro: scFv) u otras moléculas dadoras de especificidad (derecha: IL-2), como es el caso de *denileukin dittox*, Ontak (**Foss et al., 1998; Olsen et al., 2001**). Además, estas construcciones incorporan frecuentemente variantes no inmunogénicas de sus toxinas (círculo verde).

La segunda generación de inmunotoxinas se caracterizó por la utilización de formas truncadas de estas toxinas, compuestas en exclusiva por sus dominios catalíticos y carentes de los dominios de reconocimiento implicados en la unión de la toxina a la superficie celular (**Figura 5 B**) (**Thrush et al., 1996; Kreitman 2006; Li et al., 2005; Pastan et al., 2007**). Aunque esta aproximación redujo de manera importante la toxicidad inespecífica de las nuevas construcciones, persistieron otros problemas asociados con: a) una pobre estabilidad debido a la conjugación química entre las mitades anticuerpo y toxina; b) una composición heterogénea y una reducción en la afinidad de unión a antígeno causadas por la conjugación aleatoria; c) una pobre

penetración en las masas tumorales debido a su gran tamaño molecular (>190 kDa); d) una elevada inmunogenicidad; y e) una limitada capacidad de producción (**Vitteta et al., 1983; Multani et al., 1998**).

Por último, el tercer salto evolutivo en la generación de estas moléculas estuvo marcado por la aplicación de las técnicas de clonaje molecular y ADN recombinante a la producción de proteínas de fusión compuestas por un fragmento de anticuerpo unido al dominio catalítico de una toxina (**Figura 5 C**) (**Laske et al., 1997; Shan et al., 2013**). En términos funcionales, esta tercera generación de inmunotoxinas persigue la optimización de las propiedades de marcaje tumoral y distribución *in vivo*, la reducción de sus potenciales efectos secundarios -incluida la inmunogenicidad- y la mejora de su producción mediante el diseño de construcciones con dimensiones y estructuras aptas para su producción heteróloga. En la práctica, estas aproximaciones se han concretado principalmente en torno a la implementación de los formatos de anticuerpo recombinante utilizados como dominio marcador (**Figura 3**), pero también en el desarrollo de variantes de toxina no inmunogénicas (**Shan et al., 2013; Alewine et al., 2015; Li et al., 2017**).

De este modo, las inmunotoxinas recombinantes suelen presentar un menor tamaño molecular -respecto a las construcciones formadas por la molécula de IgG nativa- que las dota de una mayor capacidad de penetración en tumores sólidos -un aspecto de gran relevancia en el tratamiento de estas patologías- y mejores propiedades farmacocinéticas. Además, la optimización y simplificación de sus formatos permite su producción a gran escala y con bajo coste en diversos sistemas de expresión heterólogos (*E. coli*, *P. pastoris* o células de mamífero, entre otros), eliminando otro potencial impedimento para su uso clínico (**Liu et al., 2005; Wan et al., 2006; Shan et al., 2013**).

Por estos motivos, en la actualidad las inmunotoxinas recombinantes presentan unas propiedades superiores a aquellas de primera y segunda generación, convirtiendo a esta familia de moléculas en uno de los campos de investigación en terapia antitumoral con mayor potencial y expectativas generadas (**Shan et al., 2013**).

2.2.-Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las inmunotoxinas se puede describir como un proceso en tres etapas (**Figura 6**). Primero, la inmunotoxina se une específicamente a su antígeno diana en la superficie celular a través de su dominio marcador. Después, el complejo

INTRODUCCIÓN

antígeno-inmunotoxina es internado a los compartimentos endocíticos, desde donde, a través diferentes de vías de tráfico intracelular, sufre un procesamiento que produce la escisión de la toxina del dominio marcador. Finalmente, tras su translocación al citosol, la toxina ejerce su actividad enzimática provocando la estimulación de la ruta apoptótica y la muerte celular (**Sakamoto et al., 2006, Kreitman, 2006; Pastan et al., 2007, Alewine et al., 2015**).

Este mecanismo general puede estar sujeto a variaciones según el anticuerpo utilizado como dominio marcador, el antígeno diana y la toxina que componga su dominio tóxico. Así, aunque, el mecanismo de internación y el procesamiento del complejo antígeno-inmunotoxina y la eficacia de este proceso dependen mayoritariamente del antígeno celular marcado, estos procesos pueden verse inducidos o perturbados por la unión del anticuerpo concreto utilizado (**Kuo et al., 2009, Fitzgerald et al, 2011; Liao-Chan et al., 2015; Sokolova et al, 2017**). Por su parte, la liberación del componente tóxico y su localización subcelular dependen específicamente de las propiedades de cada toxina (**Figura 5**) (**Alewine et al., 2015; Tomé-Amat et al., 2015; Ruiz-de-la-Herrán et al., 2019**).

Por tanto, debido a los múltiples procesos implicados en su mecanismo de acción, son muchos los factores que influyen sobre la efectividad citotóxica final de las inmunotoxinas. En primer lugar, la eficacia de su aplicación sistémica *in vivo* depende de las propiedades de biodistribución, marcaje y penetración tumoral, pero también de la estabilidad en el entorno fisiológico, la inmunogenicidad y la especificidad selectiva de las construcciones (**Kreitman, 2000; Weber et al., 2003, Alewine et al, 2015; Sokolova et al, 2017**). Además, una vez que la inmunotoxina ha llegado al tumor, su efectividad citotóxica dependerá de la afinidad y estabilidad de su unión al antígeno diana, de la internación del complejo antígeno-inmunotoxina, del procesamiento intracelular que sufra la toxina y de su potencia tóxica una vez en el interior celular (**Wargalla & Reisfeld; 1989, Byers et al, 1991; Fitzgerald et al, 2011**).

A continuación se desglosan los diferentes factores que influyen a nivel celular en la actividad citotóxica de las inmunotoxinas, indicándose el modo en que afectan a su eficacia citotóxica y algunas de las variaciones desarrolladas para incrementarla.

Unión

La capacidad de unión de una inmunotoxina a su antígeno celular constituye un factor fundamental en el desempeño de su actividad citotóxica, puesto que, en último término, va a establecer la cantidad de carga tóxica que alcanza a las células diana. Por este motivo, al igual que sucede con los anticuerpos terapéuticos y los conjugados fármaco-

anticuerpo; una alta afinidad y una baja constante de disociación son propiedades capitales de aquellos anticuerpos recombinantes, u otras moléculas, que se quieran utilizar como dominio marcador de las inmunotoxinas (**Schmidt *et al.*, 2008; Cuesta *et al.*, 2010**).

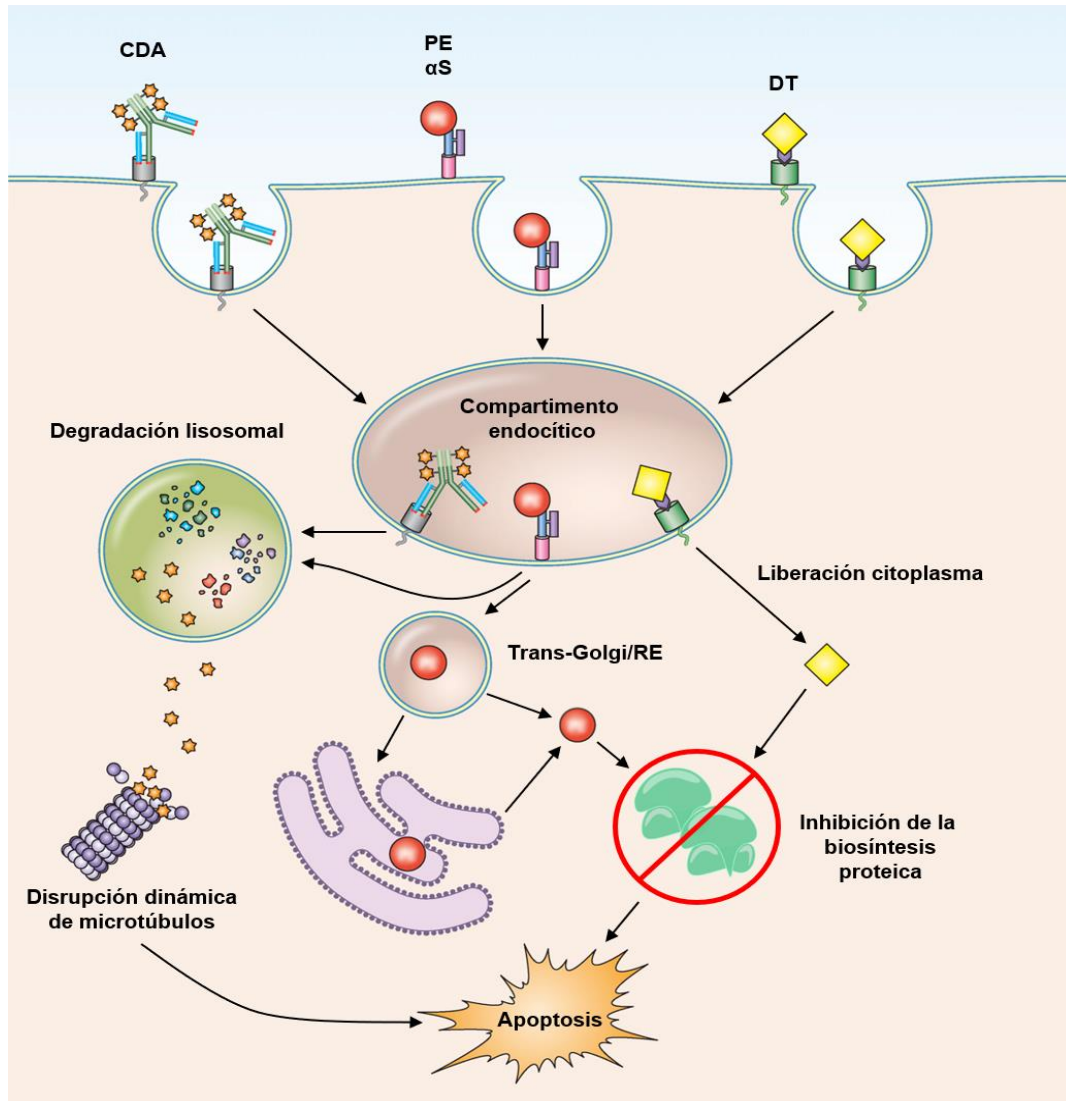


Figura 6. Mecanismo de acción de las inmunotoxinas y los conjugados droga-anticuerpo (CDA). La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) y α -sarcina (α S) son liberadas del dominio marcador en los endosomas, pudiendo translocarse al citoplasma o ser transportadas a través del aparato de Golgi al retículo endoplásmico (RE) (centro). La toxina diftérica (DT) se transloca al citoplasma mediante la formación de poros en la membrana de los endosomas (derecha). Una vez en el citoplasma las tres toxinas provocan la inhibición de la biosíntesis proteica y la promoción de la apoptosis celular. Figura modificada de **Alewine *et al.*, 2015**.

Internación

Debido a que la mayoría de las toxinas incluidas en las inmunotoxinas actúan mediante la inhibición de la acción ribosomal, la internación del complejo antígeno-inmunotoxina es un requisito indispensable para su actividad citotóxica (**Fitzgerald *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2014**). Por tanto, una elevada eficacia de internación de estos complejos permite el acceso específico de una mayor carga tóxica al interior de las células cancerosas,

INTRODUCCIÓN

previniendo simultáneamente su liberación de la superficie celular y su exposición sistémica (**Liao-Chan et al., 2015**).

Tráfico intracelular

Tras su internación, el complejo antígeno-inmunotoxina transita a través de los endosomas tempranos, donde la acidificación de estas vesículas puede producir la liberación de la toxina y su translocación al citosol, como en el caso de la toxina diftérica y del ántrax (**Mastrobattista et al., 2002; Fuchs et al., 2013**), o seguir la denominada vía retrograda, como la exotoxina A de *Pseudomonas*, las ribotoxinas y las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP), que implica su transporte a través del aparato de Golgi al retículo endoplásmico (RE), recorrido durante el cual estas toxinas sufren su liberación al citosol (**Lord et al., 2003, De Lorenzo et al., 2007**). Estos y otros datos confirman que el tráfico intracelular a través de orgánulos específicos es un factor importante modulando la toxicidad de las inmunotoxinas (**Tortorella et al., 2012; Alewine et al., 2015; Ruiz-de-la-Herrán et al., 2019**).

Péptido de unión

En la estructura de las inmunotoxinas recombinantes, los dominios marcador y tóxico están unidos por un *linker* peptídico que debe mantener su integridad molecular y funcional en el entorno extracelular pero ser susceptible de degradación intracelular. En la medida en que su ruptura posibilitará la translocación de la toxina al citosol, la longitud y composición de este péptido desempeña un papel fundamental en la eficacia de las inmunotoxinas. Además, este *linker* debe permitir el correcto plegamiento y funcionalidad de ambos dominios (**Dosio et al., 2011**). Entre los *linkers* que cumplen estos criterios, uno de los más utilizados consiste en una repetición de glicocola y serina ((Gly₄-Ser)₃), habiendo demostrado que permanece estable en las condiciones fisiológicas de los ensayos *in vivo*, pero que es susceptible de hidrólisis en el medio ácido de los compartimentos endosomales (**Kreitman et al., 2001**).

Además, como un paso más allá en la optimización de este elemento, también se han diseñado *linkers* que, mediante la inclusión de sitios de reconocimiento para proteasas localizadas en las rutas de procesamiento intracelular, facilitan la liberación de la carga tóxica del dominio marcador. Un ejemplo destacado es el sitio de proteólisis de furina, una proteasa de mamíferos presente en las vías del trans-Golgi-RE (**Vey et al., 1994**), mediante cuya utilización se han obtenido inmunotoxinas con una eficacia citotóxica superior a la de sus construcciones parentales (**Cao et al., 2009; Weldon et al., 2011; Jones et al., 2016, Ruiz-de-la-Herrán et al., 2019**).

Dominio tóxico

Las principales toxinas utilizadas como componentes de las inmunotoxinas suelen provocar la muerte celular mediante la inactivación del ribosoma, provocando la inhibición de la biosíntesis proteica (**Allewine et al., 2015**). Entre ellas se incluyen toxinas bacterianas, como la toxina diftérica y la exotoxina A de *Pseudomonas*, que modifican e inactivan el factor de elongación 2 eucariota (eEF2), un componente crítico de la maquinaria de síntesis proteica (**Collier, 1967; Weldon & Pastan, 2011**); y las ribotoxinas fúngicas, como la α -sarcina, y las proteínas inactivadoras del ribosoma vegetales (RIP), como la ricina y la saporina (**Stirpe et al., 1980; Walsh et al., 2013; Olombrada et al., 2017 a**), que inhiben la función ribosomal mediante su acción enzimática sobre el Lazo Sarcina Ricina (SRL), localizado en la molécula mayor del rRNA.

Debido a sus mecanismos de acción y al rol fundamental del ribosoma en la biología celular, los procesos de resistencia celular descritos para estas toxinas son de escasa relevancia. Entre ellos se pueden dar una liberación ineficiente de la toxina al citosol (**Du et al., 2008; Liu et al., 2013**), un fallo en su mecanismo de acción (**Wei et al., 2012**) y una reducida promoción de la apoptosis (**Matoo et al., 2013**).

2.3.-Optimización de los diseños: estabilidad, tamaño y humanización

Además de los factores implicados en la eficacia de las inmunotoxinas a nivel celular, la aplicación sistémica de las inmunotoxinas sigue presentando dos grandes desafíos: lograr una correcta distribución que alcance a todas las célula diana, un aspecto especialmente relevante en el tratamiento de patologías tumorales sólidas (**Zhang et al., 2010, Li et al., 2017**), y eliminar la inmunogenicidad intrínseca de las construcciones, para permitir su correcta administración en humanos (**Posey et al., 2002; Hassan et al., 2007**).

Por tanto, en la actualidad, las estrategias de optimización de las inmunotoxinas antitumorales giran en torno a tres ejes principales: a) la búsqueda de una mayor estabilidad *in vivo*, b) la mejora de la relación entre tamaño molecular, marcaje/penetración tumoral y biodistribución, y c) el desarrollo de variantes totalmente humanizadas (**Allewine et al., 2015**).

INTRODUCCIÓN

Penetración tumoral, biodistribución y propiedades farmacocinéticas

Los avances realizados en la reducción del tamaño de las construcciones recombinantes, se han centrado principalmente en el dominio marcador, al ser el elemento que permite una mayor plasticidad. Con este propósito, en sustitución de la molécula de IgG nativa, se han utilizado diferentes formatos de anticuerpos recombinantes, incluyendo tanto anticuerpos recombinantes conservando alguna de las regiones constantes de las cadenas pesadas (scFv-Fc, *minibodies*) -dotados de una mayor estabilidad *in vivo*- o con únicamente las regiones variables incorporadas en diversos formatos (scFab, scFv, dsFv, VHH) (Adams *et al.*, 2001; Adams & Weiner, 2005; Röthlisberguer *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017; Bachran *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2017; Sokolova *et al.*, 2017).

Aun así, estos formatos de inmunotoxina presentan ciertas limitaciones para su aplicación *in vivo*, debidas en su mayoría a su tamaño por debajo del umbral de filtración glomerular, su monovalencia y su limitada capacidad de marcaje tumoral. Por este motivo, el desarrollo de una nueva generación de inmunotoxinas incorporando en su estructura anticuerpos multiméricos (**Figura 3**), dotadas de una mejor biodistribución, propiedades farmacocinéticas y capacidad de marcaje tumoral, se presenta como una estrategia prometedora para la implementación de los futuros diseños de inmunotoxina (Cuesta *et al.*, 2010; Ríos *et al.*, 2019).

Inmunogenicidad y humanización

Otro de los problemas más frecuentes durante la utilización *in vivo* de las inmunotoxinas se refiere a la inmunización del “paciente” frente a ellas. Este proceso, ocurrido tras su administración en repetida, puede neutralizar por completo sus potenciales efectos terapéuticos. Por ello, especialmente en la última década, la optimización de las inmunotoxinas también se ha centrado en la obtención de variantes recombinantes completamente humanizadas o menos inmunogénicas (Onda *et al.*, 2008; Mathew *et al.*, 2009, Jones *et al.*, 2016). Respecto a los anticuerpos formando el dominio marcador, la desinmunización se logra mediante dos estrategias principales: manteniendo únicamente los CDR e incorporándolos a un *scaffold* humano (*CDR grafting*) (Scott *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2005), o bien modificando las regiones de la secuencia inmunogénicas hasta no observar reactividad alguna o conseguir, al menos, una disminución significativa de la misma (Knappik *et al.*, 2000; Onda *et al.*, 2008; Chames *et al.*, 2009). Por su parte, la eliminación de la inmunogenicidad debida al dominio toxico -normalmente la de mayor importancia- se ha abordado puntualmente mediante la utilización de ribonucleasas humanas (De Lorenzo *et al.*, 2007, 2008; Krauss *et al.*, 2008) o, de forma más extendida, a través de la identificación y

eliminación de los epítomos inmunogénicos presentes en las toxinas microbianas, sin que en este proceso se vea afectada su actividad enzimática. Ejemplos de esta aproximación incluyen el desarrollo de una variante mucho menos inmunogénica de la exotoxina A de *Pseudomonas* (Onda *et al.*, 2006; 2008), y el desarrollo de versiones completamente humanizadas de la toxina diftérica (Schmohl *et al.*, 2015) y la α -sarcina (Jones *et al.*, 2016).

3.-Ribotoxinas

Las ribotoxinas son una familia de RNAsas extracelulares secretadas por hongos que se caracterizan por una actividad ribonucleolítica altamente específica sobre la subunidad mayor de la molécula de RNA ribosomal, como consecuencia de la cual se produce la inactivación ribosómica, la inhibición de la biosíntesis proteica y la muerte celular por apoptosis (Gasset *et al.*, 1994; Kao *et al.*, 2001; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001; Lacadena *et al.*, 2007; Olombrada *et al.*, 2017 a).

Su descubrimiento se realizó en 1963, cuando durante un programa de búsqueda de agentes antitumorales y antibióticos organizado por el Departamento de Salud de Michigan, se encontró una cepa del hongo *Aspergillus giganteus* que producía una “sustancia” inhibitoria del crecimiento de los tumores sarcoma 180 y carcinoma 755 inducidos en ratón. Esta “sustancia” fue descrita como una proteína a la que se denominó α -sarcina (Olson & Goerner, 1965). Posteriormente, se han descubierto otras proteínas con actividades similares producidas por diferentes especies del género *Aspergillus*, como restrictocina y mitogilina (*A. restrictus*) (Brandhorst & Kenealy, 1992; Kao *et al.*, 2001; García-Ortega *et al.*, 2005), Asp f 1 (*A. fumigatus*) (Arruda *et al.*, 1990, 1992; Wool, 1997), gigantina (*A. giganteus*) (Wirth *et al.*, 1997) y clavina (*A. clavatus*) (Varga & Samson, 2008), o por otros géneros fúngicos, como hirsutelina A (HtA) (*H. thompsonii*) (Herrero-Galan *et al.*, 2008) y anisoplina (*Metharizium anisopliae*) (Lin *et al.*, 1995; Martínez-Ruiz *et al.*, 1999 b; Olombrada *et al.*, 2017 b).

En términos clasificatorios, las ribotoxinas pertenecen a la superfamilia de la barnasa (por ser su miembro más destacado), donde también se incluye la familia de las ribonucleasas (RNAsas) no tóxicas, cuyo máximo exponente es la RNasa T1 (*Aspergillus oryza*,) (Yoshida, 2001; Wool, 1997). En conjunto los integrantes de esta superfamilia son moléculas de pequeño tamaño, formadas por una única cadena polipeptídica con un patrón de plegamiento homólogo, constituido por una lámina β antiparalela de cuatro hebras, y un centro activo compuesto mayoritariamente por la

INTRODUCCIÓN

triada Glu-Arg-His. Además, presentan un rasgo fundamental para su aplicación en el diseño de inmunotoxinas, la actividad catalítica de estas moléculas no se ve afectada por la presencia del inhibidor intracelular de RNAsas propio de las células de mamífero (Kim *et al.*, 1995; Hofstenge, 1997).

El conocimiento adquirido por nuestro grupo, tras casi 30 años de investigación, acerca de las RNAsas extracelulares fúngicas ha conducido al desarrollo de la metodología necesaria para la producción y caracterización de estas proteínas, así como a la obtención de un detallado conocimiento de sus mecanismos moleculares de acción. Este hecho, añadido a que algunas de las inmunotoxinas descritas en la literatura contenían como dominio tóxico una RNasa o una ribotoxina, impulsó el desarrollo de una línea de investigación específica centrada en la aplicación sistemática de esta familia de proteínas a la construcción de inmunotoxinas antitumorales; cuyos primeros avances están recogidos en las Tesis Doctorales de los Dres. Nelson Carreras Sangrà y Jaime Tomé Amat (Carreras-Sangrà, 2008; Tomé-Amat, 2012).

A continuación se detallan las características estructurales y funcionales de las ribotoxinas, y en concreto de la α -sarcina, su miembro más destacado y mejor estudiado, que es la toxina utilizada como componente tóxico de todas las inmunotoxinas presentadas en esta Tesis Doctoral.

3.1.-Características estructurales

Las ribotoxinas son proteínas básicas, constituidas por aproximadamente 150 aminoácidos, que comparten un elevado grado de identidad y similitud de secuencia, así como dos puentes disulfuro conservados en toda la familia (Rodríguez *et al.*, 1982, Sacco *et al.*, 1983; Lopez-Otín *et al.*, 1984; Arruda *et al.*, 1990; Wirth *et al.*, 1997; Martínez-Ruiz *et al.*, 1999 b; Lacadena *et al.*, 2007; Carreras-Sangrà *et al.*, 2008). Las principales diferencias entre sus secuencias de aminoácidos se encuentran en los bucles de estructura no repetitiva y en la horquilla β del extremo amino terminal, regiones que a su vez difieren ampliamente de aquellos de las RNAsas microbianas no tóxicas (Figura 7) (Lacadena *et al.*, 2007; Herrero-Galán *et al.*, 2009).

La estructura tridimensional de la α -sarcina (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000 y 2002; García-Mayoral *et al.*, 2005 a y b) presenta un plegamiento mayoritario compuesto por estructura $\alpha+\beta$, con una lámina central antiparalela constituida por cinco hebras y una hélice de algo más de dos vueltas (Figura 7) (Campos-Olivas *et al.*, 1996 a y b; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Esta lámina, fuertemente alabeada, forma una cara convexa

que interacciona con la hélice α ; de modo que los residuos constituyentes del centro activo, Tyr 48, His 50, Glu 96, Arg 121, His 137 y Leu 145, quedan localizados en la cara cóncava, dirigiéndose sus cadenas laterales hacia el exterior de la cavidad.

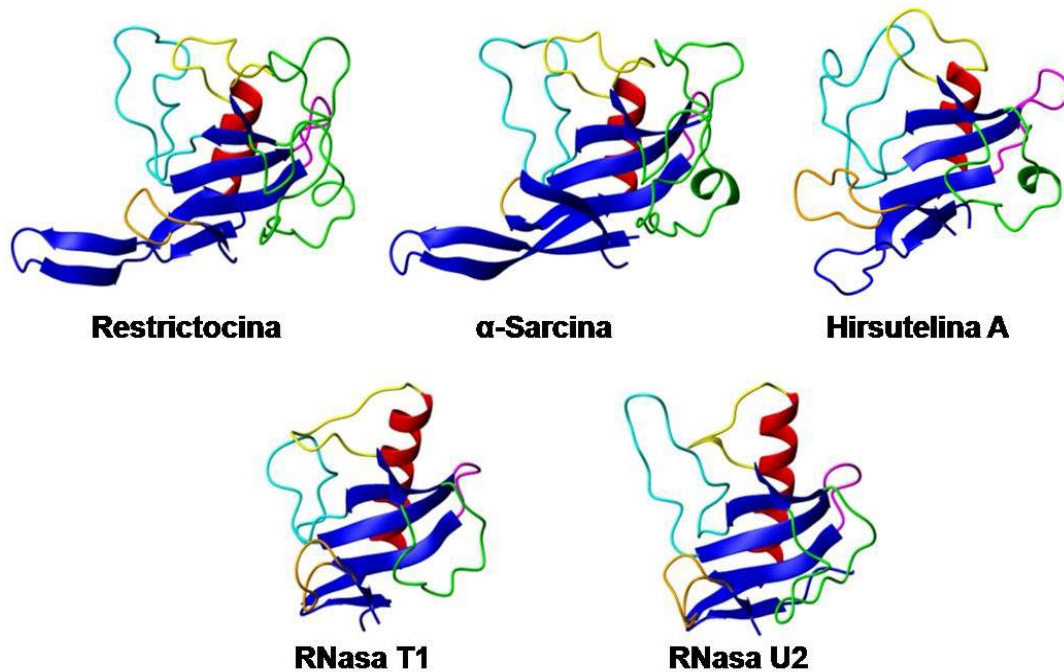


Figura 7. Estructuras tridimensionales de las ribotoxinas restrictocina, α -sarcina, hirsuteline A, y de las RNasas no tóxicas T1 y U2. Las estructuras se han ajustado con las coordenadas atómicas de los residuos del centro activo y con los puentes disulfuro comunes a las tres proteínas. Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

Otro elemento fundamental en su estructura y función es la horquilla β del extremo amino terminal, formada en α -sarcina por los residuos 1-26. Concretamente, su parte más extrema está implicada en las interacciones específicas con algunas proteínas del tallo ribosomal que suceden durante la aproximación de las ribotoxinas a la región del SRL (García-Ortega *et al.*, 2002; García-Mayoral *et al.*, 2005 b).

Respecto a sus bucles periféricos, en las ribotoxinas, el bucle 2 es esencial para el adecuado desempeño de su funcionalidad, siendo uno de los que muestra más diferencias con las RNasas no tóxicas. Tiene un contenido elevado en Lys y Gly, se encuentra muy expuesto al disolvente y, a pesar de poseer una conformación bien definida, presenta una relativa movilidad. Dentro de este, los residuos 52-54 están conservados en todas las RNasas fúngicas extracelulares, fijándose al armazón estructural a través de la Asn 54 (Mancheño *et al.*, 1995; Siemer *et al.*, 2003). Por otro lado, mediante los residuos 51 y 55, este bucle interacciona específicamente con el elemento más significativo del SRL, el nucleótido de guanina prominente situado en las proximidades del enlace que es hidrolizado (Figura 8) (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

INTRODUCCIÓN

En cuanto a su centro activo, únicamente tres residuos 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). Los tres presentan unos valores de pKa inusuales y formas tautoméricas de la His poco frecuentes, pero comunes a todas las RNAsas microbianas. Además, la His137 establece un enlace de hidrógeno con el bucle 5 esencial para la conformación estructural y la actividad catalítica de la molécula.

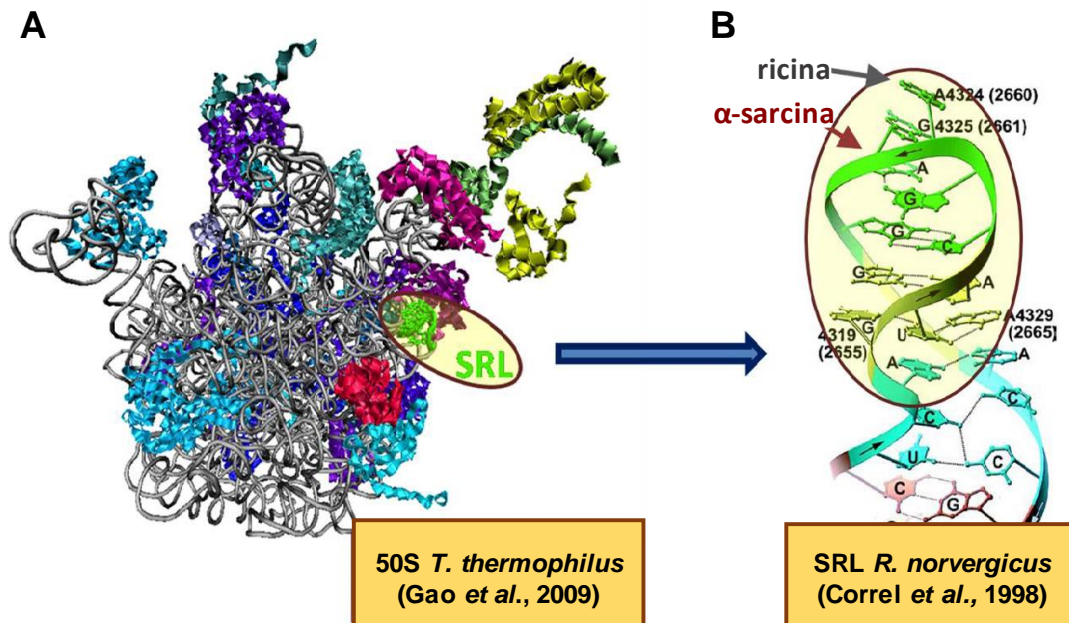


Figura 8. Diagrama mostrando la localización y estructura del SRL. A) Posición del SRL dentro de la subunidad mayor del ribosoma de *T. Thermophilus*. B) Estructura del SRL destacándose la guanina prominente (G 4319) y el tetrabuclé GAGA, donde se señala el enlace que es hidrolizado por las ribotoxinas (G 4325/A 4326) y la adenosina (A 4324) eliminada por la ricina.

3.2.-Características de su actividad ribonucleolítica

El descubrimiento de que la muerte celular provocada por las ribotoxinas es consecuencia directa de su capacidad para inhibir la biosíntesis de proteínas, recuperó el interés por esta familia de RNAsas fúngicas, que había quedado apartada para su aplicación *in vivo* debido a presentar cierta citotoxicidad inespecífica (Roga *et al.*, 1971).

Esta inhibición de la biosíntesis de proteínas se debe a su actividad ribonucleolítica específica hidrolizando un único enlace del RNA ribosomal de mayor tamaño (Schindler & Davies, 1977; Endo & Wool, 1982, Endo *et al.*, 1983). Este enlace se encuentra localizado en una secuencia universalmente conservada, que desempeña un papel crucial para la función ribosomal durante su interacción con los factores de elongación EF-tu/EF-1 y EF-G/EF-2 (García-Ortega *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2012). Este sitio

funcional es conocido como el Lazo Sarcina Ricina (SRL); ya que, además de las ribotoxinas, sobre él también actúa la ricina, el miembro más representativo de la familia de las RIPs (**Figura 8**) (**Nielsen & Boston, 2001**; **Peumans *et al.*, 2001**).

Debido a la especificidad esta actividad enzimática, la acción de las ribotoxinas frente al ribosoma puede detectarse y cuantificarse como consecuencia de la liberación de un fragmento característico de unos 490 pares de bases (en ribosomas eucariotas) denominado fragmento α (**Kao *et al.*, 2001**; **Martínez-Ruiz *et al.*, 2001**).

Respecto a su mecanismo catalítico, las ribotoxinas son RNAsas ciclantes que presentan un mecanismo tipo ácido-base general a través de un intermedio cíclico (**Lacadena *et al.*, 1998**). En el caso de la α -sarcina, durante la primera parte de la reacción, el Glu 96 actúa como base general y la His 137 como ácido general, intercambiando dichas funciones en la posterior hidrólisis del intermediario cíclico (**Lacadena *et al.*, 1998, 1999**). Por su parte, la His 50 desempeña un papel importante en la estabilización del intermediario de la reacción (**Lacadena *et al.*, 1999**). El resto de residuos del centro activo con implicación en la actividad ribonucleolítica de la α -sarcina incluyen a la Arg 121, que participa en la orientación correcta del sustrato, desempeñando además un papel esencial en la interacción con membranas lipídicas (**Masip *et al.*, 2001**); la Leu 145, imprescindible para mantener el pKa anormalmente bajo de la His 137 (**Masip *et al.*, 2003**); y la Tyr 48, que desempeña un rol necesario pero indeterminado, ya que su sustitución por Phe produce la completa inhibición de la actividad catalítica frente al ribosoma y otros sustratos poliméricos (**Álvarez-García *et al.*, 2006**).

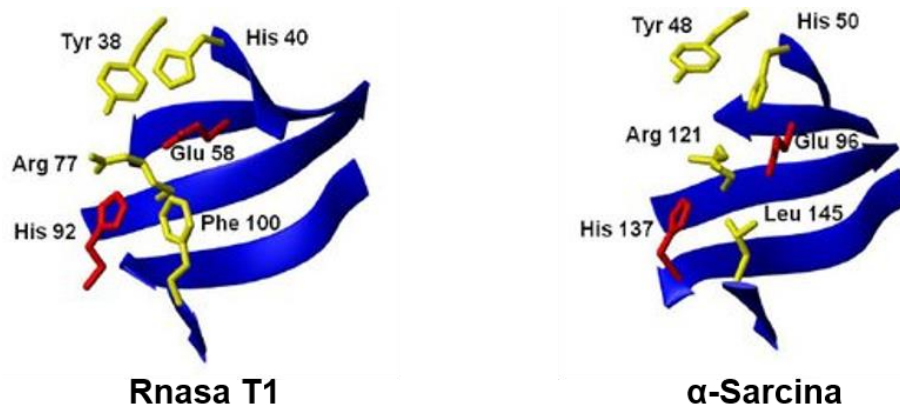


Figura 9. Estructuras tridimensionales de RNasa T1 y α -sarcina. Los diagramas se generaron con el programa MOLMOL (**Koradi *et al.*, 1996**). En la parte inferior se muestra en detalle la disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos implicados en la catálisis ácido-base general. Adaptado de **Herrero-Galán *et al.*, 2013**.

El reconocimiento del SRL por la ribotoxina, tal y como se ha comentado anteriormente, depende principalmente de las interacciones entre la proteína y el tetrabuque GAGA y la guanina prominente del SRL (**Glück & Wool, 1996**; **Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000**). Sin

INTRODUCCIÓN

embargo, por sí solas estas interacciones no explican la exquisita especificidad de las ribotoxinas sobre su substrato, debido a que esta también parece sustentarse en las interacciones entre sus bucles y ciertas proteínas del complejo ribosomal; concretamente entre la horquilla β amino terminal y el bucle 2, y las proteínas ribosomales L14 y L6, respectivamente (**García-Mayoral et al., 2004 y 2005b**).

Así, la ausencia de estos elementos en las RNAsas no tóxicas (**Figura 7**) explica las diferencias en su funcionalidad respecto a las ribotoxinas, pese a que la estructura tridimensional del centro activo y la posición de sus residuos fundamentales no difieren sustancialmente entre ambas familias de RNAsas (**Figura 9**). Por tanto, en las ribotoxinas el mecanismo ribonucleolítico es dirigido específicamente mediante su capacidad para reconocer e interactuar de manera específica con el SRL y su entorno proteico (**Lacadena et al., 2007**).

3.3.-Interacción con membranas y citotoxicidad

Además de su actividad inhibidora de la función ribosomal, las ribotoxinas son capaces de atravesar membranas lipídicas mediante su interacción directa con estas, sin que se haya descrito hasta la fecha ningún receptor proteico para ellas (**Gasset et al., 1994; Kao et al., 2001**). Así, su actividad citotóxica frente a células transformadas o infectadas por virus (**Olson et al., 1965; Fernández-Puentes & Carrasco, 1980; Olmo et al., 2001**) ha sido descrita como consecuencia de la alteración de la permeabilidad que sufren las membranas de estas células junto con la capacidad de las ribotoxinas para interactuar con fosfolípidos ácidos, en que estas se encuentran enriquecidas (**Gasset et al., 1994; Connor et al., 1989; Turnay et al., 1993**). De forma paralela, los estudios realizados con vesículas de diferente composición lipídica han mostrado como, inicialmente, α -sarcina produce la agregación de las mismas, que evolucionan mediante un proceso de fusión hacia la formación de estructuras mayores, produciéndose en el proceso su translocación al interior de las mismas (**Gasset et al., 1994**).

Por tanto, la acción citotóxica de las ribotoxinas, y por ende de la α -sarcina, implica dos acciones secuenciales. Primero, el acceso a través de la membrana celular, siendo ésta la etapa limitante, y después, la muerte celular como consecuencia de su actividad ribonucleolítica inactivadora del ribosoma (**Turnay et al., 1993; Olmo et al., 2001**).

Como se ha comentado en el apartado anterior, las ribotoxinas comparten con las RNAsas no tóxicas su núcleo estructural central, diferenciándose principalmente en la longitud y composición de sus bucles, que son más largos y de carácter básico en las

ribotoxinas (**Figura 7**), siendo responsables de la interacción de estas proteínas con las membranas plasmáticas y, por tanto, de su relativa citotoxicidad inespecífica (**Martínez del Pozo, et al., 1989**).

En conjunto, las características estructurales y funcionales descritas para las ribotoxinas presentan innumerables virtudes para su utilización en el diseño de inmunotoxinas. Entre ellas se encuentra su pequeño tamaño, su baja inmunogenicidad, su elevada termoestabilidad y, sobre todo, su actividad ribonucleolítica específica inactivante de la función ribosomal. Por el contrario, aunque su capacidad de atravesar membranas podría ser un inconveniente, ya que podría dar cuenta de una cierta citotoxicidad inespecífica, los diseños de inmunotoxina incorporando α -sarcina desarrollados hasta la fecha muestran una considerable reducción de ese factor una vez que la ribotoxina se ha unido al dominio marcador (**Wawrzynczak et al., 1991; Nelson-Carreras et al., 2012; Tomé-Amat et al., 2015; Jones et al., 2016**)

OBJETIVOS

1.-Bloque I

En lo relativo al desarrollo de inmunotoxinas antitumorales CEA-específicas, que se presenta en el Bloque I de Resultados, el objetivo general del trabajo se centró en el diseño, producción y caracterización de variantes de inmunotoxina basadas en la utilización de diferentes fragmentos de anticuerpo recombinantes, buscando la optimización de sus propiedades para el tratamiento antitumoral *in vivo*. A modo de desglose, este objetivo general se puede dividir en los siguientes objetivos particulares:

1. Generación y caracterización de inmunotoxinas CEA-específicas basadas en los anticuerpos MFE23 scFv y VHHCEA5v2 como dominio marcador, y en la ribotoxina α -sarcina como dominio tóxico.
2. Estudio del efecto de la trimerización de inmunotoxinas monoméricas, mediante la plataforma *trimerbody*, sobre sus propiedades citotóxicas *in vitro* y antitumorales *in vivo*.

2.- Bloque II

El objetivo general del Bloque II de Resultados de esta Tesis Doctoral incluye el diseño, producción y caracterización de dos inmunotoxinas dirigidas frente a dos dianas con potencial terapéutico en la patología alérgica respiratoria: la IgE y el receptor ST2. A modo de desglose, los objetivos particulares de este bloque para cada una de las construcciones se subdividen del siguiente modo:

1. Generación, producción y purificación de las inmunotoxinas proDerp1 α S e IL33 α S; así como de las proteínas recombinantes que componen sus dominios marcadores, la forma precursora del alérgeno Der p 1 (rproDer p 1) y la forma madura de IL-33 murina (mIL-33).
2. Caracterización estructural y funcional *in vitro* de ambas construcciones, incluyendo el estudio de las actividades enzimáticas aportadas por los dominios marcador y tóxico.
3. Caracterización de las actividades biológicas y citotóxicas de ambas construcciones sobre sus dianas celulares antígeno específicas, utilizando modelos celulares *in vitro* y células de pacientes alérgicos y no alérgicos *ex vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Materiales

1.1.-Tipos celulares

1.1.1.-Cepas de *Escherichia coli*

DH5 α F'

Genotipo: F' *endA1 hsdR17* ($r_K m_K$) *supE44 thi-1 recA1 gyr A* (NaI^R) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* [Θ 80 *dlac* Δ (*lacZ*) M15]

Cepa utilizada para la amplificación, propagación, conservación y aislamiento de los plásmidos y las construcciones desarrolladas. El genotipo *endA1* mejora la eficacia de purificación de 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. La preparación de estas células competentes se realizó mediante el método de Hanahan, con una modificación que implica el empleo de RbCl (**Hanahan et al. 1983**).

1.1.2.-Cepas de *Pichia pastoris*

BG11 (PPS-9011)

Genotipo: *aox1* Δ , Fenotipo: His⁺, Mut^S

Cepa utilizada para la expresión de proteínas recombinantes utilizando el vector pPICZ α A. Esta cepa deriva de la cepa salvaje de expresión BG10, ambas desarrolladas por la compañía BioGrammatics. Debido a la delección completa del marco abierto de lectura del gen de la enzima alcohol oxidasa I (AOX1), presenta un crecimiento lento cuando el metanol es la única fuente de carbono disponible. Esta cepa está optimizada para la producción heteróloga de proteínas recombinantes, tanto a partir de cultivos en matraces de Erlenmeyer como mediante el uso de fermentadores.

KM71H

Genotipo: *arg4 aox1::ARG4* (*arg4 his4*). Fenotipo: His⁺, Mut^S

Cepa utilizada para la expresión de proteínas recombinantes utilizando el vector pPICZ α A. Esta cepa presenta truncado el gen AOX1 (responsable del 80% de esta actividad), de modo que la alcohol oxidasa II (AOX2) es la única responsable del metabolismo del metanol. Por tanto, se trata de una cepa Mut^S (*Methanol Utilization Slow*) que crece lentamente con metanol como única fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.3.-Líneas celulares de mamífero

Calu-3 (ATCC HTB-55)

Línea celular humana, con origen en un adenocarcinoma de pulmón, utilizada como modelo de célula epitelial pulmonar. Debido a su diferenciación espontánea se han utilizado para modelizar *in vitro* el epitelio pulmonar. Su cultivo se ha realizado de manera rutinaria en DMEM/F12, suplementado con 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente mediante tripsinización de 2-3 min.

HeLa (ATCC CCL-2)

Línea celular utilizada como modelo celular CEA-negativo. Las células, de morfología tipo fibroblasto, crecen de forma adherente ocupando homogéneamente la superficie de cultivo. Se trata de una línea celular humana, de origen epitelial, concretamente de adenocarcinoma de cérvix. Fueron crecidas rutinariamente en DMEM suplementado con 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente mediante tripsinización de 4-5 min.

HeLa-CEA

Esta línea celular, suministrada por el Grupo de Inmunología Molecular del Hospital Puerta de Hierro, se ha derivado mediante transfección con un lentivirus para la expresión del antígeno CEA. Se ha utilizado como modelo de línea CEA-positiva. Las células fueron crecidas rutinariamente en DMEM suplementado con 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y FBS al 10% (v/v), con la adición de geneticina (G418) 500 µg/ml para la selección de transfectantes. Su propagación se realizó rutinariamente mediante tripsinización de 4-5 min.

LAD 2

Línea celular de mastocitos humanos (**Kirshenbaum et al., 2003**) donada por los Drs. Dean Metcalfe y Arnold Kirshenbaum (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, USA). Las células fueron cultivadas en medio Stem Pro-34 (Invitrogen, Carlsbad, CA) libre de suero y suplementado con L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 ng/ml de factor humano de células *stem* (*human SCF*) recombinante (Peprotech).

LIM1215 (ECACC 10092301)

Línea celular proveniente de un carcinoma de colon humano, utilizada como modelo celular CEA-positivo (**Bacat et al., 2016**). Las células presentan diferenciación parcial, creciendo agrupadas en islotes con una adhesión débil a la superficie de cultivo. Su

obtención se realizó a través del “Ludwig Cancer Institute”. Células crecidas en RPMI, suplementado con 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente mediante tripsinización de 2-3 min.

RBL-2H3 hFcεRI

Las células RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia*) transfectadas con el DNA codificante para el receptor humano de alta afinidad de IgE (hFcεRI) fueron donadas por el Dr. Lothar Vogel (Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Alemania) (**Vogel et al., 2005**). Se cultivaron en MEM suplementado con 5% de FBS, 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomina en frascos de cultivo de 75 cm² de superficie, incubándose a 37°C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% (v/v). Su propagación se realizó dos veces a la semana utilizando EDTA 10 mM.

Raw 264.7 (ATCC TIB-71)

Línea celular de macrófagos de ratón, procedente de leucemia murina de Abelson por transformación vírica. Presentan una morfología de monocito/macrófago creciendo de forma adherente. Esta línea celular se ha utilizado como modelo murino positivo para la expresión de ST2 (**Bae et al., 2012; Pinto et al., 2015**). Las células fueron crecidas rutinariamente en DMEM suplementado con 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente mediante raspado suave.

SW1222 (ATCC HB-11028)

Línea celular, proveniente de un carcinoma de colon humano, utilizada como modelo celular CEA-positivo (**Bacat et al., 2016**). Las células presentan diferenciación espontánea, creciendo en forma de domos. Su obtención se realizó a través del “Ludwig Cancer Institute”. Células crecidas en RPMI, suplementado con 300 mg/ml de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente mediante tripsinización de 5-10 min.

1.2.-Organismos modelo *in vivo*

Para el estudio del efecto de las inmunotoxinas antitumorales sobre el crecimiento de tumores *xenograft* se utilizaron ratones Balb/c. Esta cepa posee una mutación en el gen *Foxn1* (*forkhead box N1*), cuyo resultado es una aplasia tímica que resulta en una inmunodeficiencia caracterizada por la deficiencia de linfocitos T, permaneciendo

MATERIALES Y MÉTODOS

normal la funcionalidad de los linfocitos B. Esta inmunodeficiencia permite el injerto de tejido tumoral humano sin causar rechazo en el huésped, posibilitando su uso como organismo modelo para el estudio de la actividad antitumoral de las inmunotoxinas.

Los ratones se obtuvieron de la empresa Harlan Laboratories (Barcelona, España).

1.3.-Vectores de clonación y expresión

1.3.1.-Pichia pastoris

pPICZαA (Invitrogen)

Plásmido utilizado para la construcción y expresión en *P. pastoris* de las diferentes proteínas recombinantes incluidas en este trabajo. El vector contiene una región del promotor del gen AOX1, junto con secuencias situadas en los extremos 5' y 3' de este mismo gen, un sitio de clonaje múltiple y una secuencia codificante para un dominio de extensión de histidinas. También incluye una secuencia codificante para el propéptido señal factor α , que promueve la secreción al medio extracelular de la proteína tras su síntesis ribosomal. Al ser eliminado durante el proceso de secreción, este propéptido factor α no aparece en la proteína extracelular. Con propósitos selectivos el vector incluye un gen de resistencia al antibiótico zeocina. Los sitios de corte para la linealización del vector, requerida para su inserción en el genoma de *P. pastoris*, son *SacI*, *PmeI* y *BstXI*.

1.4.-Fragmentos de cDNA

MFE23 scFv

Secuencia de DNA codificante del fragmento MFE23 scFv, anticuerpo monoclonal recombinante dirigido frente al antígeno CEA. El cDNA, incluido en los plásmidos pAB1-MFE23scFv y pCR3.1-MFE23scFv-L21-TIE^{XVIII}-L21-OKT3, fue obtenido del Grupo de Inmunología Molecular del Hospital Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid).

L21-TIE^{XVIII}-L21

Secuencia de DNA codificante del dominio de trimerización no colagenoso del colágeno humano tipo XVIII (TIE^{XVIII}), flanqueado en ambos lados por la secuencia codificante del linker L21. La secuencia de cDNA, incluida en el plásmido pCR3.1-MFE23scFv-L21-TIE^{XVIII}-L21-OKT3, fue suministrada por el Grupo de Inmunología Molecular del Hospital Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid).

VHHCEA5v2

Secuencia de DNA codificante del anticuerpo humanizado monodominio VHHCEA5v2 dirigido frente al antígeno CEA. El cDNA fue obtenido del Grupo de Inmunología Molecular del Hospital Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid), incluido en el plásmido pCR3.1-VHHCEA5v2.

α -Sarcina

Secuencia de cDNA de la ribotoxina α -sarcina. Fue obtenida por nuestro grupo de investigación a partir del hongo *Aspergillus giganteus* (Lacadena *et al.*, 1994). La secuencia codificante utilizada durante este trabajo estaba incluida en el plásmido pPICZ α AIMTXA33 α S.

proDer p 1

Secuencia de DNA codificante de la forma precursora del alérgeno Der p 1 no glicosilado (proDer p 1-N132Q). El cDNA, conteniendo los codones optimizados para su expresión heteróloga en *P. pastoris*, se obtuvo mediante síntesis química por Integrated DNA Technologies (IDT), incluido en el plásmido pUCIDT-DerUCM. La secuencia del cDNA está flanqueada por los sitios de restricción *EcoRI* en 5' y *NotI* en 3' para facilitar su clonaje en el vector pPICZ α A.

proIL-33 murina

Secuencia de DNA codificante de la forma precursora de la IL-33 de ratón. La secuencia, conteniendo una selección de codones optimizados para su expresión en *P. pastoris* fue obtenida de Integrated DNA Technologies (IDT) en el plásmido pUCIDT-ILUCM. La secuencia está flanqueada por los sitios de restricción *EcoRI* en 5' y *NotI* en 3'.

1.5.-Medios de cultivo

1.5.1.-Medios de cultivo para *E. coli*

LB

Bactotripton a al 1% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0.
Para la realización de placas: agar al 1,5% (p/v).

LB-low salt

Bactotripton a al 1% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), pH 7,0.
Para la realización de placas: agar al 1,5% (p/v).

MATERIALES Y MÉTODOS

TfB1

RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (v/v), pH 5,2.

TfB2

RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15% (v/v), MOPS 10 mM, pH 7,0.

Ψ-Broth

Bactotripton a al 2% (p/v), extracto de levadura al 0,5% (p/v), MgSO₄ al 0,4% (p/v), KCl 10 mM, pH 7,4.

1.5.2.-Medios de cultivo para *P. pastoris*

BMGY

Peptona bacteriológica al 2% (p/v), extracto de levadura al 1% (p/v), fosfato potásico 100 mM, YNB al 1,34% (p/v), biotina al 4x10⁻⁵% (p/v), glicerol al 1% (v/v), pH 6,0.

BMGMY

Peptona bacteriológica al 2% (p/v), extracto de levadura al 1% (p/v), fosfato potásico 100 mM, YNB al 1,34% (p/v), biotina al 4x10⁻⁵% (p/v), glicerol al 0,125% (v/v), metanol al 0,5% (v/v), pH 6,0.

BMMY

Peptona bacteriológica al 2% (p/v), extracto de levadura al 1% (p/v), fosfato potásico 100 mM, YNB al 1,34% (p/v), biotina al 4x10⁻⁵% (p/v), metanol al 0,5% (v/v), pH 6,0.

YPD

Peptona bacteriológica al 2% (p/v), extracto de levadura al 1% (p/v), D-dextrosa al 1% (p/v), pH 7,0. Para la realización de placas: agar al 1,5% (p/v).

YPDS

Peptona bacteriológica al 2% (p/v), extracto de levadura al 1% (p/v), D-dextrosa al 1% (p/v), D-sorbitol 1M, pH 7,0. Para la realización de placas: agar al 1,5% (p/v).

1.5.3.-Medios de cultivo para células de mamífero

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

El medio DMEM no contiene proteínas, ni lípidos ni factores de crecimiento. Por tanto, requiere su suplementación con suero fetal bovino (FBS), usualmente al 10% (v/v). Al contener bicarbonato sódico al 0,37% (p/v) como sistema de tamponado requiere una atmósfera del 5-10% (v/v) de CO₂ para mantener el pH fisiológico.

DMEM-F12

Medio compuesto por una mezcla 1:1 de DMEM y medio F12 de Ham. Este medio combina altas concentraciones de glucosa, aminoácidos y vitaminas con la amplia variedad de componentes que aporta el F12. Incluye 0,292 mg/ml de L-glutamina y HEPES 15 mM para el ajuste del pH fisiológico.

MEM (Eagle's Minimal Essential Medium)

Desarrollado desde el Medio de Eagle es apto para el crecimiento de un amplio espectro de células de mamífero, especialmente para aquellos tipos celulares cuyo crecimiento se realiza en adhesión. La variedad utilizada (Gibco, Ref. 31095-029) incluye suplemento con sales de Earle, 0,292 mg/ml de L-glutamina y bicarbonato sódico por lo que requiere entre 5-10% (v/v) CO₂ para mantener el pH fisiológico adecuado. MEM no contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento. Por lo tanto, el MEM requiere suplementación, generalmente con FBS entre el 5-10%.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)

Este medio de cultivo se diferencia de otros medios como el Eagle's Minimal Essential Medium o el Dulbecco's Modified Eagle Medium porque contiene el agente reductor glutatión y altas concentraciones de vitaminas (biotina, vitamina B₁₂, ácido 4-aminobenzoico). Además, incluye colina e inositol a muy altas concentraciones. Al no contener ni proteínas, ni lípidos, ni factores de crecimiento, requiere suplementación con 10% (v/v) de FBS. El RPMI 1640 utiliza bicarbonato sódico como tampón por lo que necesita entre 5-10% (v/v) CO₂ para mantener el pH fisiológico.

1.6.-Antibióticos

Zeocina

Antibiótico utilizado para la selección de transformantes con el plásmido pPICZαA. Las concentraciones empleadas fueron 25 µg/ml para *E. coli*, y 100, 400, 750 µg/ml para *P. pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Geneticina (G418)

Antibiótico utilizado para el mantenimiento de las células HeLa-CEA y RBL-2H3 hFcεRI transfectadas para la expresión de CEA humano y de hFcεRI, respectivamente. La concentración empleada fue 500 µg/ml.

1.7.-Soluciones y tampones de uso general

1.7.1.-Electroforesis de ácidos nucleicos

Tampón TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

Tampón de aplicación (6x): Azul de bromofenol al 0,25% (p/v), cianol de xileno al 0,25% (p/v), glicerol al 30% (v/v).

1.7.2.-Electroforesis de proteínas PAGE-SDS

Tampón de desarrollo: Tris 25 mM, glicocola al 0,14% (p/v), SDS al 0,1% (p/v), pH 8,4.

Tampón de aplicación (3x): Tris 50 mM, SDS al 3% (p/v), glicerol al 10% (v/v), EDTA 2 mM, azul de bromofenol al 0,02% (p/v).

Solución de tñido (Azul de Coomasie): Coomasie Brilliant Blue R-250 al 0,25% (p/v), metanol al 50% (v/v), ácido acético glacial al 10% (v/v).

Solución de desteñido: Metanol 50% (v/v), ácido acético glacial al 20% (v/v).

1.7.3.-Inmunodetección (*Western blot*)

PBS (tampón fosfato salino): NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4.

Tampón de transferencia: Tris 48 mM, glicocola al 0,14% (p/v), SDS al 0,0375% (p/v), metanol al 20% (v/v), pH 9,5.

Tampón de bloqueo: Leche en polvo al 3% (v/v), Tween-20 al 0,1% (v/v) en PBS.

Tampón de lavado: Tween-20 al 0,1% (v/v) en PBS.

Solución de revelado DAB: PBS, tetrahidroclorato de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) al 0,03% (p/v), H₂O₂ al 0,016% (v/v) en PBS.

Solución de revelado ECL: Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer).

1.7.4.-Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)

Tampón de bloqueo: Leche en polvo al 3% (p/v) en PBS o BSA al 5% (p/v) en PBS, en función del anticuerpo utilizado para la inmunodetección.

Tampón de lavado: Tween-20 al 0,5% (v/v) en PBS.

Tampón de revelado: Citrato sódico 0,1 M, metanol al 4% (v/v), H₂O₂ al 0,03% (v/v), dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD) al 0,063% (v/v), pH 5,0.

1.7.5.-Ensayo de actividad ribonucleolítica sobre ribosomas eucariotas

Tampón A: Tris 40 mM, KCl 40 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5.

Tampón B: Tris 50 mM, SDS al 5% (p/v), pH 7,4.

Tampón de desarrollo: MOPS 20 mM, acetato sódico 50mM, EDTA 10 mM, pH 7,0.

1.7.6.-Citometría de flujo

Tampón incubación: BSA al 0,1% (p/v) en PBS.

Tampón lavado: PBS.

Tampón fijado: Paraformaldehído (PFA) al 1% (v/v) en PBS.

1.7.7.-Inmunofluorescencia

Tampón incubación: BSA al 1% (v/v) en PBS.

Tampón de lavado: PBS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tampón fijado: PFA al 4% (v/v) en PBS.

1.7.8.-Ensayo activación de basófilos (BAT)

Tampón de estimulación: NaCl al 0,78% (p/v), KCl al 0,037% (p/v), CaCl₂ al 0,078% (p/v), MgCl₂ al 0,033% (p/v), HSA al 0,1% (p/v), pH 7,4. Contiene 10 µg/ml de IL-3.

Tampón de lisis: BD FACSTM Lysing Solution (Beckton Dickinson, California, EEUU). El reactivo contiene 3% (v/v) dietilenglicol, 1% (v/v) de formaldehído y 1,15% (v/v) de metanol.

Tampón de lavado: Tween-20 al 0,05% (v/v) en PBS.

1.7.9.-Ensayo de Anexina V-FITC/IP

Anexina V Binding Buffer: HEPES 50 mM, NaCl 0,7 M, CaCl₂ 12,5 mM, pH 7,4.

Anexina V-FITC: Anexina V recombinante marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Concentración: 0,32 mg/ml. Grado de marcaje (DOL, *degree of labelling*): 1,53 (expresado en número de moléculas de sonda por molécula de Anexina V).

1.8.-Columnas de cromatografía

Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)

Columna de exclusión por tamaño molecular utilizada en sistema FPLC AKTA Purifier con fines analíticos y preparativos, para la estimación de masas moleculares de proteínas en solución y para la purificación de proteínas recombinantes, respectivamente.

Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)

Columna de exclusión por tamaño molecular utilizada en sistema FPLC AKTA Purifier con fines analíticos y preparativos, para la estimación de masas moleculares de proteínas en solución y para la purificación de proteínas recombinantes, respectivamente.

Dietilaminoetil (DEAE)-celulosa

Columna de cromatografía de intercambio aniónico utilizada con fines preparativos para la purificación del alérgeno recombinante proDer p 1. La columna posee unas dimensiones de 70 x 4 cm (largo x diámetro).

Ni²⁺-NTA Agarosa (HisTrap™ FF crude, Amershan Bioscience)

Columna de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado, utilizada con fines preparativos para la purificación de las proteínas recombinantes que incluyen en su composición una extensión de histidinas.

1.9.-Sondas fluorescentes

Sondas fluorescentes para el marcaje de proteína

Las sondas Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 555 (ThermoFischer) fueron utilizadas en el marcaje directo de las inmunotoxinas purificadas para su utilización en ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo. Las sondas se conjugaron a los grupos amino de las cadenas laterales de los residuos básicos de la proteína a través de un grupo succinimidil-éster.

Sondas fluorescentes para los ensayos de viabilidad/citotoxicidad

El kit para el marcaje de células muertas LIVE/DEAD (Invitrogen) fue utilizado en citometría de flujo para estudiar *ex vivo* el efecto citotóxico de la inmunotoxina proDerp1 α S sobre los basófilos contenidos en los PBMCs de pacientes alérgicos y no alérgicos a Der p 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.10.-Relación de anticuerpos

Anticuerpo	Antígeno	Tipo	Dilución				T (°C)	T (h)	Procedencia
			WB	FACs	IF	ELISA			
Anti-α-sarcina	α -Sarcina	<i>Rabbit</i>	1/3000	1/500	1/500	1/9000	25°C	3	UCM
Anti-Der p 1	Der p 1	<i>Rabbit</i>	1/3000	-	-	1/9000	25°C	1	ALK-Abelló
Anti-IL33	IL33 mouse	<i>Goat</i>	1/1000	-	-	1/10000	25°C	1	RyD Systems
Anti-HisTag-HRP	His-Tag	<i>Mouse</i>	1/2000	-	-	1/9000	25°C	2	Sigma-Aldrich
GAR-HRP	Rabbit IgG	<i>Goat</i>	1/3000	-	-	1/3000	25°C	1	BioRad
RAG-HRP	Goat IgG	<i>Rabbit</i>	1/2000	-	-		25°C	1	RyD Systems
RAM-HRP	Mouse IgG	<i>Rabbit</i>	-	-	-	1/2500	37°C	1	Abcam
Anti-HisTag-Alexa 488	His-Tag	<i>Mouse</i>	-	1/100	1/100	-	25°C	1	Sigma-Aldrich
mAb anti-CEA	CEA	<i>Rabbit</i>	-	1/400	1/400	-	25°C	1	Abcam
Anti-hIgE	hIgE	<i>Mouse</i>	-	-	-	1/5000	37°C	1	ALK-Abelló
Anti-CD44	CD44	<i>Mouse</i>	-	-	1/400	-	25°C	1	Cell Signalling
GAR-Alexa 488	Rabbit IgG	<i>Goat</i>	-	1/400	1/400	-	25°C	1	Invitrogen
DAM-Alexa 647	Mouse IgG	<i>Donkey</i>	-	-	1/400	-	25°C	1	Abcam
Anti-hCCR3-FITC	hCCR3	<i>Mouse</i>	-	1/120	-	-	37°C	1	BioLegend
Anti-hCD203c-PerCP	hCD203c	<i>Mouse</i>	-	1/220	-	-	4°C	0,33	BioLegend
Anti-hCD63-PE	hCD63	<i>Mosue</i>	-	1/220	-	-	4°C	0,33	BioLegend
Anti-hCCR3-APC	hCCR3	<i>Mouse</i>	-	1/200	-	-	R.T.	0,5	BioLegend
Anti-IgE-PE	IgE	<i>Mouse</i>	-	1/100	-	-	R.T.	0,5	BioLegend

1.11.-Relación de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'...3')	Amplificación de
Oligo-1	ATTTACAGAAATTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCT	extremo 5' de fragmento 5'EcoRI- MFE23scFv desde pCR3.1- MFE23scFv- L21-TIE ^{XVIII} - L21-OKT3
Oligo-2	ATTTACAGCGGCCGCCGTTTCAGCTCCAGCTT	extremo 3' de fragmento MFE23scFv-NotI3' desde pCR3.1- MFE23scFv- L21-TIE ^{XVIII} - L21-OKT3
Oligo-3	ATTCATCAGCGGCCGCGAGTTCAGGCGCGGTTGG ATCT	extremo 5' de fragmento 5'NotI-NoEcoRI- L21-TIE ^{XVIII} desde
Oligo-4	ATTCATCAGTCGACCGCTGCCCCATCAGAGCCAC TAGA	extremo 3' de fragmento TIE ^{XVIII} - L21-Sall3' desde pCR3.1-MFE23scFv- L21- TIE ^{XVIII} - L21-OKT3
Oligo-5	ATTCATCA-GGTGACCCGACCGCTGGCGCCATCAGA GCC	extremo 3' de fragmento TIE ^{XVIII} - L21-BstEII3' desde pCR3.1-MFE23scFv- L21- TIE ^{XVIII} - L21-OKT3
Oligo-6	ATTCATCAGAAATTCAGGTGCAGCTGGTTGAATCTG GC	extremo 5' de fragmento 5'EcoRI-VHHCEA5v2 desde pCR3.1-VHHCEA5v2
Oligo-7	ATTCATCAGCGGCCGCCAGATGACACGGTCACCTGG GTGCCCTGGCC	extremo 3' de fragmento VHHCEA5v2-NotI3' desde pCR3.1-VHHCEA5v2
Oligo-8	ATTCATCACAGTCGACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT GAGTGACACGGTCACCTGGGTGCCCTGGCC	extremo 3' de fragmento VHHCEA5v2-6His-STOP-Sall3' desde pCR3.1-VHHCEA5v2
Oligo-9	ATTCATCAGAAATTCAGGTGCAGCTGGTTGAATCTG GC	extremo 5' de fragmento 5'EcoRI-proDerp1 desde pUCIDT-DerUCM
Oligo-10	ATTCATCAGTCGACTCAGAGTATTACGACGTATGGGT ATTCTCATT	extremo 3' de fragmento proDerp1-STOP-Sall3' desde pUCIDT-DerUCM
Oligo-11	ATTCATCAGAAATTCAGGTGCAGCTGGTTGAATCTG GC	extremo 5' de fragmento 5'EcoRI-mIL-33 desde pUCIDT-ILUCM
Oligo-12	ATTCATCAGTCGACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGG TCTTTGACAACCTAAACATGAT	extremo 3' de fragmento mIL-33-6His-STOP-Sall3' desde pUCIDT-ILUCM
Oligo-13	ATTCATCAGCGGCCGCCGATCTTTGACAACCTAAACAT	extremo 3' de fragmento mIL-33-NotI3' desde pUCIDT-ILUCM

2.-Metodología

2.1.-Amplificación, modificación, purificación y caracterización de ácidos nucleicos

2.1.1.-Electroforesis en geles de agarosa

Este procedimiento se utilizó para la detección y análisis de DNA plasmídico, así como para la purificación de fragmentos lineales de DNA. Para ello se prepararon geles de agarosa al 0,7-1% (p/v) en TAE según el tamaño del DNA de interés. Las muestras se aplicaron añadiendo el volumen adecuado de tampón de aplicación 6x y las electroforesis se desarrollaron a un voltaje constante, entre 80-100 V. En todos los casos se utilizaron patrones de masa molecular, correspondientes a un DNA patrón digerido, o se utilizaron plásmidos sin digerir de tamaño y concentración conocidos. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron durante 10 min en bromuro de etidio (1µg/ml). La detección del DNA se realizó mediante iluminación con luz UV utilizando un digitalizador de imágenes ChemiDoc XRS+ y el *software* Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories).

2.1.2.-Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp System 2400 (Perkin-Elmer). Se realizaron de manera general en 50 µl de mezcla de reacción, conteniendo: dNTPs (200 µM de cada especie), cebadores (1 µM de cada especie) y la enzima *Pfu Polimerasa* (Promega) en su tampón correspondiente. Los oligonucleótidos correspondientes para cada amplificación, así como su uso detallado, se describen en el apartado correspondiente de Materiales. Los programas empleados para la amplificación suponen una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min, una segunda etapa de 30 ciclos de amplificación consistentes en 30 segundos de desnaturalización, 1 min de hibridación a 45-55°C, dependiendo de la T_m de los oligonucleótidos empleados y 2 min de elongación a 72°C. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 72°C durante otros 10 min para completar la elongación de los fragmentos amplificados.

2.1.3.-Digestión con endonucleasas de restricción

Mediante la utilización de enzimas de restricción se obtuvieron los fragmentos de DNA con los extremos adecuados para el clonaje de las secuencias de cDNA de interés en los plásmidos de expresión.

En cuanto al tampón, tiempo de reacción y temperatura utilizadas, las digestiones enzimáticas de DNA se realizaron siguiendo los protocolos específicos recomendados para cada una de las enzimas. De modo general, la cantidad de DNA digerida fue 1-3 µg para fragmentos de pequeño tamaño, 10 µg de plásmidos en digestiones preparativas, y 1 µg de plásmido en digestiones analíticas. En todos los casos, la mezcla de reacción incluyó BSA (1 mg/ml) y RNasa A (0,5 mg/ml). Del mismo modo, cuando fue necesario, tras la reacción se inactivó la endonucleasa mediante 30 min de incubación a 65°C. El producto de las digestiones se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7-1% (p/v) en TAE.

2.1.4.-Ligación de fragmentos DNA

La obtención de los diferentes vectores de expresión se realizó mediante ligación de los fragmentos de DNA digeridos, correspondientes a las diferentes construcciones, utilizando la DNA ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas). Las reacciones tuvieron lugar a 22°C durante 16 h en el tampón específico suministrado por la casa comercial.

2.1.5.-Purificación de DNA plasmídico a pequeña escala

El DNA plasmídico se aisló mediante el método comercial "Wizard Minipreps" de Promega. Brevemente, 5 ml de LB o LB-*low salt*, suplementados con el antibiótico adecuado, fueron inoculados con una colonia individual del clon de bacterias transformadas. El cultivo se creció 16 h a 37°C, tras lo cual se centrifugó para recoger el sedimento celular. Estas células se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, RNasa A (100 µg/ml), pH 7,5. Las células fueron lisadas mediante la adición de NaOH 0,2 M, SDS al 1% (p/v). Posteriormente, el pH de la muestra se neutralizó con acetato potásico 1,32 M y tras centrifugación se descartaron los restos celulares y DNA genómico desnaturalizado presentes en el sedimento. El DNA plasmídico contenido en el sobrenadante se purificó con una resina de afinidad por el DNA. Tras la interacción, la columna se lavó con Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5; diluido con etanol (1:1, v/v), eluyéndose el plásmido en 50 µl de H₂O destilada.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.6.-Purificación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA procedentes de digestiones enzimáticas o amplificados por PCR se realizó mediante el método comercial “Wizard PCR Preps” de Promega. Para la purificación a partir de geles de agarosa, se recortó el bloque de agarosa en el que se contenía el DNA y se añadió sobre él 1 ml de la resina de afinidad incluida en el *kit*. Tras esto, la agarosa se fundió mediante 5 min de incubación a 55-65°C y la mezcla se cargó en una columna de afinidad por DNA suministrada por el *kit*. Tras lavarse con 2 ml de 2-propanol al 80% (v/v), el DNA se eluyó en 50 µl de H₂O destilada.

En el caso de la purificación directa de fragmentos de DNA desde el medio de reacción de PCR, una vez comprobado mediante electroforesis que sólo existía una especie amplificada, la resina de afinidad se añadió directamente a la muestra y se procedió según lo indicado en el párrafo anterior.

2.1.7.-Fenolización y precipitación de DNA plasmídico

Con el objetivo de adecuar la concentración, volumen y pureza de las muestras de plásmidos linealizados para la electroporación en células de *P. pastoris*, la última etapa de su preparación incluyó su fenolización y precipitación.

La fenolización de la mezcla de digestión (50-100 µl), conteniendo 10-12 µg de DNA plasmídico, se llevó a cabo mediante una extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1). Posteriormente el plásmido se precipitó mediante *salting out* con LiCl 4 M, MgCl₂ 0,1 M y etanol puro a -20°C, incubándose durante 1 h a -80°C. Tras centrifugar, el precipitado de DNA se lavó con etanol frío al 70% (v/v), se eliminó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se resuspendió en 10 µl de H₂O, aplicando una alícuota de 0,5 µl para su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.1.8.-Preparación células de *E. coli* competentes

La preparación de *E.coli* DH5αF' competentes se realizó mediante el método de Hanahan, con una modificación que implica el empleo de RbCl (**Hanahan et al. 1983**). Para ello, las células se crecieron en 5 ml de ψ-Broth mediante incubación a 37°C en agitación. Una vez alcanzada una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0,3; mediante este precultivo se inoculó un cultivo fresco de 100 ml de ψ-Broth, que se creció en las mismas

condiciones hasta una DO_{600} de 0,48. Posteriormente el cultivo se detuvo en hielo y las células se sedimentaron por centrifugación durante 20 min a 2200 rpm y 4°C. El sedimento se resuspendió suavemente en 30 ml TfB1 (frío) y se mantuvo en hielo 90 min a 4°C. Tras sedimentarse nuevamente en las condiciones descritas anteriormente, las células se resuspendieron en 4 ml de TfB2 frío. Finalmente, las células competentes se distribuyeron en alícuotas de 0,2 ml y se guardaron congeladas a -80°C.

2.1.9.-Transformación *E. coli*

Las células *E. coli* DH5 α F' competentes, preparadas como se indica anteriormente, se descongelaron en hielo durante 10 min. Después, se añadió sobre ellas el DNA plasmídico o el producto de ligación deseado, tras lo cual la mezcla fue incubada durante 15 min en hielo. La incorporación del DNA al interior de las células se facilitó mediante un choque térmico por incubación a 37°C durante 4 min, para después devolver las células a 4°C otros 2 min. A continuación se añadieron 0,8 ml de medio ψ -Broth y las células se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación, para favorecer la recuperación de la integridad de la membrana y la expresión del gen de resistencia al antibiótico correspondiente (ampicilina o zeocina). Finalmente, diferentes volúmenes de la mezcla de transformación se plaquearon en LB-agar conteniendo el antibiótico selectivo para el plásmido transformado.

2.1.10.-Preparación *P. pastoris* competentes

Para la preparación de células de *P. pastoris* competentes se partió de una placa de YPD sin antibiótico, donde se sembró la cepa seleccionada (conservada en un vial congelado a -80°C). A partir de una colonia individual de esta placa, se inocularon 5 ml de YPD, incubados durante 16-24 h a 30°C con agitación. Al día siguiente, 200 μ l de este cultivo se añadieron sobre 50 ml de YPD fresco, creciéndose en agitación durante 16 h a 30°C. Las células se lavaron mediante tres ciclos de centrifugación suave, intercalados con su resuspensión en H₂O destilada. Finalmente, tras la última centrifugación las células se resuspendieron en 500 μ l de D-sorbitol 1 M a 4°C.

2.1.11.-Electroporación *P.pastoris*

Para la electroporación se utilizaron 5-10 μ g de DNA plasmídico, preparados en 10 μ l de H₂O y previamente linealizados mediante digestión con la enzima *Pme I*. Trabajando

MATERIALES Y MÉTODOS

siempre en condiciones de esterilidad, el plásmido se incubó durante 5 min en hielo junto con 80 µl de células de *P. pastoris* competentes. A continuación, utilizando un aparato Bio-Rad Gene Pulser, la mezcla de electroporación se sometió a un pulso eléctrico en las condiciones preestablecidas para *P.pastoris*. Tras añadirse 1 ml de D-sorbitol 1 M a 4°C, la mezcla se mantuvo durante 2 h en hielo, tras lo que se añadió 1 ml de YPD y se incubó durante otras 4 h a 30°C en agitación. Finalmente, las células se concentraron mediante centrifugación suave y posterior resuspensión en aproximadamente 300 µl del mismo medio. Esta mezcla se plaqueó en placas de YPDS-agar con diferentes concentraciones de zeocina, 100, 400 y 750 µg/ml. Las placas se incubaron a 30°C hasta la visualización de colonias, aproximadamente tras 48-72 h. Con el objetivo de asegurar un mejor rendimiento de la electroporación, este protocolo se realizó siempre con células competentes recién preparadas.

2.2.-Producción, purificación y caracterización estructural de proteínas recombinantes

2.2.1.-Producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* se llevó a cabo partiendo de las condiciones de expresión descritas en el manual “Easy Select™ Pichia Expression Kit” (Invitrogen), adaptándolas para una optimización en el rendimiento de producción en función de cada una de las construcciones expresadas. En primer lugar, se inoculó un precultivo de 100 ml de BMGY zeocina 100 µg/ml con la colonia seleccionada. Tras 24 h de crecimiento a 30°C en agitación (200 rpm), mediante este precultivo se inocularon 6 erlenmeyers de 2 L de capacidad conteniendo cada uno 375 ml de BMGY. Tras crecerse durante 20-24 h hasta una DO_{600nm} entre 10,0-13,0, inducción de la expresión se realizó mediante la sustitución en el medio de cultivo del glicerol por metanol. Para ello, los cultivos se centrifugaron durante 20 min a 4000 rpm y 4°C, resuspendiendo y distribuyendo el pellet celular en 5 erlenmeyers con 200 ml de BMMY cada uno. En función de las condiciones óptimas para cada construcción, la inducción se realizó durante 24-72 h a 25°C y 200 rpm. En aquellos casos que la inducción se prolongó más allá de las 24 h, la concentración de metanol se mantuvo constante mediante su suplemento cada 24 h a un ratio final de 0,5% (v/v). Finalizada esta etapa, el cultivo se centrifugó durante 20 min, 4000 rpm, 4°C; recogiendo el medio extracelular donde se contiene la de la proteína de interés.

2.2.2.-Purificación de proteínas recombinantes

La purificación de todas las proteínas recombinantes producidas durante esta Tesis Doctoral se llevó a cabo partir del medio extracelular de los cultivos de *P. pastoris*. Además, salvo proDer p 1 recombinante, todas las construcciones realizadas durante este trabajo incluyeron una extensión C-terminal de seis histidinas, permitiendo su purificación mediante una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado. En primer lugar, el medio extracelular fue dializado frente a tampón fosfato 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5 y, posteriormente aplicado a una columna Ni²⁺-NTA Agarosa (HisTrap™ FF crude, Amershan Bioscience). Tras ello, se realizaron sendos lavados con tampón de diálisis y con el mismo tampón enriquecido con imidazol 20 mM, eluyéndose la proteína mediante el incremento de la concentración de imidazol a 250 mM. Por último, aquellas fracciones de elución que contenían la proteína de interés, de acuerdo con el análisis electroforético de las mismas en PAGE-SDS, se homogeneizaron y dializaron para la eliminación del imidazol.

2.2.3.-Caracterización de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La caracterización estructural de las muestras purificadas incluyó el análisis de la pureza e integridad estructural de las proteínas presentes en ellas, así como la estimación de su masa molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS) (**Shapiro et al, 1967**). Con este fin se utilizaron sistemas de electroforesis en placa Miniprotean (Bio-Rad), preparándose los geles, por norma general, al 15 % de poliacrilamida:bisacrilamida (30:1), SDS al 0,1% (p/v). Las muestras se prepararon mediante su dilución en tampón de aplicación (Ver Apartado: Materiales. Electroforesis de proteínas PAGE-SDS), pudiendo contener una concentración final del 5% (v/v) de β-mercaptoetanol para la obtención de muestras reducidas. La desnaturalización se completó mediante su calentamiento durante 20 min a 95°C. Las electroforesis se desarrollaron a una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel, durante aproximadamente 45 min. Los geles se visualizaron tras su tinción con solución de azul de Coomassie y desteñido con la solución correspondiente (Ver Apartado: Materiales. Electroforesis de proteínas PAGE-SDS).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.4.-Inmunodetección (Western blot)

Las muestras proteicas analizadas mediante PAGE-SDS fueron transferidas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno), Immobilon (Millipore) mediante electrotransferencia a $0,9 \text{ mA/cm}^2$ durante 60 min con un aparato Multiphor (LKB). Una vez transferida, la membrana se saturó en tampón de bloqueo, leche en polvo al 3% (p/v) en PBS, durante 1 h a 25°C o al 0,1% (p/v) hasta el día siguiente a 4°C . La incubación con el anticuerpo primario se realizó siguiendo las condiciones específicas de uso para cada caso (Ver apartado: Materiales. Relación de anticuerpos utilizados). Tras un lavado breve con H_2O , la membrana se lavó tres veces durante 10 min con tampón de lavado para inmunodetección. La incubación con el anticuerpo secundario, en el caso de ser necesaria, se realizó siguiendo las indicaciones específicas para este (Ver apartado: Materiales. Relación de anticuerpos utilizados). Finalmente, tras repetir los lavados en las mismas condiciones, se procedió al revelado de las membranas. Según la sensibilidad requerida para la visualización del resultado se utilizaron dos métodos de revelado: a) solución de DAB en PBS y b) solución revelado ECL (*enhanced chemiluminescence*), siendo de mayor sensibilidad esta última (Ver apartado: Materiales. Inmunodetección). Las imágenes fueron tomadas utilizando un aparato ChemiDoc-It (UVP) mediante el *software* de análisis VisionWorks LS.

2.2.5.-Cálculo de coeficiente de extinción

Los coeficientes de extinción teóricos de las construcciones proteicas incluidas en este trabajo se estimaron mediante el *software* ProtParam (ExpASy, Swiss Institute of Bioinformatics).

2.2.6.-Espectrometría de masas

En aquellos casos en los que se consideró necesaria la determinación empírica de la masa molecular de una muestra proteica purificada, se recurrió al Servicio de Proteómica y Genómica del CIB-CSIC (perteneciente al Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed-ISCIII). Los experimentos de MALDI-TOF fueron realizados en un equipo Autoflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los espectros fueron adquiridos utilizando una potencia de láser justo por encima del límite de ionización. Las muestras fueron analizadas en el modo de detección de iones positivos y de extracción retardada lineal. Típicamente, 1000 disparos de láser fueron acumulados en un solo espectro de masas. La calibración externa se realizó usando

BSA (Sigma) cubriendo el rango entre 20.000-70.000 Da. Una solución saturante de ácido sinapínico en 3:1 H₂O/acetonitrilo y TFA al 0,1% (v/v) fue utilizado como matriz. Para la preparación de las muestras, la solución muestra y la matriz fueron mezcladas (1:1, v/v), y 1 µl de mezcla se aplicó en el objetivo de acero inoxidable (Bruker-Daltonics), donde se secó a temperatura ambiente.

2.2.7.-Espectrometría de dicroísmo circular

Los registros de dicroísmo circular (CD) se realizaron en un dicrógrafo Jasco J-715 (Jasco, Easton, MD, USA) equipado con un celda termoestabilizada acoplada a un baño con circulación de agua Neslab-111. Los espectros de CD en el UV lejano (200-250 nm) se obtuvieron con muestras de proteína purificada a 0,15 mg/ml a una velocidad de barrido de 50 nm/min. En cada caso se realizaron cuatro espectros, que fueron posteriormente acumulados para obtener el espectro final. Los perfiles de desnaturalización térmica, para el cálculo de la temperatura media de desnaturalización (T_m), se realizaron midiendo la dependencia de la temperatura en la elipticidad molar por residuo (MWR) en el rango de 20-80°C con un incremento de temperatura de 0,5°C/min. En todos los casos las muestras fueron analizadas en cubetas de cuarzo de paso óptico 0,1 cm en tampón 50 mM fosfato sódico, 0,1 M NaCl, pH 7,5.

2.2.8.-Cromatografía FPLC

El análisis cromatográfico por FPLC de las diferentes proteínas se realizó mediante la utilización de un aparato AKTA Purifier (Amersham Biosciences). El desarrollo de las cromatografías se realizó en tampón PBS a un flujo constante de 0,7-1 ml/min según los requerimientos de la columna utilizada, recogiendo fracciones de 0,5-0,7 ml mediante un colector Frac-920 acoplado al equipo.

Tras la inyección de la proteína al sistema, la cromatografía se desarrolló durante 1,5 volúmenes de columna en las condiciones anteriormente descritas para asegurar la completa elución de todos los componentes de la muestra aplicada. Durante su desarrollo se registró de forma continua la absorbancia a 280 nm y el fraccionamiento del colector.

2.3.-Caracterización de la interacción antígeno-anticuerpo

2.3.1.-ELISA sobre antígeno inmovilizado

El estudio de las capacidades de unión al antígeno CEA de las diferentes inmunotoxinas se realizó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) frente a antígeno inmovilizado. Brevemente, las placas (Nunc A/S. Roskilde, Dinamarca) fueron tapizadas con CEA (0,25 µg/pocillo), lavadas y bloqueadas con BSA al 5% (p/v) en PBS. A continuación, diluciones seriadas de las proteínas a ensayar se añadieron sobre los pocillos, incubándose 1 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados con 200 µl de tampón de lavado (Ver apartado: Materiales. ELISA), el anticuerpo de detección anti-His-Tag conjugado con HRP (Sigma), se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, como se indica en la Relación de Anticuerpos (Ver Apartado: Materiales). Tras nuevos lavados, el revelado se llevó a cabo con 100 µl de tampón de revelado de ELISA, deteniéndose la reacción con 100 µl de H₂SO₄. Todos los ensayos incluyeron al menos dos réplicas independientes con las que se calcularon los valores promedio.

2.3.2.-Marcaje de inmunotoxinas con sondas Alexa Fluor

En determinadas ocasiones, para su uso en ensayos de citometría de flujo y microscopia de fluorescencia, las inmunotoxinas fueron marcadas con las sondas Alexa Fluor 488 o 555. Este marcaje se realizó mediante el *kit* comercial “Alexa Fluor™ Protein Labelling kit” (ThermoFisher Scientific). Siguiendo las indicaciones del proveedor, 100 µg de inmunotoxina (1 mg/ml) fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente en tampón bicarbonato sódico 0,1 M, pH 8,0 con 5 µg de la sonda Alexa Fluor correspondiente. El exceso de sonda libre se neutralizó mediante la adición de 100 µl de tampón Tris 1 M, pH 7,8 y posterior incubación de 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la sonda no conjugada se eliminó mediante diálisis frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5.

La determinación de la cantidad de proteína marcada y de su DOL (*Degree of Labelling*: ratio moléculas de fluoróforo por molécula de proteína) se realizó de acuerdo al procedimiento suministrado por el fabricante.

2.3.3.-Citometría de flujo

Para estos ensayos se utilizaron cultivos en adhesión de las diferentes líneas celulares, que se levantaron de acuerdo al método más apropiado para cada caso (Ver apartado: Materiales. Tipos celulares. Líneas celulares de mamífero). Una vez levantadas, las células fueron lavadas, contadas y alicuotadas, disponiéndose 300.000 células por tubo. Tras ello, la suspensión celular se centrifugó, 5 min, 600 g, 4°C. A continuación los sedimentos celulares se resuspendieron en 100 µl BSA al 1% (p/v) en PBS incluyendo la concentración deseada de la proteína a ensayar y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. En aquellos casos en que la detección de la unión de la proteína al antígeno celular requirió de un anticuerpo secundario, las células fueron incubadas con anti-His-Tag-Alexa488, diluido 1/100 en BSA al 1% (p/v) en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente. En todos los casos, tras cada una de las incubaciones las células se lavaron tres veces con 500 µl de PBS, centrifugándose suavemente 5 min, 600 g, 4°C para su sedimentación.

2.3.4.-Ensayos de internación del complejo antígeno-inmunotoxina

Para este ensayo, con el fin de detectar la fluorescencia del modo más directo posible, se utilizaron las inmunotoxinas marcadas con Alexa Fluor 488 del modo descrito anteriormente.

El ensayo se realizó con células Raw 264.7 sembradas a una densidad de 100.000 células por pocillo en placa de 24 pocillos, incubadas para su adhesión y crecimiento durante 48 h en medio DMEM suplementado al 10% (v/v) con FBS. Tras esto, el medio fue retirado, añadiéndose 200 µl de medio fresco con una concentración de 50 nM de inmunotoxina marcada. Los diferentes pocillos se incubaron en la cámara de cultivo los diferentes tiempos del ensayo, parándose de manera simultánea. Para esto, las células se lavaron con PBS frío y se levantaron mediante raspado suave. Finalmente, antes de analizar las muestras en el citómetro, las células se volvieron a lavar tres veces con PBS frío. Las mediciones de fluorescencia se realizaron para cada muestra, antes y después de apagar la fluorescencia externa con 3 µl de azul de tripano por tubo. Mediante el registro de ambas fluorescencias, total e intracelular, debido a que en las células viables el azul de tripano no accede al interior celular, se infirió la relación entre inmunotoxina internada y unida sobre la membrana. Este análisis se realizó relativizando los valores de inmunotoxina internada frente a un control de unión (tiempo cero de internación); en el que, con el objetivo de inhibir la internación de los receptores, la inmunotoxina fue incubada sobre las células adheridas durante 20 min a 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.5.-Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron con la finalidad de observar la unión y la internación de la inmunotoxina al interior de las células tumorales, así como para poder estudiar la dependencia temporal de este proceso.

En primer lugar, células SW1222 se sembraron en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos tapizados con gelatina tipo B (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a una densidad de 100.000 células por pocillo. Tras 24 h de incubación para la correcta adhesión celular, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco incluyendo la inmunotoxina ensayada marcada con Alexa Fluor 555 a una concentración de 1 μM . En los estudios de unión, las placas se incubaron 20 min a temperatura ambiente. Por otro lado, en los estudios de internación, tras incubarse 20 min a 37°C en la estufa, los pocillos se lavaron tres veces con medio de cultivo, incubándose 1-4 h con medio fresco en la estufa de cultivos. Una vez finalizadas las distintas incubaciones, se retiró el medio y se lavó tres veces con PBS. A continuación, las células fueron fijadas con PFA al 3% (v/v) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo, el PFA se quencheó con cloruro de amonio 50 mM en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, los pocillos se lavaron de nuevo y los cubres se fijaron con 3 μl de Prolongold (Invitrogen). Las muestras se conservaron a 4°C hasta su visualización mediante microscopía confocal.

2.4.-Caracterización de la actividad catalítica de Der p 1

2.4.1.-Ensayo del péptido fluorogénico Boc-QAR-AMC

La actividad cisteín-proteasa de proDer p 1 recombinante y proDerp1 α S, se estudió comparativamente respecto a la forma natural del alérgeno Der p 1 mediante el ensayo del péptido fluorogénico Boc-QAR-AMC. Se utilizó una concentración del substrato butiloxicarbonil-Gln-Ala-Arg-7-amino-4-metilcumarina (Boc-QAR-AMC) de 75 nM, incubándose las proteínas a ensayar de forma equimolar (15 pmol por pocillo) en un volumen final de 200 μl por ensayo en placas de 96 pocillos. El tampón de reacción del ensayo fue PBS, L-cisteína 5 mM. La hidrólisis peptídica se monitorizó midiendo la fluorescencia del AMC liberado a intervalos de 1 min durante 10 min totales, a una temperatura de 25°C, en un fluorímetro FLUOstar Optima (BMG LABTECH). Los filtros de excitación y emisión se fijaron a 380 nm y 480 nm respectivamente. Los experimentos

incluyeron ensayos libres de Der p 1 (actividad cisteín proteasa) como control negativo, cuyos valores, considerados como línea base, fueron restados a los ensayos positivos. Además, se incluyeron pocillos utilizando el inhibidor de cisteín proteasas E64 (10 nM) y el de serín proteasas SBT1 (10 µg/ml) como controles de la especificidad proteolítica. Todos los ensayos incluyeron dos réplicas independientes con las que se calcularon los valores promedio.

2.5.-Caracterización del reconocimiento por IgE

2.5.1.-ELISA detección IgE alérgeno específica

Para estudiar el reconocimiento de nDer p 1, rproDer p 1 y proDerp1αS por IgE Der p 1 específica se realizaron ensayos ELISA utilizando sueros de pacientes alérgicos y no alérgicos a Der p 1. Los pocillos de placas para ELISA (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) fueron tapizados *overnight* usando 37 pmol/pocillo de cada una de las proteínas ensayadas. Tras esto, los pocillos se lavaron y bloquearon con leche en polvo al 3% (p/v) en PBS durante 1 h a 37°C, incubándose durante 2 h a 37°C con los sueros diluidos 1/10 en tampón de bloqueo. Después de lavarse de nuevo, se añadió el anticuerpo anti-IgE humana (hIgE), diluido 1/5000 en tampón de bloqueo (Ver apartado: Materiales. Relación de anticuerpos utilizados). Se lavó de nuevo y se incubó con el anticuerpo de revelado RAM-HRP, diluido 1/2500 en tampón de bloqueo diluido en PBS (1:1) (Ver apartado: Materiales. Relación de anticuerpos). Finalmente, tras lavar de nuevo, el revelado se desarrolló en 100 µl de tampón de revelado (Ver apartado: Materiales. Soluciones y tampones de uso general. Ensayo ELISA), deteniéndose con 100 µl de H₂SO₄ 1 N. Todos los ensayos incluyeron dos réplicas independientes con las que se calcularon los valores promedio.

2.5.2.-ELISA de inhibición con sueros

Mediante este método se analizó la reactividad cruzada en el reconocimiento de epítopos alérgicos por hIgE Der p 1-específica entre las formas natural y recombinante del alérgeno y la inmunotoxina proDerp1αS. Usando placas de 96 pocillos (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca), se tapizaron los pocillos con 0,1 µg/pocillo de nDer p 1, *overnight* a 4°C. Posteriormente, se lavaron y bloquearon con leche en polvo al 3% (p/v) en PBS durante 1 h a 37°C. Las incubaciones de inhibición de la hIgE se realizaron en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Para ello se utilizó el suero del

MATERIALES Y MÉTODOS

paciente diluido 1/10 en PBS-leche en polvo al 3% (p/v) con dos concentraciones de proteína: 37 y 0,37 nM (equivalencia molar de 0,1 y 0,01 µg/ml para nDer p 1). Después los pocillos se lavaron y se incubaron otras 2 h a 37°C añadiendo los sueros inhibidos por alérgeno/inmunotoxina. De aquí en adelante el protocolo sigue exactamente los pasos del ELISA anti-hIgE descrito anteriormente (Ver apartado: Materiales. Relación de anticuerpos utilizados). Tras lavarse, se añadió el anticuerpo anti-hIgE, diluido 1/5000 en tampón de bloqueo, seguido del anticuerpo de revelado RAM-HRP, diluido 1/2500 en tampón de bloqueo diluido previamente en PBS (1:1). Tras el revelado, se compararon las señales de la hIgE unida a la placa través del nDer p 1 tapizado, comparándose los valores recogidos según la proteína y concentración usada para la inhibición del suero. El resultado del ensayo se representó como el porcentaje de inhibición del reconocimiento por hIgE de nDer p 1 dependiente de la concentración de inhibidor. Todos los ensayos se realizaron por duplicado para cada condición ensayada.

2.5.3.-Ensayo de desgranulación con células hRBL-2H3

Los experimentos de desgranulación alérgeno-inducida en células RBL-2H3 transfectadas con el receptor humano FcεRI (hFcεRI), se llevaron a cabo mediante la valoración de la liberación de N-acetil-β-D-hexosaminidasa.

En primer lugar, las células fueron sensibilizadas *overnight* con un 5% (v/v) de suero de pacientes alérgicos en medio completo. Al día siguiente, los medios fueron retirados, estimulándose las células con diferentes concentraciones de las proteínas ensayadas, siendo prediluidas en tampón Tyrode preparado con H₂O deuterada al 50% (v/v) para aumentar y estabilizar la secreción de β-hexosaminidasa (**Maeyama et al., 1986**). La detección enzimática se realizó mediante un ensayo colorimétrico según lo descrito previamente (**Vogel et al., 2005**). Tras 1 h desde la estimulación, 30 µl del sobrenadante celular se transfirieron a una placa de 96 pocillos, mezclándose con 50 µl de la solución de sustrato (ácido cítrico 40 mM, p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida al 0,35% (p/v), pH 4,5) e incubándose 1 h a 37°C. Tras la incubación, 100 µl de glicina 0,4 M, pH 10,7 fueron añadidos a cada pocillo para detener la reacción, midiéndose la absorbancia a 405 nm. Para calcular la actividad β-hexosaminidasa total, células de pocillos control, no estimulados, se lisaron con 100 µl de Triton X-100 al 0,1% (v/v), utilizándose 30 µl de ese medio para la reacción enzimática.

2.5.4.-Test de Activación de Basófilos (BAT)

Mediante este ensayo se estudió la desgranulación de basófilos, producida por la interacción del alérgeno con la IgE unida en su membrana. El ensayo se realizó según lo descrito previamente (**Gómez et al, 2015**), utilizando muestras de sangre total de pacientes alérgicos y no alérgicos a Der p 1 estimuladas con la forma natural y recombinante de Der p 1, o con la inmunotoxina proDerp1 α S.

En primer lugar, alícuotas de 100 μ l/ensayo de sangre completa heparinizada se incubaron durante 10 min a 37°C con 20 μ l de tampón de estimulación y 1 μ l de anti-hCCR3-FITC. Tras esto se añadieron las proteínas a ensayar, a una concentración final de $2,9 \times 10^{-5}$ -2,9 nM, en 100 μ l de tampón de lavado. Como controles negativo y positivo se incluyeron, respectivamente, dos tubos sin alérgeno o con anticuerpo anti-hIgE. Tras homogeneizar la mezcla, la desgranulación se desarrolló durante 30 min a 37°C, tras lo que se detuvo mediante la inmersión de los tubos en hielo durante 5 min. El marcaje para cuantificar la desgranulación de los basófilos se realizó mediante 1 μ l de los anticuerpos monoclonales anti-hCD203C-complejo proteico clorofila peridina (PerCP, *peridinin chlorophyll crotein complex*) y anti-hCD63-ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*) incubados durante 20 min a 4°C tras una suave agitación.

La lisis de los eritrocitos se realizó añadiendo 2 ml de tampón de lisis, tras lo que se centrifugó 5 min, 1500 rpm, 4°C para precipitar las células no lisadas. Los tubos se decantaron, resuspendiéndose las células en 3 ml de tampón de lavado, ayudándose de un golpe de vórtex. Finalmente, tras otra centrifugación en las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante, las células se resuspendieron en el volumen remanente y los tubos se midieron mediante un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San Jose, California).

La determinación de la exposición de los marcadores de activación en la superficie de los basófilos se realizó mediante el registro de la fluorescencia en los canales del FITC, PE y Per-CP. Los criterios de selección de basófilos fueron CCR3⁺/CD203c⁺, y el nivel de señal de CD63-PE se utilizó como criterio de evaluación de la activación de estos (Ver Apartado: Materiales. Relación de anticuerpos utilizados). Los porcentajes de basófilos CD63-positivos en el control no estimulado fueron menores al 2,5% y el umbral de positividad se fijó en el 5%.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.5.5.-Ensayo de internación del complejo alérgeno-IgE-FcεRI

De modo semejante al protocolo de BAT, alícuotas de 100 µl/ensayo de sangre completa heparinizada se incubaron durante 10 min a 37°C con 20 µl de tampón de estimulación añadiendo 1 µl de anti-hCCR3-FITC. Tras esto, proDerp1αS se añadió en 100 µl de tampón lavado a una concentración final de 10 nM, incubándose las muestras durante 20 min o 4 h a 37°C, y directamente en hielo para el control de internación a tiempo cero. Transcurrido los diferentes tiempos, la internación se detuvo mediante incubación en hielo hasta el final del experimento, cuando los diferentes tubos se marcaron simultáneamente mediante 1 µl de anti-hCD203C-PerCP y 1 µl de anti-hIgE-PE.

El lisado de los eritrocitos y el fijado de los leucocitos se realizó del mismo modo que en el ensayo de BAT, tras lo que las células se resuspendieron en 100 µl y se analizaron mediante un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San José, California). Los basófilos se seleccionaron como CCR3⁺/CD203c⁺, y el nivel de señal de anti-hIgE-PE se utilizó como indicador de la internación del complejo IgE-FcεRI tras la estimulación con proDerp1αS. Los diferentes tiempos de incubación fueron ensayados por duplicado.

2.6.-Caracterización de la unión de IL-33 al receptor ST2/IL-1RAcP

2.6.1. Ensayos de citometría de flujo

La unión de las construcciones basadas en IL-33 a las células Raw 264.7 se estudió mediante citometría de flujo. Tras levantarse y de lavarse con PBS, las células se alicuotaron en viales de 300.000 células. Estas alícuotas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con mL-33 recombinante o IL33αS marcada con Alexa Fluor 488 en 100 µl de PBS-BSA al 1% (v/v). Tras lavarse de nuevo, tres veces con PBS, y resuspenderse en 200 µl de PBS, el marcaje celular se analizó en un citómetro FACSCan (BD Biosciences, San José, California).

2.6.2.-Ensayos de estimulación de células Raw 264.7 con mL-33/IL33αS

La unión de IL-33 a su receptor ST2/IL1RAP en las células Raw 264.7, produce su activación celular vía MAPK y NF-κβ, provocando entre otros efectos la liberación de TNF-α e IL-6 (Lingel *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2015). Por tanto, para

caracterizar el efecto de la IL33 α S sobre este mecanismo de estimulación, cultivos de células Raw 264.7 fueron estimulados con mL-33 recombinante e IL33 α S, analizándose mediante ELISA la secreción de TNF- α al medio extracelular.

Las células Raw 264.7 se levantaron mediante *scrapping* y se sembraron a una densidad celular de 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Tras su adhesión *overnight*, el medio fue renovado, sustituyéndose por 1 ml de DMEM con 10% (v/v) de FBS y concentraciones crecientes de mL-33 recombinante, IL33 α S y mL-33 murina comercial (BioLegend, Cat. 580502). Tras 24 h de, los medios fueron recogidos y centrifugados a máxima velocidad para la eliminación de restos celulares, conservándose los sobrenadantes congelados a -20°C hasta su análisis.

La detección de TNF- α murino en los medios de cultivo se realizó mediante ELISA, utilizando el *kit* de la casa comercial Diaclone (Cat. 860.040.192). Brevemente, los medios de los respectivos ensayos diluidos 4/5 se añadieron en pocillos pretapizados con anticuerpo de captura, detectándose TNF- α mediante un anticuerpo primario biotinilado y estreptavidina-HRP. Finalmente, el revelado se realizó con una solución sustrato conteniendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y H₂O₂, midiéndose la DO a 450 nm y restando la señal de fondo a 620 nm. Las concentraciones de TNF- α se calcularon mediante interpolación de la señal colorimétrica en una recta patrón elaborada con concentraciones de proteína conocidas. Los ensayos de ELISA se realizaron por triplicado para cada condición.

2.7.-Caracterización de la actividad ribonucleolítica

2.7.1.-Ensayo frente a ribosomas de mamífero

La actividad ribonucleolítica de α -sarcina sobre el Lazo Sarcina Ricina (SRL) de ribosomas eucariotas es detectada por la liberación de un fragmento de 400 nucleótidos, fragmento α , del rRNA mayor (**Schindler & Davis, 1977**). Para ello, las construcciones que incluyen α -sarcina en su composición fueron ensayadas frente a los ribosomas de un lisado de reticulocitos de conejo libre de células (Promega) (**Kao et al., 2001; Martínez-Ruiz et al., 2001**). Tras diluir el lisado (1,5:2,5) con tampón A (Ver apartado: Materiales. Ensayo de actividad ribonucleolítica ribosomas eucariotas), alícuotas de 50 μ l de esta mezcla (aproximadamente 5–6 pmol de ribosomas) fueron incubadas 15 min a temperatura ambiente con diferentes cantidades de las inmunotoxinas a ensayar y α -sarcina *wt* como control (2-12 pmol). La reacción se paró con 250 μ l de tampón B. Después, el RNA fue purificado mediante una extracción fenol/cloroformo, seguida de

MATERIALES Y MÉTODOS

su precipitación desde la fase acuosa con isopropanol. Finalmente, tras lavar el sedimento obtenido con etanol 70% (v/v) a -20°C, el RNA se resuspendió en 10 µl de H₂O tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). El fragmento α escindido fue visualizado mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa al 2% (p/v) en tampón MOPS y tinción de bromuro de etidio (**Lacadena et al. 1999; Herrero-Galán et al. 2008**). Todos los procedimientos se realizaron en condiciones libres de RNasa.

2.8.-Estudio de la estabilidad de las inmunotoxinas en condiciones fisiológicas

2.8.1.-Ensayos de estabilidad en suero

Para estudiar la estabilidad estructural y funcional de las inmunotoxinas expuestas a condiciones fisiológicas, las construcciones fueron incubadas en FBS durante 48-96 h a 37°C a una concentración final de proteína de 1 µM, tomándose alícuotas cada 24 h que se congelaron para su posterior análisis. El seguimiento de su actividad funcional se realizó mediante citometría de flujo, ELISA frente a antígeno inmovilizado y ensayo de reticulocitos, siguiendo los protocolos detallados anteriormente. Respectivamente, la integridad estructural de las construcciones se comprobó mediante *Western blot* anti-α-sarcina o anti-polyHis (Ver apartado: Métodos. Inmunodetección por *Western blot*). En todo caso, una alícuota correspondiente al tiempo cero de incubación fue tomada y ensayada como control interno del experimento.

2.9.-Caracterización de la actividad citotóxica

2.9.1- Ensayo de incorporación de leucina tritiada

Debido a que las ribotoxinas ejercen su actividad tóxica mediante la inactivación ribosomal (**Lacadena et al., 2007**), los ensayos de inhibición de la biosíntesis proteica son empleados rutinariamente para evaluar el efecto citotóxico de esta familia de proteínas, así como el de sus inmunotoxinas derivadas (**Martínez-Ruiz et al., 2001; Olmo et al., 2001; Carreras-Sangrà et al., 2012**). Siguiendo el método anteriormente descrito (**Kao et al., 2001**), las células se sembraron en placas de 96 pocillos, incubándose durante 24 h para su correcta adhesión. Después, el medio se retiró añadiendo las proteínas ensayadas diluidas en 200 µl de medio fresco libre de FBS. Tras otras 72 h en la estufa, se añadió a los cultivos 1 mCi por pocillo de L-[4,5-³H]-Leucina (166 Ci/mmol; Amersham, UK). Para el revelado del resultado, después de 6 h

de incubación, los sedimentos celulares fueron fijados con ácido tricloroacético al 5% (p/v), lavados tres veces con etanol frío (-20°C) y secados durante 30 min a 37°C. Finalmente, se disolvieron en 200 µl de NaOH 0,1 M, SDS al 0.1% (p/v) en H₂O. La radioactividad incorporada fue registrada mediante un contador de centelleo Beckman LS3801. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la radioactividad incorporada, relativizado a un control sin tratamiento. Todos los experimentos incluyeron al menos dos réplicas independientes.

2.9.2.-Ensayo de viabilidad celular

La inhibición de la función ribosomal producida por las ribotoxinas causa muerte celular (**Lacadena et al., 2007**). De este modo, para estudiar el efecto de las inmunotoxinas sobre la viabilidad de cultivos celulares se utilizaron ensayos de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El fundamento del ensayo se basa en la formación de cristales insolubles de violeta de formazán por las células metabólicamente activas al reducir estas el MTT. Brevemente, las células fueron sembradas en medio de cultivo completo en placas de 96 pocillos, incubándose durante 24 h para su adhesión. Después, el medio fue eliminado, añadiéndose las diferentes concentraciones de las proteínas a ensayar en 200 µl de medio libre de FBS. Tras 24-72 h, se retiraron 100 µl de medio por pocillo, y se añadieron 20 µl de MTT a 5 mg/ml en PBS. Finalmente, tras 4 h de incubación en la estufa, el medio fue suavemente aspirado y los cristales de violeta de formazán se disolvieron en 100 µl de DMSO: metanol (1:1) por pocillo. La absorbancia colorimétrica fue mediada a 570 nm substrayéndose el fondo a 650 nm. Todos los ensayos incluyeron duplicados independientes para cada condición.

En el caso de los ensayos de MTT realizados con células hRBL-2H3 FcεRI para evaluar el efecto del proDerp1αS sobre su viabilidad celular, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos en MEM al 5% (v/v) de FBS incluyendo un 5% (v/v) de suero de los diferentes pacientes analizados. Tras incubarse *overnight* para permitir la adhesión celular y la unión de la hIgE al receptor hFcεRI, el medio celular se sustituyó con medio fresco conteniendo las diferentes concentraciones de las proteínas a ensayar. Tras 24 h de incubación, el ensayo prosiguió según el protocolo general indicado en el párrafo anterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.9.3.-Ensayo de Anexina V-FITC/IP

Debido a su actividad inhibidora de la función ribosomal y la biosíntesis de proteínas, las ribotoxinas fúngicas provocan muerte celular programada por apoptosis (**Martínez-Ruiz et al, 2001; Olmo et al, 2001; Lacadena et al, 2007; Olombrada et al; 2017 a**). Mediante este ensayo se evaluó la apoptosis, caracterizada por un marcaje de Anexina V-FITC, y la muerte celular o apoptosis tardía, marcaje doble de Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP), causada por IL33 α S sobre células Raw 264.7.

Las células Raw 264.7 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a 50.000 células por pocillo. Tras 24 h para su adhesión el medio fue renovado, añadiéndose 1 ml de medio fresco sin FBS por pocillo con la concentración de proteína a ensayar. Tras 24 h de incubación las células fueron levantadas suavemente mediante raspado y lavadas con 500 μ l *AnnexinV Binding Buffer* (Ver apartado: Materiales. Ensayo de Anexina V-FITC/IP). Tras centrifugar de nuevo, 5 min, 1600 g, 4°C, las células fueron resuspendidas en 100 μ l de *AnnexinV Binding Buffer* incluyendo Anexina V-FITC (1,5 μ g/ml) con yoduro de propidio (2 μ g/ml) e incubadas 30 min a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron nuevamente con 500 μ l *AnnexinV Binding Buffer*, resuspendiéndose en 200 μ l del mismo tampón, antes de analizarse en un citómetro FACScan (BD Biosciences, San José, California). Para realizar las compensaciones necesarias de los dobles marcajes entre las sondas fluorescentes utilizadas, FITC y PI, se realizaron marcajes individuales para controles de vida (sin estímulo) y controles de muerte (células incubadas con DMSO al 20% (v/v) en medio).

Para los ensayos de apoptosis/muerte celular con los basófilos *ex vivo*, las PBMCs de pacientes seleccionados alérgicos y no alérgicos a Der p 1 se purificaron desde sangre completa obtenida con el correspondiente permiso del Comité Ético. En primer lugar, 20 ml de sangre heparinizada se diluyeron 1:1 con solución de NaCl al 0,9% (p/v). Tras esto, 10 ml de sangre diluida se dispusieron cuidadosamente sobre 4 ml de *ficoll-paque* (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich) y se centrifugaron a 400 g durante 30 min a temperatura ambiente con el freno de la centrífuga quitado. El halo de células mononucleadas fue recogido cuidadosamente y transferido a un tubo nuevo de 50 ml, lavado con 30 ml de solución de NaCl al 0,9% (p/v) y centrifugado 10 min a 300 g y temperatura ambiente con el freno al mínimo. Tras un segundo lavado con 50 ml de NaCl al 0,9% (p/v) y una nueva centrifugación en las mismas condiciones, los PBMCs se resuspendieron en 2 ml de PBS, EDTA 1 mM, 10% (v/v) de FBS, se contaron mediante un hemocitómetro y se resuspendieron a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI, 10% (v/v) de FBS.

Una vez purificadas, los PBMCs se cultivaron en placas de 96 pocillos conteniendo 250 μ l de medio RPMI con 10% (v/v) de FBS a una densidad celular de 200.000 células por pocillo, añadiéndose proDerp1 α S, rproDer p 1 y α -sarcina wt a diferentes concentraciones (0,1; 10; 1000 nM). Tras 24 o 72 h de incubación, para la evaluación de la apoptosis y muerte celular, las células se centrifugaron durante 5 min y 450 g a temperatura ambiente. Después, se resuspendieron en 200 μ l de *AnnexinV Binding Buffer* incluyendo Anexina V-FITC (1,5 μ g/ml) o el marcador de viabilidad celular LIVE/DEAD (1/1000), incubándose 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, las células se lavaron con 200 μ l *AnnexinV Binding Buffer* antes de analizarse en un citómetro FACScan (BD Biosciences, San Jose, California). La selección de la población de basófilos dentro de los PMBCs se realizó mediante el doble marcaje CCR3⁺/CD203c⁺ dentro de la región de linfocitos/basófilos seleccionada de acuerdo a criterios de tamaño y complejidad (Ver Apartado: Materiales. Relación de anticuerpos utilizados).

2.10.-Caracterización de la actividad antitumoral *in vivo*

Todos los procedimientos con animales fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, según las regulaciones oficiales recogidas en el Real Decreto 53//2013 y de la autoridad competente de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Con el fin de evaluar el efecto *in vivo* de las inmunotoxinas antitumorales frente a xenoinjertos humanos de cáncer de colon se utilizaron ratones *nude* Balb/c de siete semanas de edad. Los estudios se realizaron en el Animalario del Centro de Investigaciones Biológicas-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) en Madrid.

La metodología descrita a continuación sigue mayoritariamente la desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación para la caracterización del efecto *in vivo* de otras inmunotoxinas antitumorales (Tomé-Amat *et al.*, 2015c).

Inoculación de las células tumorales

Una vez en el animalario, y previamente al inicio del experimento, los ratones tuvieron un periodo de siete días de adaptación con acceso libre a comida y agua. Tras este periodo, células SW1222 en confluencia, tripsinizadas y lavadas con PBS, se prepararon para administrar 2×10^6 células en 200 μ l de PBS-Matrigel (BD Biosciences) (1:1) a cada ratón. Una vez preparada la mezcla, para evitar la gelificación del Matrigel, su

MATERIALES Y MÉTODOS

conservación y manejo se realizó siempre en frío (4°C). Cada ratón recibió un único pinchazo bajo la piel en el flanco derecho del lomo. Entre siete y diez días después, una vez que los tumores alcanzaron un tamaño entre 50-100 mm³, los ratones fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos experimentales (n=6): un grupo control, tratado con PBS, y cuatro grupos de tratamiento, dos de ellos tratados con IMTXCEAαS y otros dos con IMTXTRICEAαS.

Tratamiento con las inmunotoxinas

Cada inmunotoxina fue ensayada en dos cantidades diferentes por dosis inyectada: 25 y 50 µg. El tratamiento consistió en siete dosis, por vía intravenosa cada 48 h. El volumen de inyección para las dos cantidades de inmunotoxina, 25 y 50 µg, y para el PBS fue en todos los casos de 100 µl. Los tumores fueron medidos cada dos días durante la duración del tratamiento. Esta medición se realizó de modo externo con la ayuda de un calibre y el volumen tumoral fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula: $(\text{ancho}/2)^2 \times (\text{longitud}/2)$. Paralelamente, los ratones fueron pesados tanto a su llegada al animalario como al inicio y finalización del experimento.

Análisis y procesamiento de los resultados

Al final del tratamiento (día 14), se sacrificaron dos ratones por grupo experimental, cuyos tumores y vísceras (encéfalo, pulmones, hígado, riñones y colon) fueron extraídos y conservados para su posterior análisis. Con el resto de individuos se prosiguió el estudio, con el fin de analizar el efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral una vez terminado el periodo de tratamiento. Los tumores se siguieron midiendo cada dos días, del modo anteriormente descrito. Finalmente, el resto de ejemplares fueron sacrificados para evitar su potencial sufrimiento causado por el crecimiento desproporcionado del tumor (por encima de los 1500 mm³) o una vez alcanzado el día 28, límite temporal del experimento. De igual modo a lo descrito anteriormente, los tumores y las vísceras de estos ratones fueron extraídos y conservados.

El análisis anatomopatológico de las vísceras de ratón se realizó mediante el estudio morfológico de los tejidos tras su tinción con hematoxilina-eosina. Brevemente, los órganos de interés (encéfalo, pulmón y riñón), fijados en PFA al 4% (v/v) para su conservación, se embebieron en parafina y se seccionaron (8-10 µm) a temperatura ambiente mediante un micrótopo. Después con el objetivo de desparafinar y rehidratar las muestras para su tinción, se realizaron los siguientes lavados: 3 x 8 min en xileno, seguido de 2 x 8 min en etanol 100%, 8 min en etanol 96% y 5 min en H₂O de grifo. Tras esto, las preparaciones se tiñeron 10 min con hematoxilina de Mayer, siguiéndose de un baño de 15 min en H₂O de grifo para la diferenciación del tinte y de dos lavados de

MATERIALES Y MÉTODOS

1 min con H₂O. La tinción mediante eosina al 0,2% (v/v) duró 2 min, diferenciándose posteriormente en H₂O de grifo. Finalmente, el tejido se volvió a fijar mediante lavados secuenciales de 1 min en etanol 90%, etanol 100% y 10 min en xileno, para embeberse por último en medio de montaje. Las preparaciones obtenidas se visualizaron mediante microscopia óptica, tomándose fotos representativas de los tejidos de diferentes ejemplares pertenecientes a los grupos de tratamiento (CEA25/50 y TRI25/50) y control (PBS).

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I.

INMUNOTOXINAS ANTITUMORALES DIRIGIDAS AL ANTÍGENO CEA: OPTIMIZACIÓN DE FORMATOS PARA EL TRATAMIENTO *IN VIVO*

1.-Antecedentes

1.1.-Inmunotoxinas antitumorales basadas en RNAsas fúngicas

La investigación realizada por nuestro grupo, con anterioridad a esta Tesis Doctoral, ha conducido al desarrollo de diversas inmunotoxinas antitumorales basadas en RNAsas fúngicas, cuya producción, purificación y caracterización se describe principalmente en la Tesis Doctoral del Dr. Jaime Tomé Amat (**Tomé-Amat, 2012**), así como en diversos artículos de investigación.

El diseño modelo de nuestras inmunotoxinas está formado por una proteína de fusión en cadena única, formada por un anticuerpo scFv en posición N-terminal, unido mediante un péptido de unión (*linker*) a una ribotoxina o una RNasa no tóxica. Por tanto, todas las inmunotoxinas recombinantes desarrolladas sobre este modelo son monoméricas, monovalentes y poseen una única carga tóxica por molécula. Las variaciones entre los diseños de las distintas construcciones se encuentran en la naturaleza de su dominio tóxico, bien una ribotoxina o una RNasa no tóxica, y en la composición del *linker* que conecta ambos dominios estructurales, pudiendo ser éste el tripéptido Gly-Gly-Arg o la secuencia de proteólisis de la endoproteasa furina (*linker* furina), presente en los endosomas y el aparato de Golgi de las células de mamífero (**Figura 1**).

La especificidad de estas inmunotoxinas está determinada por el anticuerpo scFv A33. Este dominio marcador, derivado del anticuerpo monoclonal humanizado frente al antígeno asociado a tumor colorrectal GPA33 (**Ritter et al., 2001; Scott et al., 2005; Damasceno et al., 2009**), confiere a todas las construcciones que lo integran una alta afinidad y especificidad de unión a su antígeno diana. De este modo, dadas las actividades específicas de los dominios marcador y tóxico, nuestras inmunotoxinas basadas en scFv A33 (IMTXA33 α S, IMTXA33fur α S, IMTXA33T1, IMTXA33furT1 e IMTXA33Hta Δ 3W) presentan una potente citotoxicidad antígeno específica, cuya eficacia particular viene determinada por la capacidad de su componente tóxico para provocar la muerte celular una vez que la inmunotoxina es internada en la célula diana (**Carreras-Sangrà et al., 2012; Tomé-Amat et al., 2012, 2015 a, b y c; Ruiz-de-la-Herrán et al., 2019**).

La producción de las construcciones se realizó utilizando la levadura *P. pastoris*, un organismo reconocido como GRAS (*Generally Regarded As Safe*), y por tanto adecuado para la producción heteróloga de proteínas recombinantes con potencial de aplicación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

clínica (**Mattia & Merker, 2008; Blanco-Toribio et al., 2014**). Su purificación se llevó a cabo a partir del medio extracelular de los correspondientes cultivos, mediante una cromatografía de afinidad de níquel inmovilizado en resina de sefarosa, aprovechando la inclusión de una extensión de histidinas en el extremo C-terminal de las construcciones. De este modo, mediante la aplicación de sencillas metodologías, se dispone de una plataforma económica y eficaz para la producción y purificación de inmunotoxinas antitumorales basadas en ribotoxinas fúngicas con elevado rendimiento y grado de pureza.

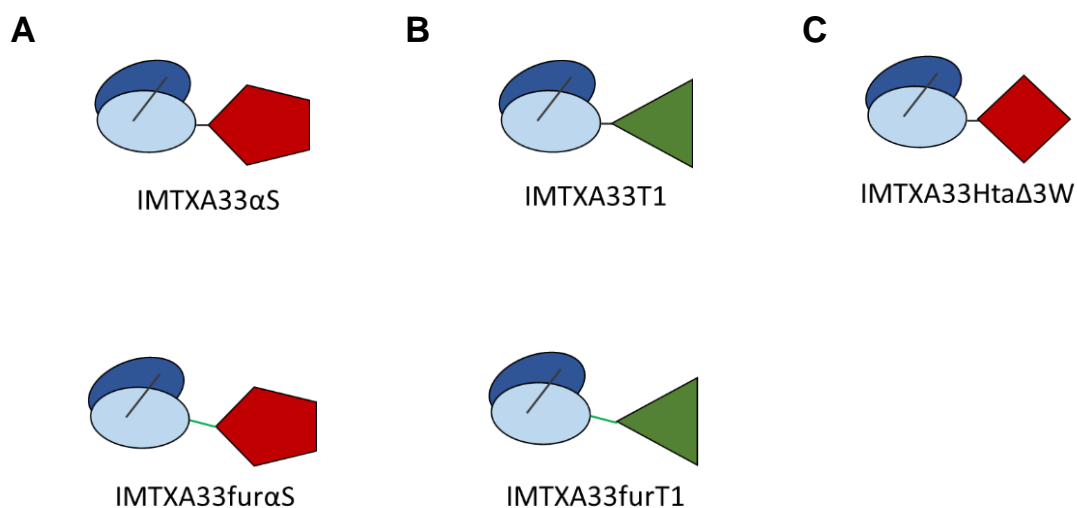


Figura 1. Diagrama mostrando la estructura de dominios de las inmunotoxinas e immunoRNAsas basadas en el anticuerpo scFv A33. A) Inmunotoxinas formadas por la ribonucleasa tóxica α -sarcina: IMTXA33 α S e IMTXA33fur α S. B) ImmunoRNAsas formadas por la RNasa no tóxica T1: IMTXA33T1 e IMTXA33furT1. C) IMTXA33Hta Δ 3W, cuyo dominio marcador está formado por la variante de ribotoxina no citotóxica Hta Δ 3W. Los componentes estructurales siguen el siguiente código: scFv A33 N-terminal (círculos azules), *linker* tripeptídico Gly-Gly-Arg (conector negro), *linker* furina (conector verde), α -sarcina (pentágono rojo), RNasa T1 (triángulo verde) y Hta Δ 3W (rombo rojo).

Entre los diferentes diseños desarrollados por nuestro grupo, IMTXA33 α S ha sido la construcción más ampliamente caracterizada (**Carreras-Sangrà et al., 2012; Tomé-Amat et al., 2014, Tomé-Amat et al., 2015c**), siendo además la que mostró una mayor eficacia en su actividad citotóxica específica sobre las células antígeno-positivas. Este efecto citotóxico, superior respecto a las construcciones cuyo dominio tóxico es la RNasa T1 o la variante no tóxica de la Hta Δ 3W, se explica por la capacidad intrínseca de la α -sarcina para interactuar con membranas lipídicas (**Kao et al., 2001; Lacadena et al., 2007**). Así, una vez escindida del dominio marcador durante el tráfico intracelular, la capacidad de interacción con membranas biológicas de esta molécula facilita su traslocación al citoplasma desde los endosomas y el aparato de Golgi, promoviendo una mayor actividad citotóxica (**Tomé-Amat et al., 2015a**). Por tanto, en base a los resultados obtenidos para las diferentes inmunotoxinas y a su mecanismo de acción, α -sarcina se presenta como la mejor opción en términos de efectividad citotóxica entre las diferentes RNAsas fúngicas para su utilización como dominio tóxico de nuestras construcciones.

Por otro lado, además de una potente actividad citotóxica *in vitro*, IMTXA33 α S mostró un marcado efecto antitumoral *in vivo*. Su administración sistémica a ratones *nude*, portando tumores subcutáneos (tumores *xenograft*) formados por células SW1222, GPA33-positivas, inhibió de forma dosis dependiente el crecimiento tumoral durante la duración del tratamiento, sin mostrar ningún indicio de toxicidad sistémica (**Tomé-Amat et al., 2015c**). El análisis *ex vivo* de los quistes tumorales tras la finalización del experimento mostró que el tratamiento con IMTXA33 α S provocó un descenso significativo en la proliferación celular y en la angiogénesis intratumoral, junto con un aumento en el marcador de apoptosis caspasa 3 escindida (CC3) (**Tomé-Amat et al., 2015c**).

En conjunto, estos resultados muestran la potencialidad terapéutica antitumoral de las inmunotoxinas basadas en la en la ribotoxina α -sarcina. Además, con una potente actividad citotóxica específica sobre sus células diana y un marcado efecto inhibitor del crecimiento tumoral *in vivo*, IMTXA33 α S se postula como un diseño viable y efectivo de agente terapéutico, además de como modelo de partida para el desarrollo de las nuevas variantes y formatos de inmunotoxina que se describen en esta Tesis doctoral.

1.2.-Antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de superficie celular, unida a la membrana mediante un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI), que aparece sobreexpresada, perdiendo frecuentemente su polarización celular normal, en diversos tumores de origen epitelial, así como en sus lesiones metastásicas derivadas (**Hammarström, 1999; Duffy, 2001**). Debido a esta expresión tumoral selectiva, en los últimos años se han desarrollado diferentes aproximaciones diagnósticas y terapéuticas dirigidas frente a CEA (**Wegener et al., 2000; Sharma et al., 2005; Kraeber-Bodéré et al., 2006; Cai et al., 2007**).

Codificado por el gen CEACAM5 (*CEA-related cell-cell adhesion molecule 5*), CEA pertenece a la familia de proteínas de adhesión celular relacionadas con CEA (CEACAM) (**Figura 2**), que se clasifica dentro de la superfamilia inmunoglobulina (**Thompson et al., 1991; Beauchemin et al., 1999; Pavlopoulou & Scorilas, 2014**). Debido a la extensión y recorrido de su uso en clínica, el antígeno CEA es el único miembro de la familia CEACAM humana que no se nombra mediante su denominador genético numérico (CEACAM1, CEACAM3...), sino que mantiene su denominación original de CEA (**Beauchemin et al., 1999**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

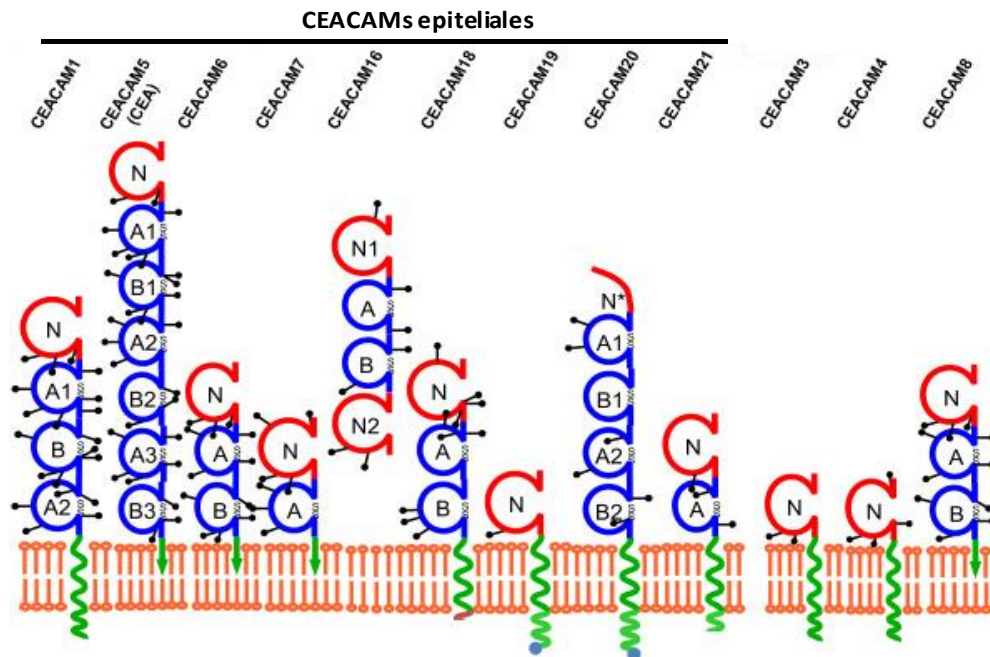


Figura 2. La familia CEACAM humana. Representación esquemática de los doce miembros de la familia de moléculas de adhesión relacionadas con el antígeno carcinoembrionario. Las esferas rojas indican los dominios homólogos a IgV, las esferas azules los dominios homólogos a IgC2, los cuales están estabilizados por puentes disulfuro (S-S). Las espirales verdes indican hélices transmembrana. Los anclajes GPI se muestran mediante una flecha verde insertada en la bicapa lipídica. Figura modificada desde <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>.

La forma madura de CEA está formada por 642 aminoácidos (70 kDa), con 28 sitios potenciales de N-glicosilación (Oikawa *et al.*, 1987; Nicholson & Stanners, 2007), de los cuales entre 24 y 26 presentan cadenas de azúcares unidas a asparagina (Yamashita *et al.*, 1987), lo que implica una masa molecular total de aproximadamente 180 kDa (Thompson *et al.*, 1991). Su estructura presenta un dominio homólogo al de inmunoglobulina variable (IgV), denominado dominio N, seguido de otros seis homólogos al dominio inmunoglobulina constante tipo 2 (IgC2), denominados A1, B1, A2, B2, A3 y B3 (Figura 3) (Thomas *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1991). El GPI, proveedor del anclaje de CEA a la cara externa de la membrana plasmática, se encuentra unido en a la proteína en posición C-terminal del dominio B3 (Takami *et al.*, 1988; Beauchemin *et al.*, 1999).

Pese a su primera identificación como un antígeno oncofetal, tras su descubrimiento en biopsias de cáncer de colon (Gold & Freedman, 1961), actualmente CEA es considerado un antígeno asociado a tumor (AAT) dado que su expresión en adultos no es exclusiva de los tejidos tumorales, sino que también aparece, aunque en muy bajos niveles y con una alta polarización celular en tejidos normales de origen epitelial (Kuroki *et al.*, 1988; Hammarström, 1999; Duffy, 2001). Esta localización en la mucosa del tracto gastrointestinal, especialmente en las células epiteliales columnares y caliciformes del extremo de las microvellosidades del colon, implica que CEA

únicamente está presente en la porción apical-luminal de los enterocitos maduros, pero no en su superficie basolateral. De este modo, en los tejidos normales CEA no está directamente expuesto al fluido tisular o sanguíneo (Baranov *et al.*, 1994; Frångsmyr *et al.*, 1999; Hammarstrom, 1999), lo que explica su continua liberación al lumen intestinal (Kuroki *et al.*, 1994) y la ausencia de marcaje descrita para los anticuerpos anti-CEA sobre tejidos no transformados (Hammarstrom, 1999). Por otro lado, CEA también aparece expresado, con la misma polarización y en muy baja cantidad, en las células escamosas del cérvix, y en los ductos y el epitelio secretor de las glándulas sudoríparas, así como en las células epiteliales de la próstata y del pulmón (Kuroki *et al.*, 1981; Nouwen *et al.*, 1986; Nap *et al.*, 1988; Kodera *et al.*, 1993; Prall *et al.*, 1996; Hammarstrom; 1999).

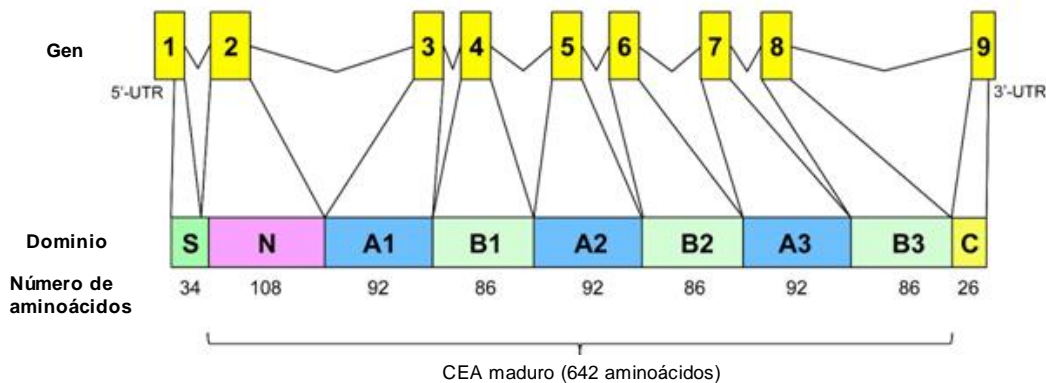


Figura 3. Estructura genética y proteica asociada al antígeno CEA. Representaciones esquemáticas mostrando la estructura genética y los dominios proteicos de la molécula CEA. CEA, codificado por CEACAM5 es sintetizado como un precursor con una señal peptídica (S) seguida por los 668 aminoácidos de la molécula madura; incluyendo el dominio N seguido de seis dominios homólogos a IgG2 (dominios A1, B1, A2, B2, A3 y B3) y el dominio C de carácter hidrofóbico (Oikawa *et al.*, 1987).

En relación con su perfil de expresión en las células transformadas, la sobreexpresión de CEA ha sido observada en múltiples tipos de cánceres de origen epitelial, incluyendo diversos carcinomas, entre ellos colorrectal (Jothy *et al.*, 1993), gástrico (Kinugasa *et al.*, 1998), pancreático (Shi *et al.*, 1994), de vejiga (Shi *et al.*, 1994), de pulmón de células pequeñas (Kim *et al.*, 1992), de mama (Cournoyer *et al.*, 1988) y de ovario (Thompson *et al.*, 1994), así como en determinados adenocarcinomas de pulmón (Robbins *et al.*, 1993) y de endometrio (Thompson *et al.*, 1993) (Figura 3). Además, la sobreexpresión de CEA no aparece limitada exclusivamente a los procesos tumorales primarios, sino que como ya se ha mencionado, frecuentemente también lo está en sus correspondientes lesiones metastásicas, donde parece desempeñar un rol activo, como en el desarrollo de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal (Thomas *et al.*, 2011).

En los tejidos tumorales, que han perdido su organización en monocapa y atravesado la lámina basal, CEA se encuentra presente frecuentemente de forma homogénea en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

toda la superficie celular (**Figura 4**) (**Hammarström, 1999; Khare et al., 2001**). Esta localización, opuesta a la presente en el tejido no transformado, expone a CEA al fluido tisular y sanguíneo, posibilitando su marcaje mediante anticuerpos específicos (**Chester et al., 2000**). Además, como consecuencia de esta distribución celular anómala, en los procesos tumorales la liberación de CEA de la membrana celular por la acción de la fosfolipasa C provoca su presencia en el torrente sanguíneo (**Kuroki et al., 1994; Kinugasa et al., 1994**). Así, la monitorización de los niveles séricos de CEA ha sido y es ampliamente utilizada con fines diagnósticos y pronósticos, junto con el seguimiento terapéutico y de recurrencia en pacientes con varios tipos de cáncer, especialmente colorrectales (**Graham et al., 1998; Goldstein Mitchell, 2005; Locker et al., 2006**).

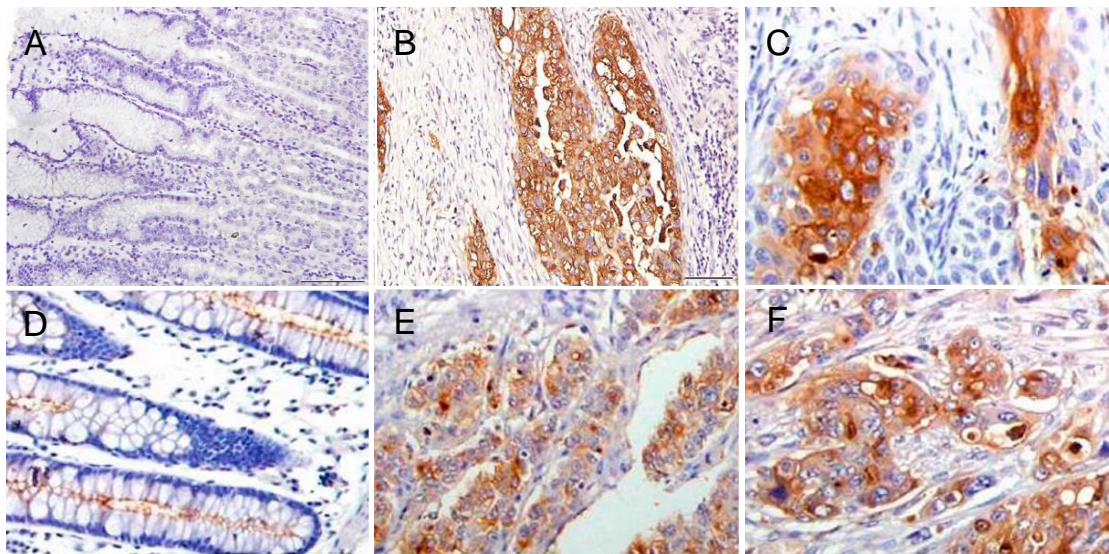


Figura 4. Expresión y distribución de CEA en diferentes tejidos tumorales y no tumorales. Tinción mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal frente a CEA en preparaciones de diferentes tejidos. A) Tejido gástrico normal; B) cáncer gástrico; C) carcinoma de cérvix de célula escamosa; D) tejido de colon; E) adenocarcinoma de colon y F) adenocarcinoma de recto. Adaptado desde **Zhou et al., 2015**.

Además de sus funciones como molécula de adhesión, CEA desempeña un rol significativo en otros procesos que incluyen la inhibición de los programas de diferenciación celular (**Eidelman et al., 1993; Ilantzis et al., 2002**), la inhibición de la muerte celular programada por pérdida de anclaje (*anoikis*), la apoptosis en células epiteliales de colon (**Ordoñez et al., 2000**) o la interrupción de la polarización celular y de la arquitectura tisular (**Ilantzis et al., 2002**). CEA también parece contribuir indirectamente a la progresión tumoral por sus efectos inmunomoduladores, entre los que se incluye la supresión de la actividad de las células dendríticas mediante su unión a las moléculas de adhesión celular específica de célula dendrítica (DC-SIGN), provocando la inducción de la tolerancia sobre las células tumorales (**Engering et al., 2002; Saeland et al., 2012**). Por tanto, considerando su implicación en estos procesos, en conjunto CEA desempeña un papel destacado en la progresión e invasión tumoral, así como en la metástasis (**Thompson et al., 1997; Beauchemin & Arabzadeh, 2013**).

Estas características hacen de CEA una diana terapéutica con un elevado potencial para su utilización en el tratamiento de diferentes cánceres epiteliales. En este sentido, las principales aproximaciones terapéuticas anti-CEA, muchas de las cuales se hayan actualmente en fase de ensayos clínicos, incluyen el uso de anticuerpos monoclonales en estrategias de inmunoterapia pasiva (**Conaghan et al., 2008**) o como parte de diversos inmunoconjugados con radionúclidos (**Kraeber-Bodere et al., 2006**) y fármacos citotóxicos (**Serengulam et al., 2009; Knutson et al., 2016**). También se han desarrollado anticuerpos biespecíficos para la activación de células T (**Bacac et al., 2016**), terapias ADEPT (**Sharma et al., 2005**), proteínas de fusión anticuerpo-interleuquina (**Klein et al., 2017**), así como vacunas frente al antígeno (**Turriziani et al., 2012**) o inmunoterapia con células CAR T (**Katz et al., 2015; Zhang et al., 2017**).

Por último, hay que destacar que aunque pueda considerarse CEA como un antígeno no internado, cuyo destino más frecuente una vez expuesto en la superficie celular es la secreción (**Bryan et al., 2005; Liu et al., 2005; Cai et al., 2007**), existen estudios que describen su internación, así como las características farmacocinéticas de la misma, y el efecto sobre ellas de diversos anticuerpos e inmunoconjugados anti-CEA (**Ford et al., 1996; Stein et al., 1999; Schmidt et al., 2008**). Por tanto, estas observaciones permiten plantear el diseño viable de inmunotoxinas terapéuticas dirigidas frente a CEA y basadas en ribotoxinas, las cuales dado su mecanismo de citotóxico de acción requieren de su internación celular.

1.3.-Anticuerpo MFE23 scFv

MFE23 scFv es un anticuerpo recombinante desarrollado mediante tecnología *phage display* que posee una elevada afinidad y especificidad por el antígeno CEA humano (**Chester et al., 1994**). En la actualidad, se dispone de variantes completamente humanizadas, desarrolladas mediante *resurfacing technique*, entre las cuales, mediante procedimientos de evolución dirigida y *yeast surface display*, se seleccionaron aquellas con propiedades de afinidad y estabilidad en su unión a antígeno optimizadas (**Graff et al., 2004**).

La unión de MFE23 scFv a CEA ha sido analizada estructuralmente, mostrando que el epítipo de unión se encuentra entre los dominios N y A1, y que las cadenas de carbohidratos presentes en la región no constituyen ningún impedimento estérico para la formación del complejo antígeno-anticuerpo. En dicha unión participan activamente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las seis CDR, lo que parece ser responsable de su alta afinidad y bajo ratio de disociación (Figura 5) (Boehm & Perkins, 2000; Boehm *et al.*, 2000).

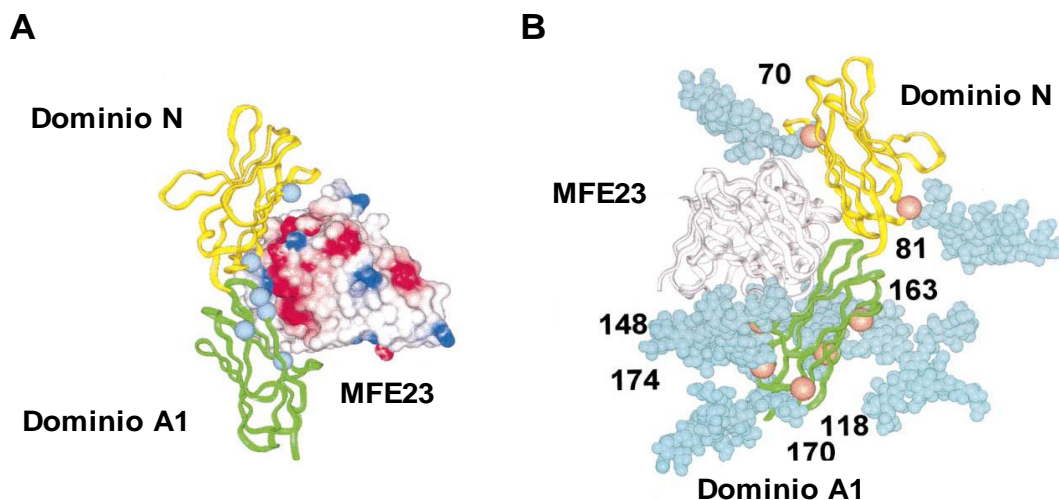


Figura 5. Modelo predictivo del complejo formado por la unión de MFE23 scFv con los dominios N y A1 de CEA. A) Se muestran los carbonos K (esferas azules) de la zona de residuos básicos (Lys 15, Arg 64, Lys 112, Lys 180, Arg 190 y Arg 191) en la interfaz entre el dominio N y el A1 de CEA (representados mediante sendos diagramas de cinta, amarillo y verde respectivamente). Estos residuos básicos son complementarios a la zona de residuos ácidos mostrada en rojo en la superficie electrostática MFE23 scFv. B) Comparación de la disposición de los oligosacáridos en CEA respecto al sitio de unión de MFE23 scFv. El diagrama en cinta de MFE23 scFv (blanco) se muestra unido a los dominios N y A1 de CEA. Imagen adaptada desde Boehm *et al.*, 2000.

En consonancia con estas propiedades, los resultados obtenidos para el marcaje antigénico *in vitro* e *in vivo* fueron excelentes. MFE23 scFv se ha mostrado funcional en ensayos de inmunodetección (Begent *et al.*, 1996) y de cirugía radio-inmunodirigida de tumores de cáncer de colon *in vivo* (Mayer *et al.*, 2000), presentando una rápida penetración y un elevado ratio de localización tumoral respecto al resto de tejidos, incluida la sangre, incluso a tiempos tempranos tras la inyección. Debido a esto, MFE23 scFv se ha utilizado como componente marcador de un gran número de aproximaciones para el diagnóstico tumoral por imagen, presentando un alto potencial de aplicación clínica (Hong *et al.*, 2008; Boonstra *et al.*, 2015, Ríos *et al.*, 2019).

Asimismo, MFE23 scFv ha sido utilizado en múltiples estrategias terapéuticas y ensayos clínicos dirigidos frente a CEA, entre los que se incluyen: conjugados fármaco-anticuerpo (Hull, 2014), radioinmunoterapia dirigida (El Emir *et al.*, 2007), terapia combinada con citoquinas (inmunocitoquinas) (Cooke *et al.*, 2002), anticuerpos biespecíficos atrayentes de células T (BITEs) (Compte *et al.*, 2014), terapia con células T modificadas genéticamente *ex vivo*, incluyendo el MFE23 scFv fusionado a la cadena CD3z del receptor de célula T (Sheen *et al.*, 2003) y terapia profármaco-enzima dirigida por anticuerpos (ADEPT) (Francis *et al.*, 2004, Mayer *et al.*, 2006).

Otro factor a favor de la utilización de MFE23 scFv es la facilidad y plasticidad de su producción, permitiendo su potencial incorporación a diversos formatos de anticuerpo recombinante multimérico como los *diabodies*, scFv en tándem (dscFv-sc), *minibodies*, *tribodies* y *trimerbodies*, habiendo sido expresadas satisfactoriamente en *E. coli* (Mayer *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2002), *P. pastoris* (Blanco-Toribio *et al.*, 2015) y células de mamífero HEK 293 (Cuesta *et al.*, 2010).

En conjunto, estas características convierten a MFE23 scFv en una herramienta biotecnológica con gran potencial para el diagnóstico, localización por imagen y tratamiento de tumores de origen epitelial que presenten una sobreexpresión y pérdida de la localización en la expresión de CEA, y por tanto, justifican el diseño y desarrollo de inmunotoxinas antitumorales incorporándolo.

1.4.-Anticuerpo de dominio único VHHCEA5v2

VHHCEA5v2 es un anticuerpo de dominio único recombinante formado por las CDRs del *nanobody* NbCEA5 introducidas mediante *grafting* genético en el armazón estructural de un *nanobody* completamente humanizado (Vaneycken *et al.*, 2010); de modo que VHHCEA5v2 combina la alta especificidad y unión a CEA del NbCEA5 con la nula inmunogenicidad propia del armazón humanizado.

El anticuerpo VHHCEA5v2, incluyendo una extensión de histidinas en posición C-terminal, fue producido en *E. coli* y purificado mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni²⁺-NTA. En lo descrito, este anticuerpo reconoce y une con alta afinidad y especificidad a CEA, tanto inmovilizado en placa como expresado en superficie celular, con una constante de equilibrio de disociación de 9,88 nM (Vaneycken *et al.*, 2010). Además, la administración sistémica del anticuerpo marcado con el isótopo radioactivo ^{99m}Tc ha mostrado un rápido y eficaz marcaje tumoral de *xenografts* CEA-positivos en ratones *nude*. Aspecto que, combinado con una rápida eliminación del torrente sanguíneo, como corresponde a una proteína de su tamaño, resultó en un elevado ratio de localización tumor/músculo (Vaneycken *et al.*, 2010).

Por tanto, teniendo en cuenta las buenas propiedades de los VHHs para el marcaje tumoral *in vivo* y para su utilización como dominios marcadores de moléculas con otras actividades, el anticuerpo humanizado VHHCEA5v2 parece una opción satisfactoria para su utilización como parte de inmunotoxinas dirigidas contra tumores que sobreexpresan de manera selectiva CEA en su superficie celular.

1.5.-Formato de anticuerpo *trimerbody*

El formato de anticuerpo *trimerbody* es una nueva clase de anticuerpo multivalente formado por la unión, mediante un *linker* de 21 residuos, de un anticuerpo scFv al extremo amino y/o carboxilo de la región de trimerización del dominio no colagenoso (NC1) del colágeno XVIII humano (Figura 6) (Sánchez-Arévalo *et al.*, 2006; Cuesta *et al.*, 2010; Blanco-Toribio *et al.*, 2013).

En estos diseños, la utilización del dominio no colagenoso (NC1) N-terminal del colágeno XVIII humano, caracterizado por una tendencia a formar una estructura trimérica a una concentración picomolar (Boudko *et al.*, 2009), dota al formato *trimerbody* de una conformación trimérica en disolución, generando anticuerpos trivalentes funcionales, con una alta afinidad por el antígeno, muy solubles y con elevada estabilidad sérica y tisular (Cuesta *et al.*, 2010). Además, el empleo del dominio de homotrimerización N-terminal del colágeno XVIII humano para el desarrollo de anticuerpos recombinantes, confiere ciertas ventajas añadidas respecto al uso otros dominios de multimerización, como son su nula inmunogenicidad, dado su origen humano; su pequeño tamaño y su compatibilidad con el desarrollo de diseños moleculares muy sencillos (Cuesta *et al.*, 2010).

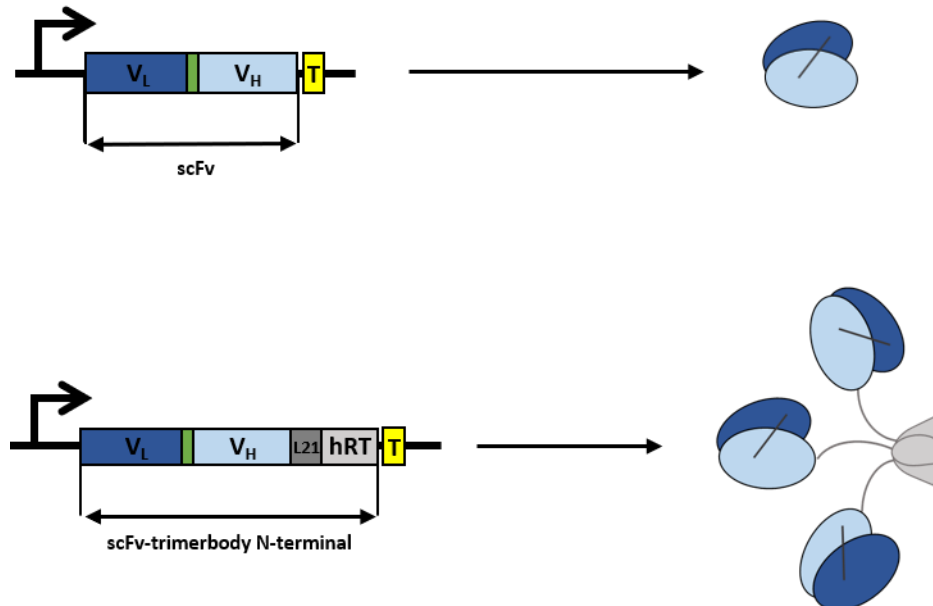


Figura 6. Diagramas esquemáticos mostrando la estructura génica (izquierda) y de dominios (derecha) de un scFv (arriba) y un scFv-*trimerbody* N-terminal (abajo). Los componentes genéticos de ambas anticuerpos recombinantes se indican del siguiente modo: scFv (V_L, azul oscuro, y V_H, azul claro), linker L21 (gris oscuro); hRT (región de trimerización del dominio NC1 XVIII, gris claro) y extensión de histidinas (T, amarillo). Los tamaños en disolución para las dos moléculas son 25 kDa para el scFv y 110 kDa para el scFv-*trimerbody* N-terminal.

Las diferentes construcciones desarrolladas con este formato incluyen *trimerbodies* trivalentes monoespecíficos, en los que la región de trimerización puede ubicarse en

posición N-terminal o C-terminal de los scFv (*trimerbody* N-terminal y C-terminal, 110 kDa), y variantes de *trimerbodies* hexavalentes mono-específicos o biespecíficos, en las que los dominios de unión a antígeno se sitúan en ambos extremos de la región de trimerización (190 kDa) (**Blanco-Toribio et al., 2013**). Otras variantes de *trimerbodies* incluyen la utilización de la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XV humano (**Cuesta et al., 2012**), el uso de *linkers* más cortos, la trimerización de otros fragmentos derivados de anticuerpo, como el formato monodominio VHH (*VHH-trimerbody*) y la generación de variantes multiespecíficas mediante trimerización intracatenaria (**Álvarez-Cienfuegos et al., 2016**).

La máxima avididad de los anticuerpos multivalentes implica que todos los sitios de unión al antígeno deben estar ocupados simultáneamente. En el caso de los formatos *trimerbody* N-terminal, el análisis de sus modelos moleculares sugiere una estructura de trípode con los dominios scFv orientados hacia el exterior, en la que los *linkers* de 21 residuos permiten numerosas geometrías de unión al antígeno con un área de acción de unos 80 Å. Así, cuando una interacción anticuerpo-antígeno ocurre, la probabilidad de establecer una segunda interacción efectiva por los scFv libres, bien sobre la misma célula o sobre células adyacentes, es unas 11 veces mayor para los *trimerbodies* que para formatos bivalentes, como los *diabodies* o los *minibodies* (**Figura 7**). Este modelo, consistente con una unión multivalente al antígeno, se corresponde con los resultados obtenidos con diferentes *trimerbodies*, mostrando una capacidad superior de unión a antígeno, una mayor afinidad funcional y una menor tasa de disociación respecto a sus equivalentes monoméricos (**Sánchez-Arévalo Lobo et al., 2006; Cuesta et al., 2009, Rios et al., 2019**).

Como se explicó anteriormente, la multimerización de fragmentos de anticuerpo monovalentes es un procedimiento que se utiliza de forma habitual para incrementar su afinidad funcional por el antígeno (avididad), disminuir su constante de disociación sobre receptores de superficie celular y mejorar su biodistribución de cara a su potencial aplicación *in vivo*. Entre los diferentes formatos de anticuerpo recombinantes (**Figura 3 de la Introducción**), aquellos con propiedades óptimas para el marcaje tumoral serían de tamaño intermedio, multivalentes (bivalentes o trivalentes) y carentes de región Fc (**Cuesta et al., 2010**); características que los *trimerbodies* cumplen en su totalidad, dotándoles de una rápida penetración tumoral, una alta retención en el tumor y una rápida eliminación del torrente sanguíneo tras su aplicación sistémica (**Schmidt & Wittrup, 2009; Cuesta et al., 2010**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

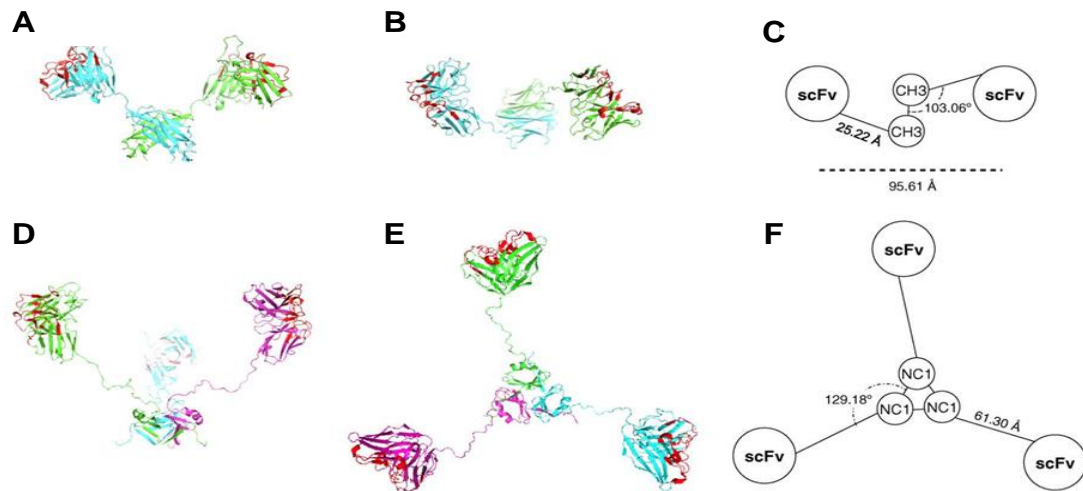


Figura 7. Modelo estructural de un minibody y de un trimerbody: vista lateral (A) y superior (B) de un minibody; vista lateral (D) y superior (E) de un scFv-trimerbody N-terminal. Superposición de los monómeros de minibody y de trimerbody utilizando el programa Stamp para generar el modelo multimérico (Russell y Barton, 1992). Cada uno de los monómeros se coloreo de manera diferente (azul, verde y rosa) y los CDRs se colorearon en rojo. Las representaciones esquemáticas del minibody (C) y del trimerbody (F) muestran las diferencias en la distribución de los dominios de unión al antígeno. Adaptado de Cuesta *et al.*, 2010.

Además, diferentes estudios *in vivo* confirman las excelentes propiedades de los *trimerbodies* para el marcaje tumoral. Por una parte, experimentos utilizando el *trimerbody* N-terminal basado en MFE23 scFv (MFE23 *trimerbody*) y en L36 scFv (anti-laminina), marcados con la sonda fluorescente derivada de cianina Cy5, han mostrado un rápido y específico marcaje dependiente de antígeno en ratones *nude* portando *xenografts* de tumores humanos, siempre superior al de sus análogos monoméricos (Cuesta *et al.*, 2009). Otro estudio, también en ratones *nude*, mostrando la localización mediante inmuno-tomografía de emisión de positrones (PET) del mismo MFE23 *trimerbody* marcado con ^{125}I , demostró una acumulación tumoral y unos ratios tumor/músculo y tumor/sangre superiores respecto a MFE23 scFv monomérico (Ríos *et al.*, 2019). Estos datos demuestran que el tamaño intermedio, superior al límite de filtración glomerular (70 kDa), y la avidéz superior del *trimerbody* son importantes para una mejor biodistribución sistémica, con una eliminación del torrente sanguíneo más lenta, y un marcaje tumoral CEA-específico superior y más duradero, respecto a los exhibidos por el MFE23 scFv monomérico.

Además de estos *trimerbodies* enfocados al marcaje tumoral, se ha desarrollado un diseño terapéutico biespecífico y hexavalente, con un tamaño en disolución de 150 kDa, que incluye tres dominios scFv anti-4-1BB y tres VHH anti-EGFR sobre la estructura del dominio de homotrimerización NC1 del colágeno XVIII. Este *trimerbody*, denominado 1D8N/CEGa, mostró una rápida acumulación sobre tumores EGFR-positivos y, dirigiendo de manera específica la capacidad coestimuladora inmunitaria de ratones

Balb/C, provocó una respuesta antitumoral similar a los anticuerpos monoclonales basados en IgG agonistas de 4-1BB (**Compte et al., 2018**).

Por último, es importante mencionar que la producción de anticuerpos funcionalmente activos con formato *scFv-trimerbody* N-terminal ha sido llevada a cabo eficazmente y con altos rendimientos tanto en células de mamífero (**Cuesta et al., 2009**), como en la levadura *P. pastoris* (**Blanco-Toribio et al., 2014**).

En conjunto, estos resultados demuestran que la plataforma *trimerbody* es una herramienta sencilla y eficaz para la generación de anticuerpos recombinantes de pequeño tamaño excelentes para el marcaje tumoral, así como para la localización selectiva de moléculas bioactivas en el tejido tumoral. Entre sus potenciales aplicaciones terapéuticas, formando parte de proteínas de fusión, se incluyen el desarrollo de proteínas de fusión incorporando inhibidores de la angiogénesis (**Sanchez-Arévalo Lobo et al., 2006**), citoquinas o enzimas, así como su conjugación con radionúclidos (**Sanz et al., 2004; Ríos et al., 2019**). De este modo, la disponibilidad de estos anticuerpos recombinantes artificiales permite plantear la aplicación del formato *trimerbody* como modelo para el desarrollo de inmunotoxinas multivalentes, óptimas para el marcaje tumoral y con una alta estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.-Resultados

2.1.-IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S

En este primer apartado del Bloque I se presentan los resultados en relación con el diseño, producción y caracterización estructural y funcional de dos nuevas inmunotoxinas dirigidas al antígeno CEA. Ambas inmunotoxinas están formadas por los dominios variables en cadena única MFE23 scFv como dominio marcador y por α -sarcina como dominio tóxico. Una de ellas sigue el diseño de nuestras inmunotoxinas anti-GPA33 monoméricas, monovalentes y monotóxicas; mientras que la otra es una inmunotoxina trimérica, trivalente y con tres toxinas por molécula, basada en el formato *trimerbody*, (**Figura 8**).

1. **IMTXCEA α S**: inmunotoxina monomérica compuesta por MFE23 scFv unido mediante un péptido flexible Gly-Gly-Arg a la ribotoxina α -sarcina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. **IMTXRICEA α S**: inmunotoxina trimérica compuesta por tres monómeros monocatenarios, cada uno de ellos constituidos por MFE23 scFv, unido mediante el *linker* L21 al dominio de trimerización hNC1 del colágeno XVIII y mediante otro *linker* L21 a α -sarcina.

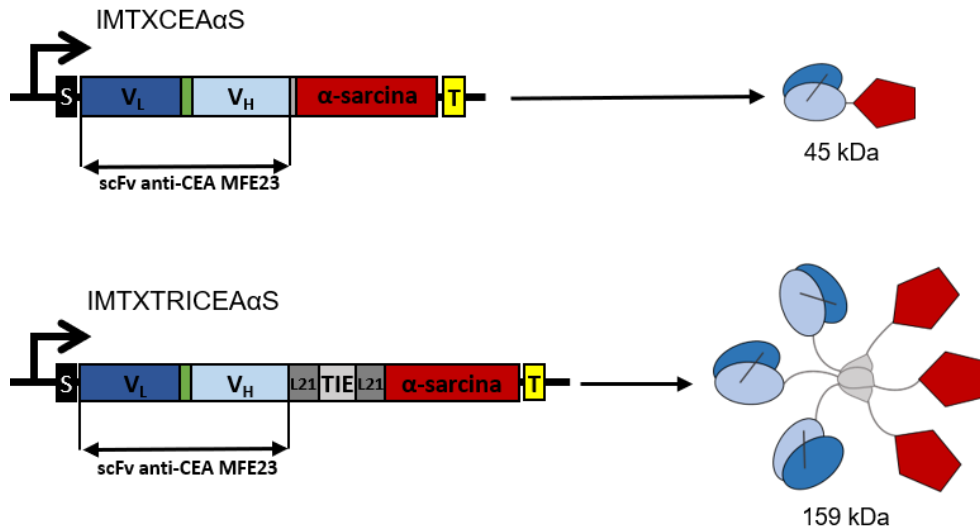


Figura 8. Diagramas mostrando la disposición genética y los dominios proteicos de las inmunotoxinas IMTXCEA α S e IMTXRICEA α S. Los cDNA de las construcciones diseñadas se muestran en la parte izquierda de la imagen. En el lado derecho se muestra una presentación esquemática de la conformación de las dos proteínas. En ambos casos (cDNA y proteína) los dominios estructurales se indican del siguiente modo: péptido señal para la secreción factor- α (S, negro), scFvCEA (VL, azul oscuro, y VH, azul claro), linkers L21 (gris oscuro), TIE (dominio de trimerización NC1 del colágeno XVIII humano, gris claro), α -sarcina (rojo), y extensión de histidinas (T, amarillo). Dada su conformación trimérica, IMTXRICEA α S nativa dispondría de un tamaño teórico de 159 kDa, mientras que para la monomérica IMTXCEA α S el valor esperado sería 45 kDa.

2.1.1.-Diseño y obtención de plásmidos de expresión

La obtención de los plásmidos de expresión para IMTXCEA α S e IMTXRICEA α S se realizó desde los vectores pPICZ α AIMTXA33 α S (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012) y pCR3.1-MFE23 scFv-L21-TIE^{XVIII}-L21-OKT3.

Para la construcción del vector pPICZ α AIMTXCEA α S, se realizó una amplificación mediante PCR de la secuencia codificante de MFE23 scFv—desde el vector pCR3.1-scFvMFE23-L18-TIE^{XVIII}-L21-OKT3 utilizando los oligonucleótidos 1 y 2, añadiendo en sus extremos los sitios de restricción *EcoRI* (5') y *NotI* (3'). Tras ello, el producto de dicha amplificación (750 pb) y el vector pPICZ α AIMTXA33 α S se digirieron con las endonucleasas *EcoRI* y *NotI*. El fragmento grande de dicha digestión del plásmido se purificó, insertándose el cDNA del MFE23 scFv en el lugar correspondiente al scFvA33 (fragmento pequeño digestión *EcoRI/NotI* de pPICZ α AIMTXA33 α S). Para su amplificación, el producto de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α F' para su amplificación, y tras comprobarse la correcta identidad de su secuencia, se digirieron

10 µg de plásmido con la enzima *PmeI* para su linealización y electroporación en células de *P. pastoris* KM71.

El vector pPICZαAIMTXTRICEAαS se obtuvo, de manera análoga a su equivalente para la inmunotoxina monomérica, mediante la sustitución del cDNA codificante de scFvA33 por el de MFE23-L21-TIE^{XVIII}-L21. Primero, se amplificó la secuencia L21-TIE^{XVIII}-L21 (oligonucleótidos 3 y 4), eliminando un sitio de restricción *EcoRI* en posición 5' del L21 N-terminal. Tras reemplazarse esta secuencia en el plásmido pCR3.1-scFvMFE23-L21-TIE^{XVIII}-L21-OKT3, se amplificó el fragmento scFvMFE23-L21(NoEcoRI)-TIE^{XVIII}-L21 (oligonucleótidos 1 y 326) añadiendo en sus extremos los sitios de restricción *EcoRI* (5') y *NotI* (3'). El producto de esta amplificación (900 pb) se digirió con *EcoRI* y *NotI*, insertándose posteriormente en el fragmento grande del vector pPICZαAIMTXA33αS digerido *EcoRI* / *NotI* (ya utilizado para la construcción del pPICZαAIMTXCEAαS). La mezcla de ligación se transformó en células *E. coli* DH5αF' para la selección de clones individuales y su amplificación. Por último, el plásmido linealizado fue electroporado en células *P. pastoris* KM71 y BG11.

2.1.2.-Producción y purificación de las inmunotoxinas

Debido a la alta similitud en estructura y diseño con IMTXA33αS, las pruebas de expresión en *P. pastoris* de las dos nuevas inmunotoxinas, IMTXCEAαS e IMTXTRICEAαS, se realizaron en condiciones similares a las ya descritas para la producción de dicha inmunotoxina (**Carreras-Sangrà et al., 2012**).

En primer lugar, con el fin de seleccionar colonias con altos niveles de producción, se realizaron expresiones piloto con diferentes transformantes crecidos en placas de zeocina 100, 400 y 750 µg/ml. En estas pruebas de expresión, tras 24 h de crecimiento en medio BMGY, los cultivos se indujeron durante 72 h en medio BMMY, suplementando con metanol cada 24 h a una concentración final de 0,5% (v/v). El análisis de los medios de inducción, mediante PAGE-SDS, mostró para ambas construcciones: a) una alta homogeneidad en la cantidad de proteína producida entre las diferentes colonias y b) un máximo de proteína secretada a las 48 h de inducción.

Tras seleccionarse aquellas colonias con mayor secreción de proteína al medio extracelular, los cultivos para la producción a gran escala de IMTXCEAαS e IMTXTRICEAαS se realizaron de acuerdo a lo descrito en el protocolo para la producción de inmunotoxinas (Ver apartado: Métodos. Metodología para la purificación y caracterización estructural de proteínas. Producción de proteínas recombinantes).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras 48 h de inducción en medio BMMY a 25°C, el medio extracelular libre de células se dializó, utilizando bolsas de tamaño de poro de 25 kDa, frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5 y se aplicó en una columna de Ni²⁺-NTA agarosa para la purificación de las construcciones mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado. El análisis electroforético de las distintas fracciones de la cromatografía, mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras, mostró la presencia de grandes cantidades de ambas inmunotoxinas en las fracciones de elución con tampón fosfato suplementado con imidazol 250 mM (**Figura 9 A**). Posteriormente, las fracciones conteniendo proteína se homogeneizaron y dializaron frente a tampón de diálisis para la eliminación del imidazol.

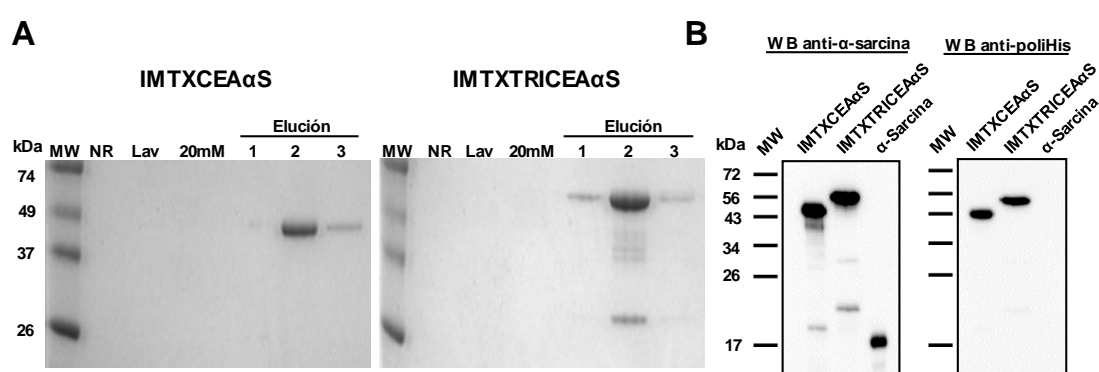


Figura 9. PAGE-SDS y Western blot de ambas inmunotoxinas purificadas. A) Tinción con azul de Coomassie del PAGE-SDS de las distintas fracciones recogidas durante la purificación mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA de ambas inmunotoxinas. Se muestran: NR, no retenido; Lav, fracción de lavado con tampón de cromatografía; 20 mM, fracción de lavado con tampón de cromatografía conteniendo imidazol 20 mM; y las primeras cuatro fracciones (1 ml) eluídas con imidazol 250 mM. B) Análisis mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo policlonal frente a la α -sarcina (izquierda) o un anticuerpo monoclonal frente a la extensión de histidinas (derecha). El control de α -sarcina corresponde con 0,1 μ g de la proteína fúngica natural.

De este modo, IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S se purificaron a homogeneidad, de acuerdo a criterios de movilidad electroforética y de inmunodetección mediante *Western blot* con anticuerpos anti- α -sarcina y anti-poliHis (**Figura 9 B**). El rendimiento de la producción se situó en ambos casos en torno a 1 mg/l de medio de inducción. Los coeficientes de extinción molar teóricos a 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}}$) utilizados para los cálculos de concentración de ambas inmunotoxinas fueron 77.952 M⁻¹·cm⁻¹ para IMTXCEA α S y 89.270 M⁻¹·cm⁻¹ para IMTXTRICEA α S.

2.1.3.-Caracterización estructural

La funcionalidad de una proteína viene determinada por su estructura, de modo que su secuencia de aminoácidos y su correcto plegamiento son determinantes para el buen desarrollo de su actividad funcional. De este modo, la caracterización estructural de ambas inmunotoxinas se realizó con el objetivo de obtener información acerca de la

identidad de sus componentes y su estructura primaria, así como del plegamiento y la conformación en disolución que presentan IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S. La inmunodetección mediante *Western blot* confirmó la identidad de las proteínas purificadas, siendo ambas inmunotoxinas reconocidas específicamente por un antisuero anti- α -sarcina y un anticuerpo monoclonal anti-poliHis (**Figura 9 B**).

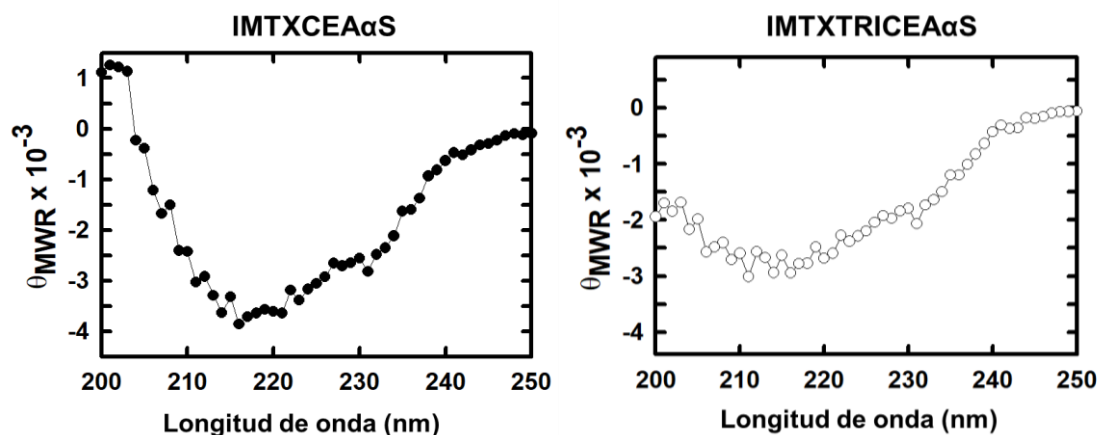


Figura 10. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de ambas inmunotoxinas. Espectros en el UV-lejano de IMTXCEA α S y IMTXTRICEA α S (θ_{MRW} , elipticidad molar por residuo, expresada como: grado \cdot cm 2 \cdot dmol $^{-1}$). Ambos espectros se realizaron en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4 con una concentración de proteína de 0,15 mg/ml.

El espectro de CD en el UV-lejano aporta información acerca de la estructura secundaria de una proteína, pudiéndose inferir a partir de él si la proteína presenta un plegamiento marcado por estructuras secundarias periódicas, así como la composición relativa de los distintos elementos de este plegamiento (hélice α y lámina β) (**Greenfield, 2006**).

Los registros de CD para ambas inmunotoxinas, mostrados en la **Figura 10**, sugieren un plegamiento globular marcado por una elevada contribución de lámina β , que concuerda con las estructuras secundarias y los espectros de CD, previamente descritos, para los dominios scFv (**Ong et al., 2012; Song et al., 2014**) y α -sarcina (**Martínez del Pozo et al., 1988; García-Ortega et al., 2002**). La diferencia de registro encontrada entre la forma monomérica y trimérica, menor elipticidad molar por residuo en el rango de 200-210 nm, aunque no descrita para el *trimerbody* MFE23 scFv-TRI N-terminal (**Blanco-Toribio et al., 2014**) podría explicarse en base a la elipticidad molar descrita para las estructuras no periódicas, como las que forman los *linkers* L21 (**Blanco-Torio et al., 2013**), y para la conformación nativa del dominio de trimerización no colagenoso N-terminal (hNC1) del colágeno XVIII humano (**Boudko et al., 2009**).

El estado oligomérico de IMTXTRICEA α S en disolución se estudió mediante cromatografía de penetrabilidad FPLC y espectroscopia de difracción láser. Mediante estas dos metodologías se comprobó si la inmunotoxina en disolución presentaba la conformación trimérica correspondiente a su formato *trimerbody*. El perfil cromatográfico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mediante FPLC utilizando una columna Superdex 200 10/300 GL mostró un único pico simétrico de elución a los 11,5 ml, correspondiente a un tamaño globular de 160 kDa (**Figura 11 A**). Respectivamente, el volumen de elución para la inmunotoxina monomérica se correspondió con un tamaño de 50 kDa. Abundando en estos resultados, los espectros de difracción láser para IMTXTRICEA α S sugirieron una estructura globular con un diámetro de 9-10 nm (**Figura 11 B**). Un tamaño en concordancia con el tamaño teórico predicho para la inmunotoxina trimérica en disolución, en relación con el tamaño descrito para los *trimerbodies* hexavalentes (**Blanco-Toribio et al., 2013**).

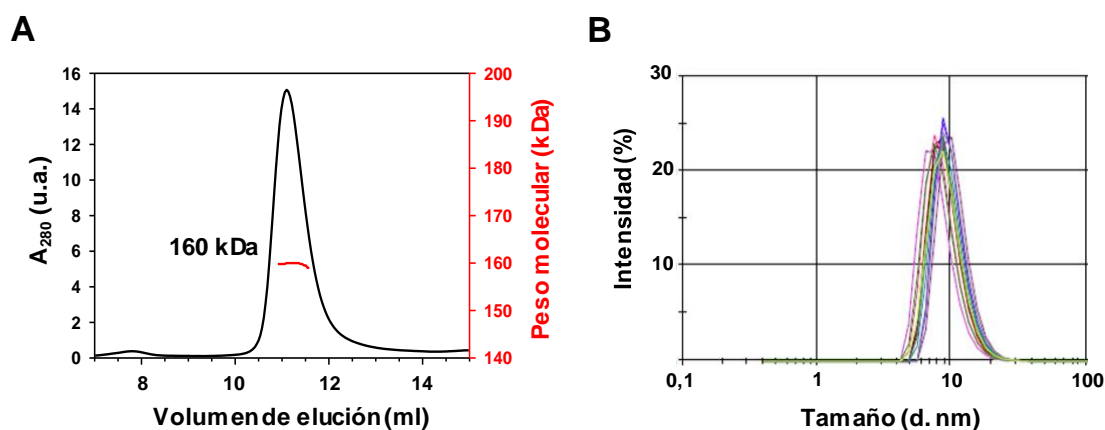


Figura 11. Análisis del estado oligomérico de IMTXTRICEA α S. A) Análisis cromatográfico de FPLC utilizando una columna Superdex 200 10/300 GL. La proteína mostró un único pico simétrico de elución a los 11,3 ml. B) Los espectros de dispersión de láser indican una estructura globular con un tamaño hidrodinámico en torno a los 10 nm. Múltiples espectros se registraron utilizando muestras filtradas y con dos concentraciones diferentes (0,15 o 0,3 mg/ml) en tampón fosfato sódico.

Así, los resultados de su caracterización estructural indican que ambas inmunotoxinas basadas en MFE23 scFv y α -sarcina presentan un plegamiento globular en disolución acorde a la estructura secundaria nativa de sus componentes. Por su parte, como muestran los tamaños moleculares registrados para IMTXTRICEA α S, la presencia del dominio hNC1 del colágeno XVIII en su secuencia, otorga a esta construcción una conformación trimérica en disolución y, por tanto, la trivalencia y la triple carga tóxica predichas.

2.1.4.-Caracterización funcional

Para cumplir correctamente con la actividad funcional para la que han sido desarrolladas, provocar muerte celular de manera antígeno dependiente, las inmunotoxinas deben combinar en una misma molécula las actividades específicas de los dominios marcador y tóxico. Mediante una primera caracterización funcional *in vitro*, se analizó en qué medida MFE23 scFv, como dominio marcador, y α -sarcina, dominio tóxico, preservaban sus actividades específicas formando parte de IMTXCEA α S e

IMTXTRICEA α S,. Además, como preámbulo a los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, se evaluó la estabilidad estructural y funcional de ambas inmunotoxinas tras su exposición a condiciones similares a las de entorno fisiológico. Por último, la actividad citotóxica de las construcciones se analizó en células CEA-positivas y CEA-negativas.

En línea con lo descrito en los objetivos de este bloque, la caracterización funcional de estas dos inmunotoxinas se centró particularmente en el estudio del efecto de la trimerización sobre las actividades de ambas construcciones. Es decir, cómo la trivalencia y la triple carga tóxica de IMTXTRICEA α S afecta a su capacidad de unión a CEA y a su efecto citotóxico en comparación con IMTXCEA α S. Con este fin, para evaluar específicamente el efecto de la trimerización de sus componentes sobre la funcionalidad de las moléculas completas, todos los ensayos se realizaron utilizando cantidades equimolares de los monómeros monocatenarios de ambas construcciones,.

2.1.4.1.-Caracterización de la unión a antígeno

Mediante el reconocimiento y la unión de alta afinidad a CEA, MFE23 scFv es el encargado de dirigir de forma específica la actividad de la inmunotoxina frente a sus células diana. Con este fin, se estudió la especificidad y la capacidad de unión de ambas inmunotoxinas a CEA, comparando sus actividades con las desarrolladas por sus correspondientes dominios marcadores parentales.

Los ensayos de citometría de flujo mostraron que ambas inmunotoxinas mantienen la actividad de unión específica a CEA propia de MFE23 scFv, marcando específicamente aquellas células CEA-positivas (HeLa-CEA, SW1222, LIM1214) (resultados únicamente mostrados para las células SW1222) pero no las CEA-negativas (HeLa) (**Figura 12 A**). Además, tal y como se muestra en la **Figura 12 B**, la unión a CEA en superficie celular exhibida por IMTXTRICEA α S fue superior a la de su análogo monomérico.

Los resultados de los ensayos de ELISA, comparando la unión a CEA de los anticuerpos parentales, MFE23 scFv y MFE23 scFv-TRI, y de las inmunotoxinas monomérica y trimérica, mostraron que ambas inmunotoxinas unen CEA de manera semejante a sus anticuerpos parentales (**Figura 12 C**). Además, en concordancia con lo mostrado mediante citometría de flujo, la unión a CEA inmovilizado fue superior para ambas construcciones trivalentes respecto a sus equivalentes monoméricos.

De manera complementaria a los ensayos de citometría de flujo, la unión de las inmunotoxinas a CEA presente en superficie celular se estudió mediante

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

inmunofluorescencia y microscopía confocal (**Figura 13**). Tras tratar cultivos adherentes de células SW1222 con IMTXCEA α S-Alexa 488 o IMTXTRICEA α S-Alexa 488 durante diferentes tiempos, las células fueron lavadas, fijadas y marcadas, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Las preparaciones correspondientes a 20 min de incubación, mostraron un fuerte marcaje de la membrana celular por ambas construcciones, con ausencia o muy baja presencia de estas en el interior celular. Además, esta localización en la membrana plasmática a los 20 min se evidenció por un alto solapamiento con el marcador de membrana CD44. Por otro lado, las preparaciones de inmunofluorescencia correspondientes a las incubaciones de 1 y 4 h permitieron confirmar que ambas inmunotoxinas, una vez unidas a CEA en la membrana plasmática, sufren una internación tiempo-dependiente, presentando una mayor localización intracelular a medida que aumenta el tiempo de incubación.

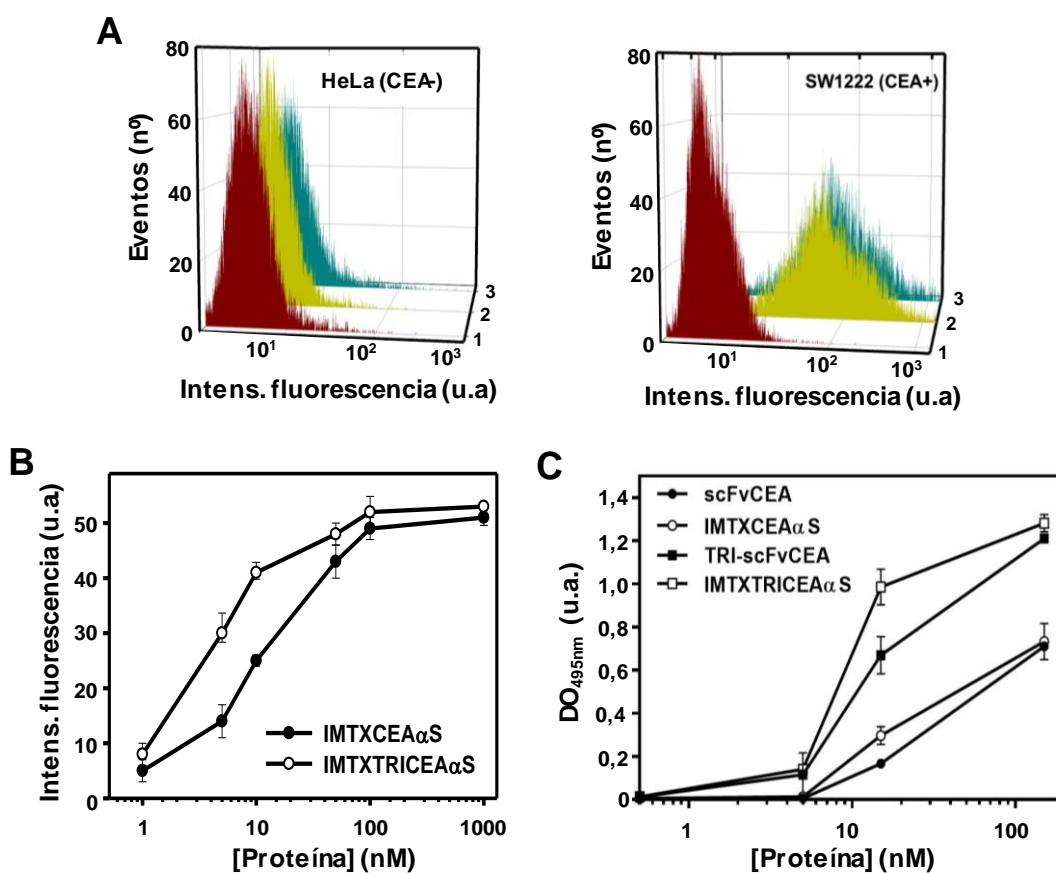


Figura 12. Ensayos de unión para la caracterización funcional *in vitro* del dominio marcador. A) Ensayo de unión analizada mediante citometría de flujo tras incubación de las diferentes construcciones con células HeLa (CEA-negativas, CEA -), y SW1222 (CEA-positivas, CEA +). Las curvas corresponden a las células incubadas únicamente con el anticuerpo de detección anti-poliHis-Alexa 488 (1), e incubadas previamente con cantidades crecientes IMTXCEA α S (2) o IMTXTRICEA α S (3) y el anticuerpo de detección. La intensidad de fluorescencia registrada se muestra proporcionalmente en unidades arbitrarias. B) Titulación de la unión a antígeno para diferentes concentraciones de IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S realizadas por citometría de flujo utilizando células SW1222. C) ELISA frente a CEA inmobilizado (0,25 μ g/pocillo). Se utilizaron diluciones seriadas de ambas inmunotoxinas, incluyéndose como control las versiones monomérica y trimérica del anticuerpo MFE23 scFv. Todos los ensayos fueron realizados a cantidades equimolares para los dominios de unión entre las diferentes construcciones. B) y C) muestran la media \pm desviación estándar de duplicados independientes.

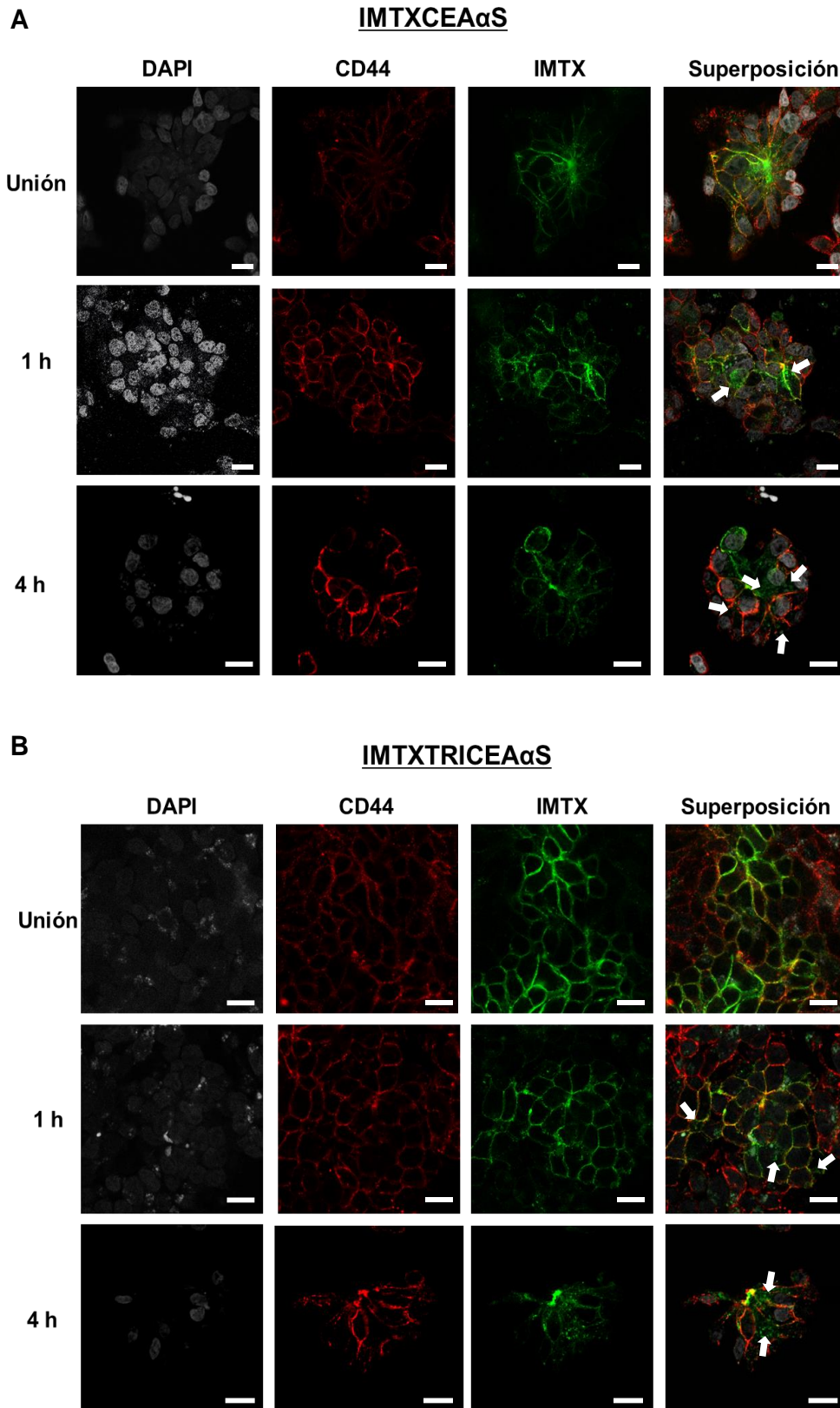


Figura 13. Microscopía de fluorescencia con células SW1222. Imágenes de microscopía confocal mostrando la localización celular de las inmunotoxinas IMTXCEA α S (panel superior) e IMTXTRICEA α S (panel inferior) a diferentes tiempos de incubación (filas). Las diferentes columnas muestran de izquierda a derecha: DAPI (núcleos), CD44 (membrana celular), inmunotoxina-Alexa 555 y la superposición de los diferentes canales. Las flechas blancas muestran la inmunotoxina internada. Las barras blancas de los distintos paneles se corresponden a 10 μ m.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados, junto a los mostrados por citometría de flujo, confirmaron la unión de IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S a CEA anclado en la membrana celular. Además, en línea con lo descrito para diversos anticuerpos y conjugados terapéuticos anti-CEA (Tsaltas *et al*, 1992; Schmidt *et al* 2008; Knutson *et al*, 2016), demostraron que poco tiempo después de la formación del complejo antígeno-anticuerpo en la superficie celular, ambas inmunotoxinas sufrieron una captura al interior celular, fundamental para el desarrollo del efecto citotóxico de α -sarcina.

2.1.4.2.-Caracterización de la actividad ribonucleolítica

La funcionalidad de α -sarcina como componente del dominio tóxico de las inmunotoxinas basadas en el MFE23 scFv se analizó mediante el ensayo de reticulocitos. Como se ha descrito en el apartado de Métodos, este ensayo es utilizado rutinariamente para caracterizar la actividad ribonucleolítica de las ribotoxinas frente a ribosomas de mamífero.

Como se muestra en la **Figura 14**, al ser ensayadas frente a los ribosomas de un lisado de reticulocitos, las dos inmunotoxinas produjeron una liberación del factor α semejante a la causada por la α -sarcina *wt*. Este resultado confirmó que la inclusión de α -sarcina en posición C-terminal en nuestras inmunotoxinas, flanqueada por el *linker* Gly-Gly-Arg o L21 y la extensión de histidinas, no interfiere con su capacidad para hidrolizar el SRL ribosómico (Carreras-Sangrà *et al*, 2012).

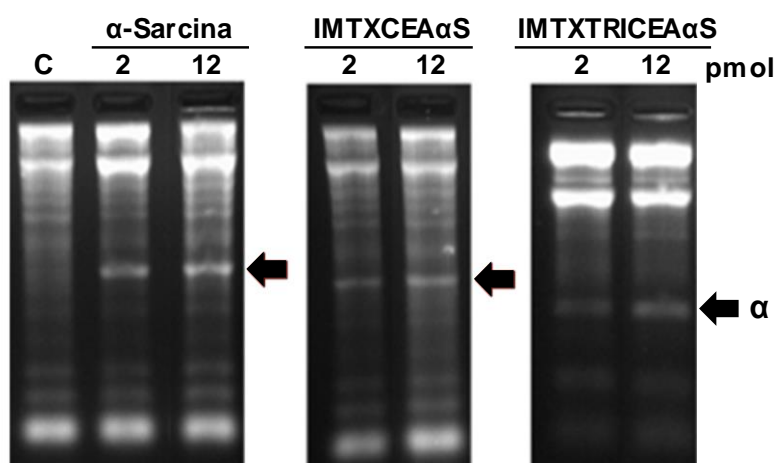


Figura 14. Ensayo de reticulocitos mostrando la actividad ribonucleolítica de las inmunotoxinas y de la α -sarcina. Los gels de agarosa muestran la liberación del fragmento- α , marcado por una flecha negra. Este fragmento de 400 nt es producto inequívoco de la hidrólisis específica del SRL. Todos los ensayos se realizaron utilizando cantidades equimolares (2 y 12 pmol) de α -sarcina *wt* y de ambas inmunotoxinas. C, control negativo sin actividad ribonucleolítica.

2.1.4.3.-Ensayos de estabilidad *in vitro*

La integridad estructural y el mantenimiento de la funcionalidad de las inmunotoxinas en las condiciones del entorno fisiológico es fundamental tanto para el correcto desarrollo de su actividad citotóxica *in vitro*, como para el desempeño de su actividad antitumoral *in vivo*. Por este motivo, como paso previo a los ensayos de citotoxicidad celular y de inhibición del crecimiento tumoral, se analizó el efecto de la incubación de las inmunotoxinas en FBS a 37°C sobre las actividades de sus dominios funcionales (Ver apartado: Métodos. Metodología para el estudio de la estabilidad en condiciones fisiológicas de las inmunotoxinas).

El análisis electroforético por PAGE-SDS y la posterior inmunodetección de las construcciones mostró una elevada preservación de la integridad molecular para ambas inmunotoxinas, que únicamente sufrieron una leve degradación a partir de las 72 h de incubación (**Figura 15 A**). De manera semejante, la actividad ribonucleolítica de ambas construcciones se mantuvo prácticamente intacta para los diferentes tiempos de incubación analizados (**Figura 15 B**). En cuanto a los ensayos de unión, de una manera similar a lo descrito para MFE23 scFv y MFE23 scFv-TRI (**Cuesta et al, 2009; Blanco-Toribio et al, 2014**), ambas inmunotoxinas anti-CEA mantuvieron en gran proporción su capacidad de unión al antígeno, incluso por encima de las 72 h de incubación (**Figura 15 C**).

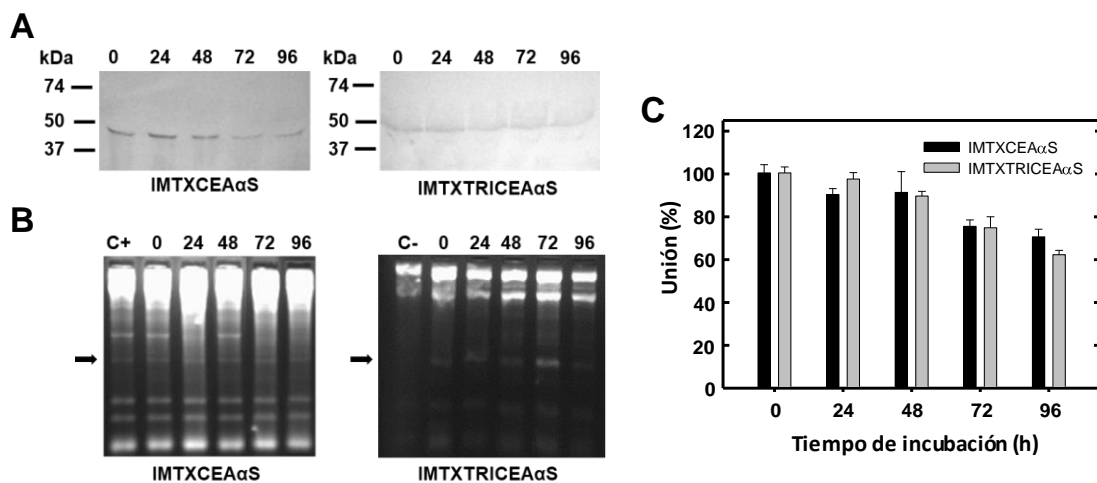


Figura 15. Ensayos de estabilidad estructural y funcional. Tras incubación de ambas inmunotoxinas a diferentes tiempos hasta 96 h en FBS a 37°C, se analizaron las diferentes alícuotas tomadas cada 24 h. A) *Western blot* utilizando un anticuerpo anti- α -sarcina para analizar su integridad molecular. B) Ensayo de reticulocitos para la actividad ribonucleolítica. C) Ensayos de unión a antígeno sobre células SW1222. Las barras representan la media \pm desviación estándar de ensayos por duplicado a una concentración menor a la de saturación de marcaje.

En conjunto, IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S presentaron una elevada estabilidad estructural y funcional, en consonancia con lo descrito para los componentes que las conforman (**Cuesta et al, 2009; Blanco-Toribio et al, 2014**) y para otras inmunotoxinas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

incluyendo α -sarcina (Carreras-Sangrà *et al*, 2012, Tomé-Amat *et al*, 2015). Además, ambas construcciones mantuvieron intacta su funcionalidad a tiempos de incubación ampliamente superiores a los requeridos para la completa eliminación del torrente sanguíneo de otras construcciones de valencia y tamaño similar (Cuesta *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2018; Compte *et al*, 2018, Rios *et al.*, 2019).

En conjunto, los resultados mostrados hasta este punto demuestran que IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S presentan intactas las actividades funcionales de sus dominios estructurales, y que estas presentan elevada una elevada estabilidad al ser sometidas a condiciones homólogas a las fisiológicas. Además, como consecuencia de su estructura trivalente, la aplicación del formato *trimerbody* a estas inmunotoxinas mejoró la capacidad de marcaje antigénico *in vitro* de IMTXTRICEA α S (Cuesta *et al*, 2010; Blanco-Toribio *et al.*, 2013).

2.1.4.4.-Caracterización de la actividad citotóxica *in vitro*

Una vez comprobado que ambas inmunotoxinas, IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S, mantienen las actividades específicas de su dominio marcador y tóxico, su caracterización funcional *in vitro* se completó con la evaluación de su efecto citotóxico específico sobre células CEA-positivas y CEA-negativas, mediante ensayos de inhibición de la biosíntesis proteica.

Los resultados recogidos en la **Figura 16** muestran que ambas inmunotoxinas anti-CEA ejercieron un potente efecto citotóxico sobre las células antígeno-positivas, provocando una reducción en su biosíntesis proteica y viabilidad celular de una manera dosis dependiente. Tras 72 h de incubación, IMTXCEA α S provocó una potente inhibición de la biosíntesis proteica sobre cultivos de las líneas celulares SW1222 y LIM1214, ambas CEA-positivas, con valores de IC₅₀ de 60 y 200 nM, respectivamente (**Figura 16 A**). Por su parte, en las mismas condiciones de incubación, IMTXTRICEA α S mostró un mayor efecto citotóxico sobre células SW1222 que la variante monomérica, con una IC₅₀= 6 nM en los ensayos de inhibición de la biosíntesis proteica (**Figura 16 B**). Respectivamente, en el mismo rango de concentraciones, ninguna de las construcciones produjo una reducción destacable en la biosíntesis sobre las células HeLa, CEA-negativas (**Figura 16 C**).

Por tanto, según los resultados mostrados hasta ahora, IMTXTRICEA α S ejerce una mayor actividad citotóxica CEA-específica que IMTXCEA α S, la cual es explicada en base a su mayor capacidad de unión al antígeno presente en la superficie de sus células diana y a su triple carga tóxica por molécula. En conjunto, en comparación a su análoga

monomérica, estas propiedades de IMTXTRICEA α S promoverían la entrada de una mayor cantidad de α -sarcina en el interior de las células CEA-positivas

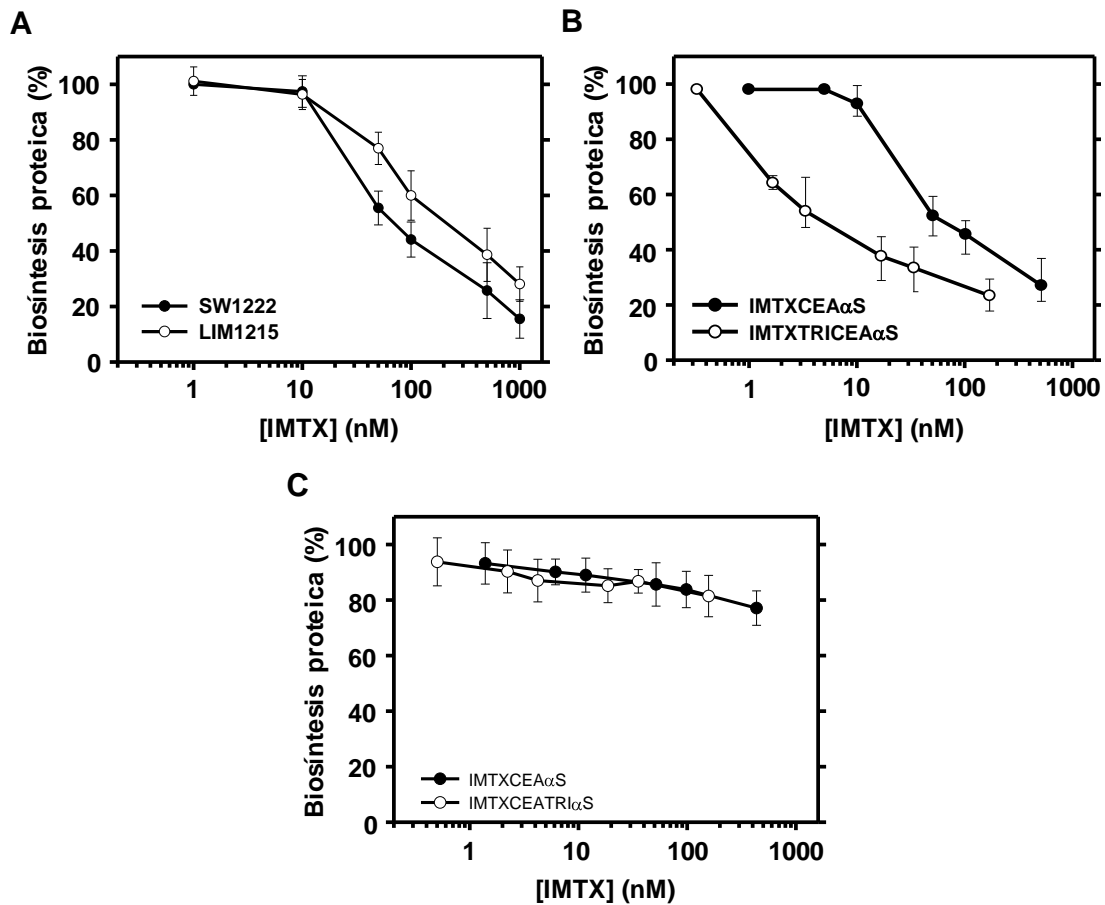


Figura 16. Ensayos de inhibición de biosíntesis proteica. A) Efecto de IMTXCEA α S sobre cultivos de células SW1222 y LIM1225 (CEA-positivas). B) Inhibición de la biosíntesis proteica causada por IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S sobre cultivos de células SW1222, y C) de células HeLa (CEA-negativas). En todos los casos, los cultivos se incubaron con las inmunotoxinas durante 72 h. Los ensayos se realizaron por triplicado mostrándose la media y la desviación estándar obtenidas para cada condición, relativizadas a controles sin tratamiento.

2.1.5.-Caracterización del efecto antitumoral *in vivo*

La actividad antitumoral *in vivo* de las inmunotoxinas IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S se evaluó en ratones *nude Balb/c* portadores de xenoinjertos derivados de las células de cáncer de colon humanas SW1222. El experimento se llevó a cabo sobre 5 grupos de ensayo, incluyendo un grupo control (PBS) y dos grupos de tratamiento para cada inmunotoxina, según se suministrasen 25 o 50 μ g por vía intravenosa (Ver apartado Métodos. Metodología para la caracterización de la actividad antitumoral).

Durante la duración del tratamiento, ambas inmunotoxinas mostraron un potente efecto inhibitor del crecimiento tumoral (**Figura 17**). En el día 15 del experimento, 24 h después de la última inyección, los volúmenes tumorales registrados para los grupos de ensayo IMTXCEA α S 25 y 50 fueron respectivamente 4 y 5 veces menores que los del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

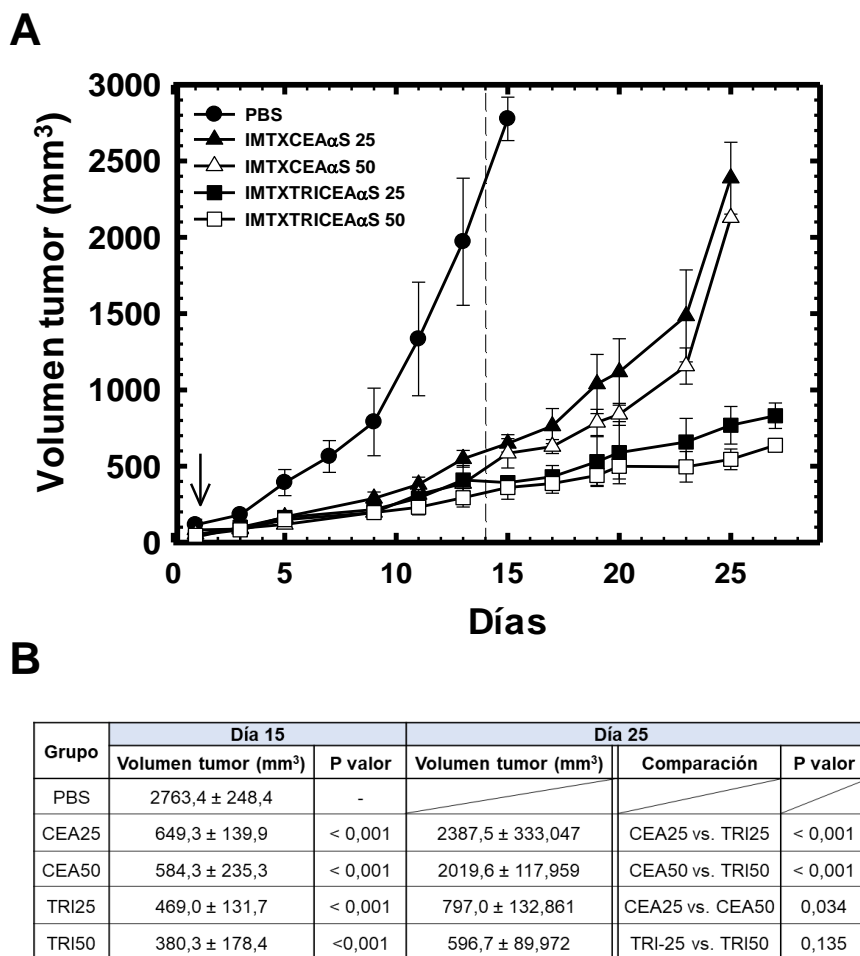


Figura 17. Actividad antitumoral *in vivo*. A) Seguimiento temporal de la progresión del volumen tumoral de *xenografts* derivados de células SW1222. Los grupos de ratones (n=6) fueron tratados con dos dosis diferentes de inmunotoxina por vía intravenosa: 25 o 50 µg de IMTXCEAαS o IMTXTRICEAαS (IMTX 25/50, respectivamente). Las dosis se suministraron cada 48 h durante 7 días. El inicio del tratamiento aparece indicado por la flecha vertical, y el final de éste por la línea punteada (día 14). B) Tabla mostrando los volúmenes tumorales al final del tratamiento (día 14) y a día 25 en forma de media ± desviación estándar. El P valor a día 14 muestra la comparación estadística entre los diferentes grupos de tratamiento y el grupo vehículo (PBS). Los P valores mostrados para el día 25 pertenecen a la comparación entre grupos de tratamiento para esa fecha.

grupo control; mientras que para los grupos IMTXTRICEAαS 25 y 50 ese ratio fue 6 y 7 veces menor, respectivamente. Es decir, en ambos casos, los grupos tratados con IMTXTRICEAαS presentaron un tamaño tumoral promedio menor al de los grupos tratados con la dosis equivalente de IMTXCEAαS. Estas diferencias en el tamaño promedio de los tumores entre los tratamientos con la misma dosis de las dos inmunotoxinas fueron estadísticamente significativas, mientras que aquellas entre los tratamientos con distintas dosis (25 o 50 µg) de cada una de las inmunotoxinas no lo fueron (**Figura 17 A y B**). Además, en los dos grupos de ensayo para IMTXCEAαS, los tumores sufrieron un rápido aumento en su crecimiento tras finalizar el tratamiento, mientras que ambos grupos para IMTXTRICEAαS mostraron un efecto antitumoral más duradero. Para el día 25 del experimento, los tamaños promedio de los tumores para

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los dos grupos de tratamiento con IMTXCEA α S fueron 3 veces mayores a los correspondientes para IMTXTRICEA α S (**Figura 17**).

De acuerdo a los criterios de punto final, establecidos conforme a los estándares de bienestar animal en un tamaño tumoral de 1500 mm³, el porcentaje de supervivencia respecto al tiempo para los distintos grupos durante el experimento se representa en la **Figura 18 A**. De forma paralela a la inhibición del crecimiento tumoral, según estos criterios de sacrificio, los tiempos correspondientes a una tasa de supervivencia del 50% (S₅₀) fueron el día 13 para el grupo PBS; y los días 25 y 26 para los grupos IMTXCEA α S 25 e IMTXTRICEA α S 50, respectivamente. Por su parte, en ambos grupos de ensayo con IMTXTRICEA α S, ninguno de sus ejemplares alcanzó el volumen tumoral fijado para ser contabilizado como fallecido, hasta el final de experimento (día 29); siendo además los promedios de los tamaños tumorales significativamente menores al volumen estipulado (1500 mm³) (**Figura 18 A**).

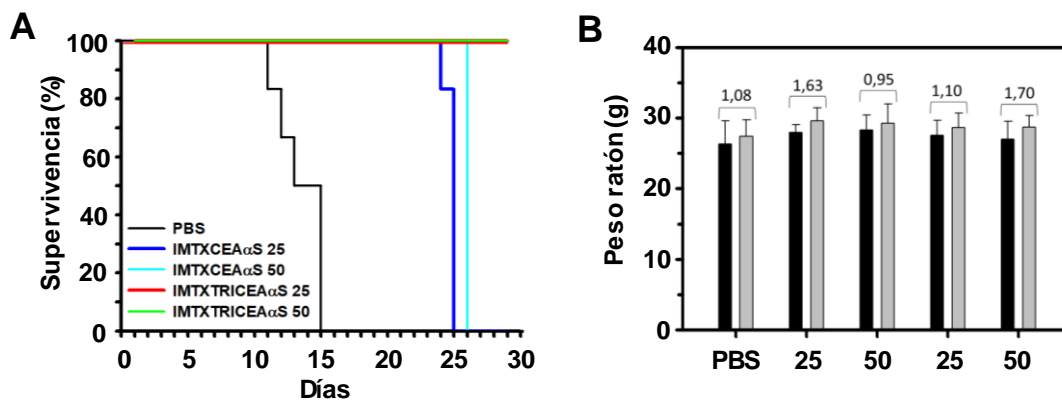


Figura 18. Curvas de supervivencia y efectos del tratamiento sobre peso de ratones. A) Curvas Kaplan-Meier de supervivencia. Seguimiento temporal de la supervivencia de los distintos grupos de ensayo (n=6). Los ratones se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó los 1500 mm³. El límite temporal del ensayo se estableció previamente a su inicio a los 29 días. B) Progresión del peso promedio de los ratones durante el tratamiento. Peso de los ratones de los diferentes grupos de ensayo al comienzo (barras negras) y al final (barras grises) del tratamiento, día 14. Las cifras de la parte superior indican el incremento de peso promedio (g) para cada grupo.

Finalmente, la posibilidad de un efecto tóxico sistémico provocado por los diferentes tratamientos se analizó de acuerdo a tres criterios diferentes, no encontrándose diferencias para ninguno de ellos entre el grupo control y los grupos de tratamiento. Primero, como se muestra en la **Figura 18 B**, durante la duración del tratamiento no se registraron diferencias significativas en los ratios de crecimiento promedio de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento frente al grupo control. Además, el análisis histopatológico del cerebelo, pulmón y riñón de un ejemplar de cada grupo, sacrificado aleatoriamente al final del tratamiento, no mostró alteraciones tisulares observables mediante microscopía óptica (**Figura 19**). Por último, durante la duración del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

experimento, la apariencia externa y las pautas de comportamiento y nutrición de los ejemplares no difirieron entre los diferentes grupos de tratamiento y el grupo control.

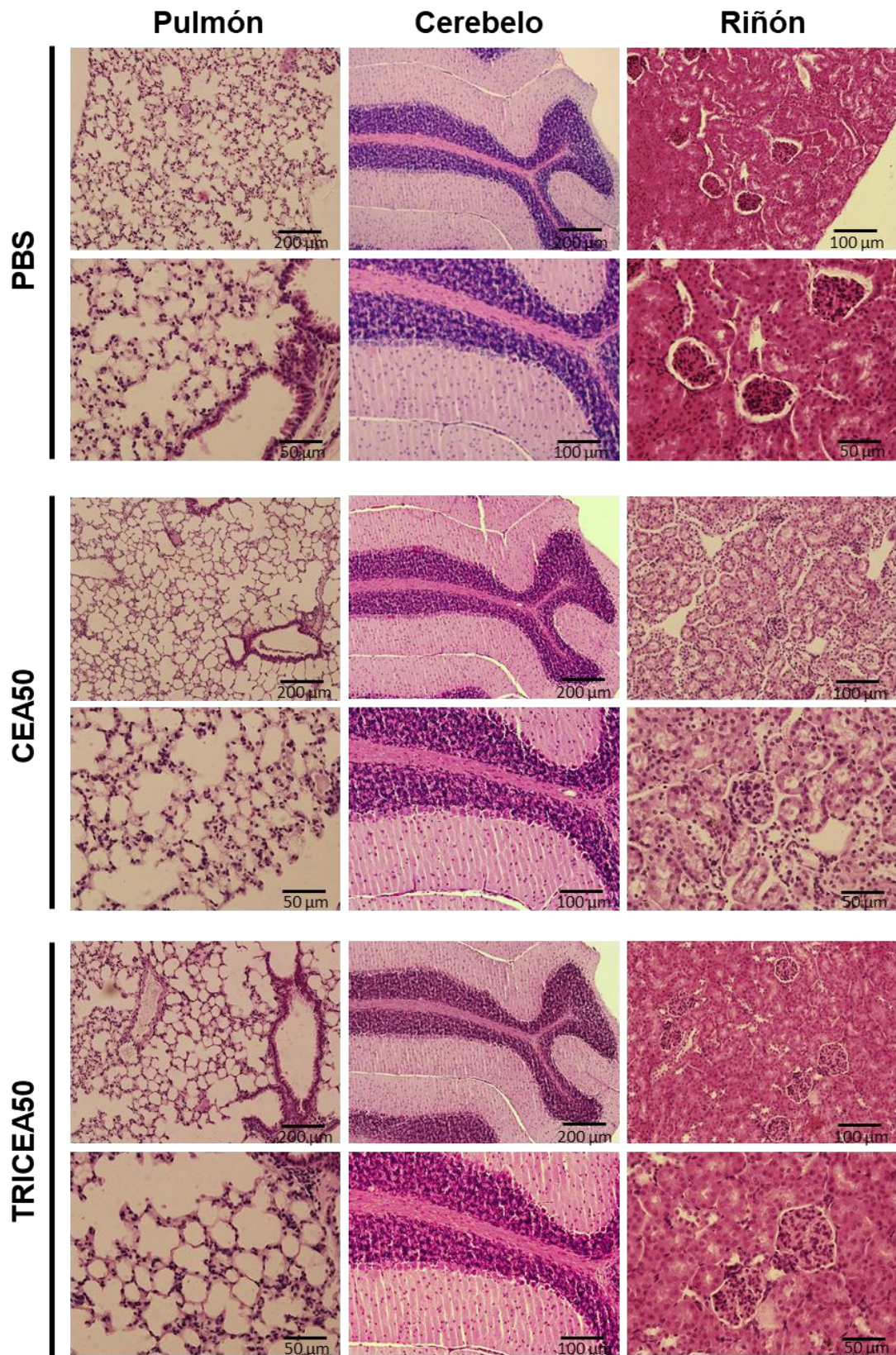


Figura 19. Análisis histopatológico de ejemplares correspondientes distintos tratamientos. Las imágenes mostradas de las secciones de pulmón, cerebelo y riñón se obtuvieron de un ejemplar representativo de cada grupo de ensayo (PBS, IMTXCEAαS 50 y IMTXTRICEAαS 50), seleccionado aleatoriamente y sacrificado el día 16, tras la finalización del tratamiento.

2.2.-VHHCEA5v2 α S

En este segundo apartado del Bloque I se presentan los resultados en relación con el diseño, producción y caracterización de inmunotoxina VHHCEA5v2 α S, cuyo dominio marcador es el anticuerpo monodominio anti-CEA VHHCEAv25 y su dominio tóxico α -sarcina. De forma paralela, se llevó a cabo la producción y purificación del VHHCEA5v2 parental, utilizado como control para la caracterización funcional y estructural. Los diseños de ambas proteínas recombinantes incluyen una extensión de histidinas en su extremo C-terminal (**Figura 20 A**).

1. **VHHCEA5v2**: anticuerpo recombinante monomérico constituido por la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de camélido humanizado VHHCEA5v2.
2. **VHHCEA5v2 α S**: inmunotoxina monomérica compuesta por el anticuerpo recombinante VHHCEA5v2 en posición N-terminal, fusionado mediante un *linker* Gly-Gly-Arg a α -sarcina.

2.2.1.-Diseño y obtención de los plásmidos de expresión

La obtención de los plásmidos de expresión para el anticuerpo VHHCEA5v2 y la inmunotoxina VHHCEA5v2 α S se realizó desde los vectores pPICZ α AIMTXA33 α S (anteriormente obtenido por el grupo) y pCR3.1-VHHCEA5v2.

El plásmido pPICZ α AVHHCEA5v2 se construyó mediante el clonaje de la secuencia de cDNA del VHHCEA5v2 en el plásmido molde habitual de expresión de nuestras inmunotoxinas. La secuencia VHHCEA5v2, contenida en el plásmido pCR3.1-VHHCEA5v2, se amplificó mediante los oligonucleótidos 6 y 8 (Ver apartado: Materiales. Relación de oligonucleótidos). Esta amplificación incluyó el sitio de restricción *Eco*RI (5') y la secuencia 6His-STOP-*Sa*II (3') para su posterior clonaje en el vector pPICZ α A. El producto de dicha amplificación (430 pb) y el vector pPICZ α AIMTXA33 α S se digirieron con las endonucleasas *Eco*RI y *Sa*II. El fragmento grande de la digestión del plásmido y el fragmento 5'*Eco*RI-VHHCEA5v2-6His-STOP-*Sa*II3' se ligaron, y el producto de ligación se transformó en células *E. coli* DH5 α F'.

El vector pPICZ α AVHHCEA5v2 α S se obtuvo de manera análoga a los plásmidos para la expresión de IMTXCEA α S y IMTXTRICEA α S. Mediante los oligonucleótidos 6 y 7 se amplificó la secuencia VHHCEA5v2 incluyendo los sitios de restricción *Eco*RI (5') y *Not*I (3'). Tras digerirse con dichas enzimas, este fragmento (400 pb), se ligó junto al

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fragmento grande de la doble digestión *EcoRI* y *NotI* del pPICZ α AIMTXA33 α S (mismo fragmento que el utilizado para las construcciones del pPICZ α AIMTXCEA α S y del pPICZ α AIMTXTRICEA α S), transformándose la mezcla resultante en células *E. coli* DH5 α F'.

Por último, tras comprobar la correcta identidad de las secuencias codificantes, 10 μ g de los plásmidos pPICZ α AVHHCEA5v2 y pPICZ α AVHHCEA5v2 α S se linealizaron mediante su digestión con *Pme* I y se electroporaron en *P. pastoris* BG11.

2.2.2.-Producción y purificación de la inmunotoxina

Las pruebas de producción en *P. pastoris* de la inmunotoxina VHHCEA5v2 α S y de su anticuerpo parental VHHCEA5v2 se realizaron de acuerdo a las condiciones utilizadas para las inmunotoxinas descritas anteriormente; a su vez similares a aquellas utilizadas para la producción recombinante de otros fragmentos de anticuerpo de dominio único (Rahbarizadeh *et al*, 2006; Doyle *et al*, 2009) y de inmunotoxinas que contenían estos fragmentos (Geoghegan *et al*, 2014).

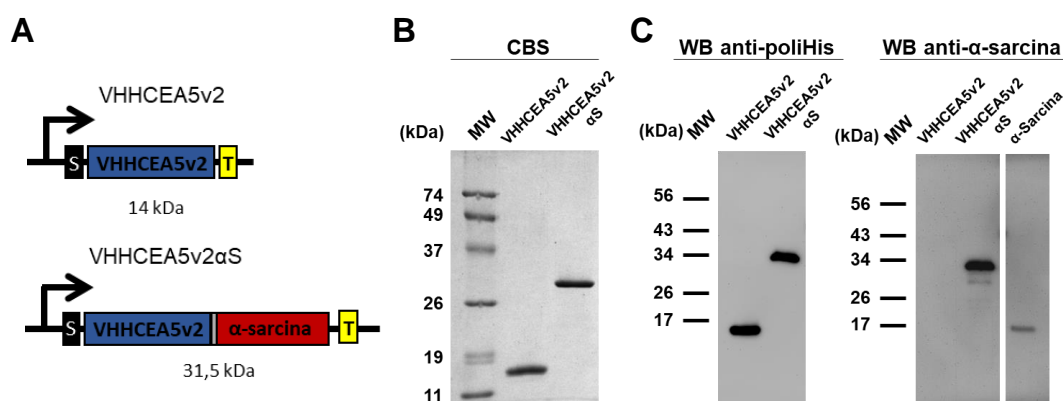


Figura 20. Diagrama de las estructuras genéticas y análisis mediante PAGE-SDS acompañado de inmunodetección de las construcciones VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S. A) Los diagramas representan los componentes genéticos incluidos en el cDNA de las construcciones tal y como se incluyen en el vector pPICZ α A. Se muestran los siguientes dominios funcionales: factor- α (S, negro); VHHCEA5v2 (azul), Gly-Gly-Arg *linker* (gris), α -sarcina (roja) y extensión de histidinas (T, amarilla). B) Tinción con azul de Coomassie (CBS) de PAGE-SDS en condiciones reductoras y C) Inmunodetección utilizando un anticuerpo monoclonal frente a la extensión de histidinas (izquierda) o mediante un antisuero anti- α -sarcina (derecha) de ambas construcciones.

Tras seleccionar las colonias con mayor nivel de expresión, los cultivos para la producción a gran escala de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S se realizaron de acuerdo a lo descrito en el protocolo genérico para la producción de inmunotoxinas (Ver apartado: Métodos. Metodología para la purificación y caracterización estructural de proteínas. Producción de proteínas recombinantes). Transcurridas 48 h de inducción, los medios de expresión de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S se dializaron frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1M, pH 7,5 en bolsas con un tamaño de poro de 6-8 y 25 kDa, respectivamente. Ambas proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de

metal inmovilizado utilizando columnas de Ni²⁺-NTA agarosa, obteniéndose altamente concentradas en las fracciones recogidas con tampón de elución. Como último paso de la purificación, las fracciones conteniendo proteína fueron dializadas frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5 para la eliminación del imidazol.

Como se observa (**Figura 20 B y C**), ambas construcciones se produjeron satisfactoriamente mediante su expresión recombinante en *P. pastoris*, purificaronse a homogeneidad y sin degradación de acuerdo a criterios de movilidad electroforética e inmunodetección de sus componentes. Los rendimientos finales de purificación fueron 20 mg/l de inducción para VHHCEA5v2 y 5 mg/l de inducción para VHHCEA5v2αS; y sus coeficientes $\epsilon_{280\text{nm}}$ 33.920 M⁻¹·cm⁻¹ y 56.840 M⁻¹·cm⁻¹, respectivamente.

2.2.3.-Caracterización estructural

La caracterización estructural de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2αS se realizó de manera semejante a las inmunotoxinas basadas en el MFE23 scFv. Los componentes estructurales de ambas construcciones se analizaron mediante *Western blot*, y mediante el registro de sus espectros de CD en el UV-lejano y de sus perfiles de desnaturalización térmica, se estudió el plegamiento de su estructura nativa y su estabilidad frente al incremento de temperatura.

Una vez purificadas, la identidad de ambas construcciones se confirmó mediante *Western blot*, donde tanto VHHCEA5v2 como VHHCEA5v2αS fueron reconocidas específicamente por un anticuerpo monoclonal anti-poliHis, mientras que VHHCEA5v2αS también lo fue por un antisuero anti-α-sarcina (**Figura 20 C**).

Los espectros de CD en el UV-lejano indicaron un plegamiento globular para ambas construcciones (**Figura 21 A**). El registro para VHHCEA5v2, aún con poca elipticidad molar por residuo, presenta un mínimo de absorción en torno a los 215 nm, que concuerda el esperado para un plegamiento globular mayoritario de lámina β, y con lo descrito para otros VHH (**Gorlani et al., 2012**). Respectivamente, el espectro de VHHCEA5v2αS fue también acorde a un plegamiento globular formado mayoritariamente por lámina β, ajustándose al registrado para el VHHCEA5v2 y al descrito para α-sarcina (**Martínez del Pozo et al., 1988; García-Ortega et al., 2002**).

El cálculo de la temperatura media de desnaturalización (T_m) del *nanobody* y su inmunotoxina derivada, se realizó mediante la medición de la dependencia de la temperatura en la elipticidad molar por residuo (θMRW) a 230 y 220 nm, respectivamente (**Figura 21 B**). En la **Figura 21 C**, se muestran las temperaturas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

medias de desnaturalización (T_m) obtenidas mediante la derivada primera del registro de la $\theta_{MRW}/\Delta T$. El VHHCEA5v2 presentó una transición entre dos estados con una T_m de 66,7°C. Por su parte, el VHHCEA5v2 α S presentó dos transiciones de desnaturalización independientes con T_m s de 45,8 y 65,4°C. La primera correspondería a la desnaturalización del dominio α -sarcina de la construcción, con una T_m para la forma *wt* de 52,6°C (Gasset *et al.*, 1995); mientras que la segunda correspondería a la desnaturalización del dominio VHHCEA5v2.

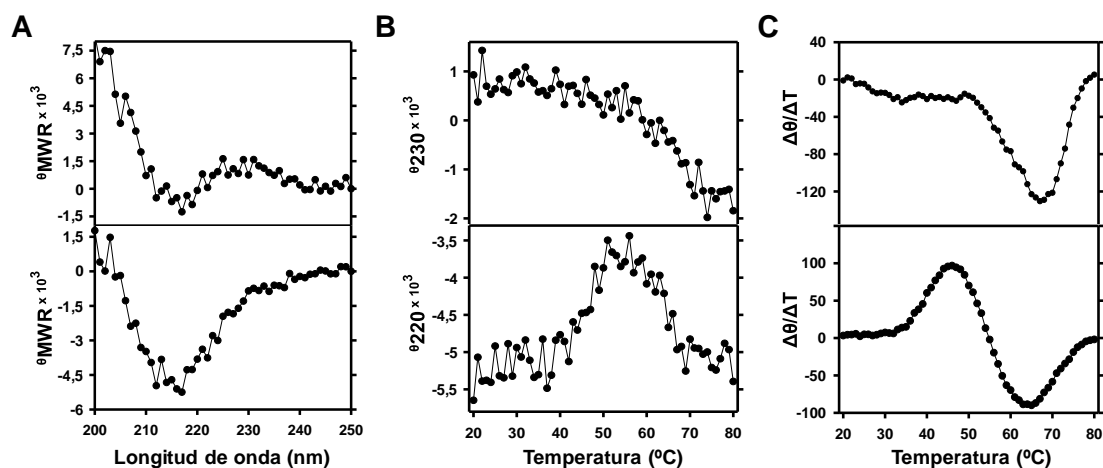


Figura 21. Caracterización estructural mediante análisis de dicroísmo circular de VHHCEA5v2 (arriba) y VHHCEA5v2 α S (abajo). A) Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano (θ_{MRW} , expresada como: grado \cdot cm 2 \cdot dmol $^{-1}$). B) Perfiles de desnaturalización térmica, mediante el registro de θ_{MRW} mientras la temperatura se incrementaba 0,5°C/min. La θ_{MRW} se registró a 230nm para VHHCEA5v2 y a 220nm para VHHCEA5v2 α S. C) Curvas de la derivada primera de la θ_{MRW} del panel B. Los máximos y mínimos se corresponden a las temperaturas medias de desnaturalización (T_m).

Por tanto, VHHCEA5v2 expresado en *P. pastoris* presenta un plegamiento globular altamente resistente a la desnaturalización térmica, en la línea de lo descrito para el VHHCEA5v2 humanizado expresado en *E. coli*, cuya T_m es 73,7°C (Vaneycken *et al.*, 2010). En cambio, la fusión de α -sarcina en posición C-terminal, formando la inmunotoxina VHHCEA5v2 α S genera una molécula con menor estabilidad térmica que sus componentes por separado, reduciendo las T_m de ambos dominios estructurales.

Este resultado, añadido al registrado para IMTXA33 α S, también con una T_m de 45°C (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012), parece indicar que el factor limitante de la estabilidad térmica de nuestras inmunotoxinas es la inclusión de α -sarcina flanqueada por el *linker* peptídico Gly-Gly-Arg y la extensión de histidinas en C-terminal, reduciéndose en 6°C su T_m respecto a la forma *wt* de la ribotoxina.

2.2.4.-Caracterización funcional

La caracterización funcional del anticuerpo recombinante VHHCEA5v2 y de su inmunotoxina derivada constó del estudio de su actividad uniendo CEA, del análisis de la actividad ribonucleolítica de VHHCEA5v2 α S y de la caracterización de su actividad citotóxica sobre células CEA-positivas y CEA-negativas. Además, mediante los estudios de estabilidad *in vitro*, se evaluó la permanencia de estas funcionalidades tras la incubación de las construcciones en condiciones homólogas a las fisiológicas.

Como se ha descrito en los objetivos de este bloque, la caracterización funcional de ambas construcciones se enfocó en analizar comparativamente de qué manera influye la fusión de α -sarcina en posición C-terminal de VHHCEA5v2 a la capacidad de unión a CEA del *nanobody*, y en qué medida esta unión confiere a la inmunotoxina actividad citotóxica antígeno dependiente. Además, para evaluar en qué medida la utilización de diferentes dominios marcadores afectó a la funcionalidad de estas construcciones, su interacción con CEA y la actividad citotóxica de VHHCEA5v2 α S se compararon con la propia de IMTXCEA α S.

2.2.4.1.-Caracterización de la unión a antígeno

Siguiendo el doble procedimiento consistente en ensayos citometría de flujo y ELISA, utilizado para la caracterización de las inmunotoxinas basadas en MFE23 scFv, se estudió la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno CEA de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S. Además, como control de la unión desempeñada por los MFE23 scFv, la especificidad y la magnitud de esta unión a CEA se estudió comparativamente con la propia de IMTXCEA α S

Los ensayos de citometría de flujo mostraron un marcaje específico de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S sobre aquellas células CEA-positivas (HeLa-CEA y SW1222), pero no sobre las CEA-negativas (HeLa) (**Figura 22 A**). Además, estos ensayos no evidenciaron mostraron diferencias significativas en la capacidad de unión a CEA de las dos construcciones, que sin embargo sí se mostró menor a la registrada para IMTXCEA α S (**Figura 22 B**). En cambio, mediante ELISA la unión mostrada por VHHCEA5v2 α S frente al antígeno inmovilizado fue significativamente menor a la desempeñada por VHHCEA5v2, la cual mediante este método no presentó diferencias significativas con la señal de IMTXCEA α S (**Figura 22 C**).

En conjunto, estos resultados mostraron que la inmunotoxina VHHCEA5v2 α S mantiene la capacidad de reconocimiento y unión a CEA propia de su anticuerpo parental, marcando específicamente a aquellas células CEA-positivas. Sin embargo, esta

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

capacidad de unión de VHHCEA5v2 a CEA en la membrana celular es significativamente menor a la mostrada por IMTXCEA α S (**Figura 22 C**).

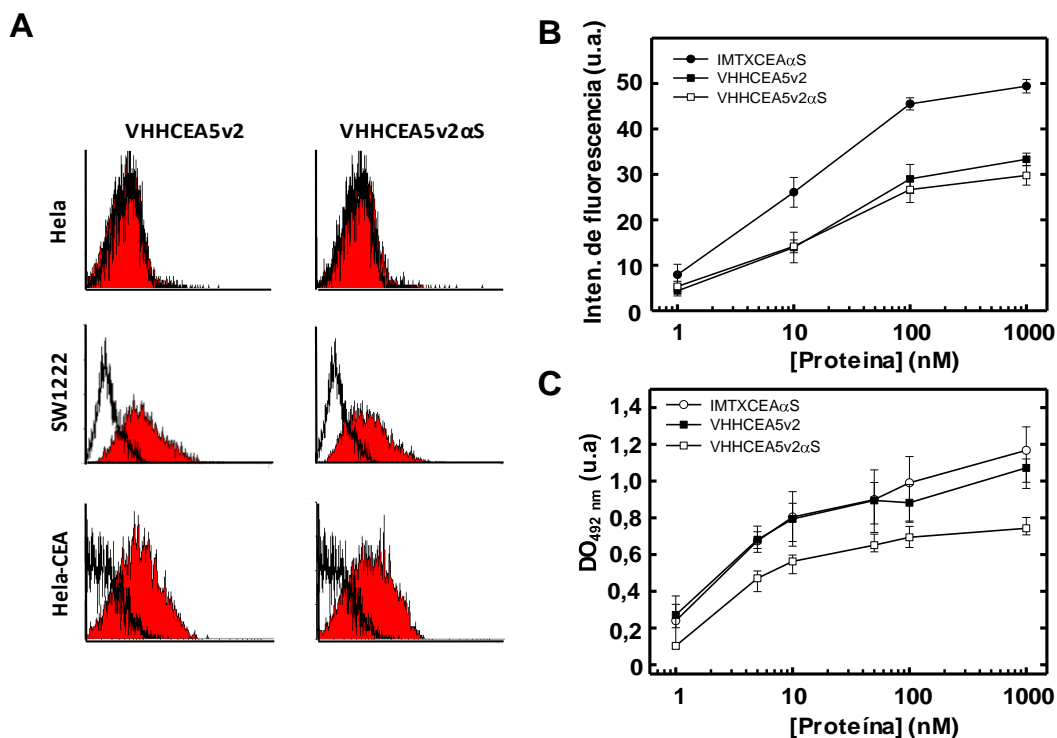


Figura 22. Ensayos de unión al antígeno CEA con VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S. A) caracterización de la unión a CEA en superficie celular utilizando células HeLa (CEA-negativas), y HeLa-CEA y SW1222 (ambas CEA-positivas). El perfil sin relleno muestra la señal de las células incubadas únicamente con el anticuerpo de detección y el perfil en rojo, la fluorescencia de aquellas células incubadas con la correspondiente construcción más el anticuerpo de detección anti-poliHis. B) Análisis comparativo de la unión a CEA e por VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S utilizando células SW1222. IMTXCEA α S se incluyó como control en los ensayos de cuantificación. C) Ensayos de ELISA sobre antígeno CEA inmobilizado (0,25 μ g/pocillo).

2.2.4.2.-Caracterización de la actividad ribonucleolítica

La actividad ribonucleolítica de α -sarcina, formando parte de VHHCEA5v2 α S, se evaluó mediante el ensayo de reticulocitos. Como se muestra en la **Figura 23**, cantidades equimolares de la inmunotoxina VHHCEA5v2 α S y de α -sarcina *wt*, produjeron una hidrólisis del SRL semejante, que se evidenció por la presencia en el gel de agarosa de cantidades equivalentes de factor α escindido (flecha negra). Este resultado demostró que la inclusión de α -sarcina en posición C-terminal del VHHCEA5v2 no altera de manera apreciable su actividad ribonucleolítica, mostrándose VHHCEA5v2 α S capaz de inhibir la función ribosomal.

2.2.4.3.-Ensayos de estabilidad *in vitro*

La estabilidad estructural y funcional es un aspecto fundamental, dentro de las propiedades que deben poseer los anticuerpos y sus moléculas derivadas, para su

potencial aplicación clínica. Es decir, en lo que aquí se refiere, ambas construcciones deben mantener su integridad molecular y actividad funcional intacta tras ser sometidas a las condiciones fisiológicas propias de su administración a un organismo biológico. Por este motivo, como paso previo a los ensayos de citotoxicidad celular, se analizó el efecto de la incubación en FBS a 37°C sobre VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S.

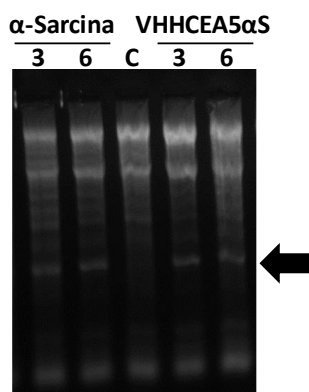


Figura 23. Caracterización funcional in vitro del dominio tóxico. La actividad ribonucleolítica de cantidades equimolares de VHHCEA5v2 α S y α -sarcina (3 y 6 pmol) fue analizada mediante ensayo de reticulocitos frente a ribosomas de mamífero. La actividad ribonucleolítica de la α -sarcina hidrolizando el SRL del rRNA mayor se muestra por la liberación inequívoca del fragmento- α (flecha negra).

La integridad molecular de ambas construcciones se mantuvo estable durante las 48 h de incubación, no observándose bandas de degradación en la inmunodetección mediante un anticuerpo monoclonal anti-poliHis, ni decaimiento alguno en la señal correspondiente a la banda de la construcción completa (**Figura 24 A**). De un modo semejante, la actividad ribonucleolítica de VHHCEA5v2 α S se mantuvo constante durante todo el ensayo (**Figura 24 B**). Tras 48 h de incubación, la actividad uniendo CEA de ambas construcciones fue superior al 90% respecto al control para VHHCEA5v2 y del 75% para VHHCEA5v2 α S (**Figura 24 C**).

Debido a la ausencia de degradación de VHHCEA5v2 α S (**Figura 24 A**), el mayor descenso de su actividad uniendo CEA respecto al *nanobody*, no parece sustentarse en una degradación de la construcción a través del *linker* peptídico Gly-Gly-Arg. De modo que, una posible explicación a este hecho emerge de la diferencia en la estabilidad térmica encontrada para ambas proteínas en los estudios de la desnaturalización proteica dependiente de temperatura (**Figura 21 C**). De este modo, la mayor sensibilidad térmica registrada para VHHCEA5v2 α S respecto a VHHCEA5v2 podría explicar las diferencias en la unión a CEA respecto a su anticuerpo parental, al encontrarse una mayor cantidad de VHHCEA5v2 α S desnaturalizada, aunque no degradada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

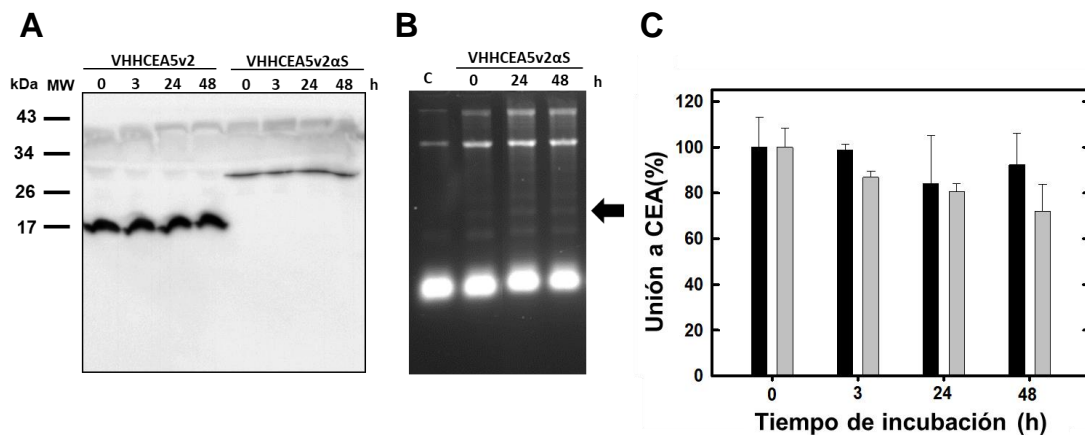


Figura 24. Ensayos de estabilidad estructural y funcional. La integridad molecular y las actividades funcionales de las construcciones VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2αS analizadas tras diferentes tiempos de incubación en condiciones mimetizando a las fisiológicas. A) Inmunodetección frente a la extensión de histidinas. B) Ensayo de reticulocitos utilizando 0,5 pmol de inmunotoxina para cada reacción. C) Ensayos de unión a CEA inmovilizado mediante ELISA para una concentración de 50 nM: VHHCEA5v2 (negro) y VHHCEA5v2αS (gris). Las columnas muestran los valores promedio y sus desviaciones estándar para los diferentes ensayos realizados por duplicado.

En cualquier caso, dado el pequeño tamaño del VHHCEA5v2 y de su inmunotoxina derivada, ambos por debajo del tamaño de filtración glomerular (70 kDa), este resultado evidencia una elevada estabilidad en condiciones fisiológicas respecto a sus vidas medias en el torrente sanguíneo (Cuesta *et al.*, 2010; Arezumand *et al.*, 2017).

2.2.4.4.-Caracterización de la actividad citotóxica *in vitro*

La actividad citotóxica de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2αS fue evaluada comparativamente, mediante ensayos de viabilidad celular y de inhibición de la biosíntesis proteica, utilizando células CEA-positivas (HeLa-CEA y SW1222) y CEA-negativas (HeLa).

Tras 72 h de una incubación, VHHCEA5v2 no mostró ningún efecto significativo sobre la viabilidad de ninguno de los cultivos celulares de las líneas ensayadas, con independencia de la presencia o ausencia de CEA en su membrana plasmática (Figura 25 A). En cambio, VHHCEA5v2αS causó una reducción significativa de la viabilidad celular sobre células SW1222 y HeLa-CEA (CEA-positivas) respecto a la producida en células HeLa (CEA-negativas) (Figura 25 B). Además, VHHCEA5v2αS produjo un potente efecto inhibitor de la biosíntesis proteica dependiente de la presencia del antígeno-CEA sobre la superficie celular (Figura 25 C), con una IC_{50} en células SW1222 de 330 nM.

Por tanto, la fusión estructural de α-sarcina al anticuerpo VHHCEA5v2, formando la inmunotoxina VHHCEA5v2αS, otorga a esta nueva construcción una actividad citotóxica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CEA-específica ausente en el *nanobody* parental; si bien su efecto citotóxico fue claramente inferior al causado por IMTXCEA α S, con una IC₅₀ de 300 vs 60 nM para células SW1222 (**Figura 16 B**). La explicación a este menor efecto citotóxico reside en la menor unión a CEA celular exhibida por la pareja VHHCEA5v2/VHHCEA5v2 α S respecto a IMTXCEA α S, diez veces menor a concentraciones no saturantes (**Figura 22 B**). Este dato, en oposición a los coeficientes de disociación descritos en la bibliografía para VHHCEA5v2 producido en *E. coli* (**Vaneycken et al., 2010**) y MFE23 scFv *S. cerevisiae* (**Graff et al., 2004**); 9,8 y 8,5 nM, respectivamente; muestra una pobre unión a CEA celular por parte de las construcciones conteniendo el VHHCEA5v2 respecto a IMTXCEA α S.

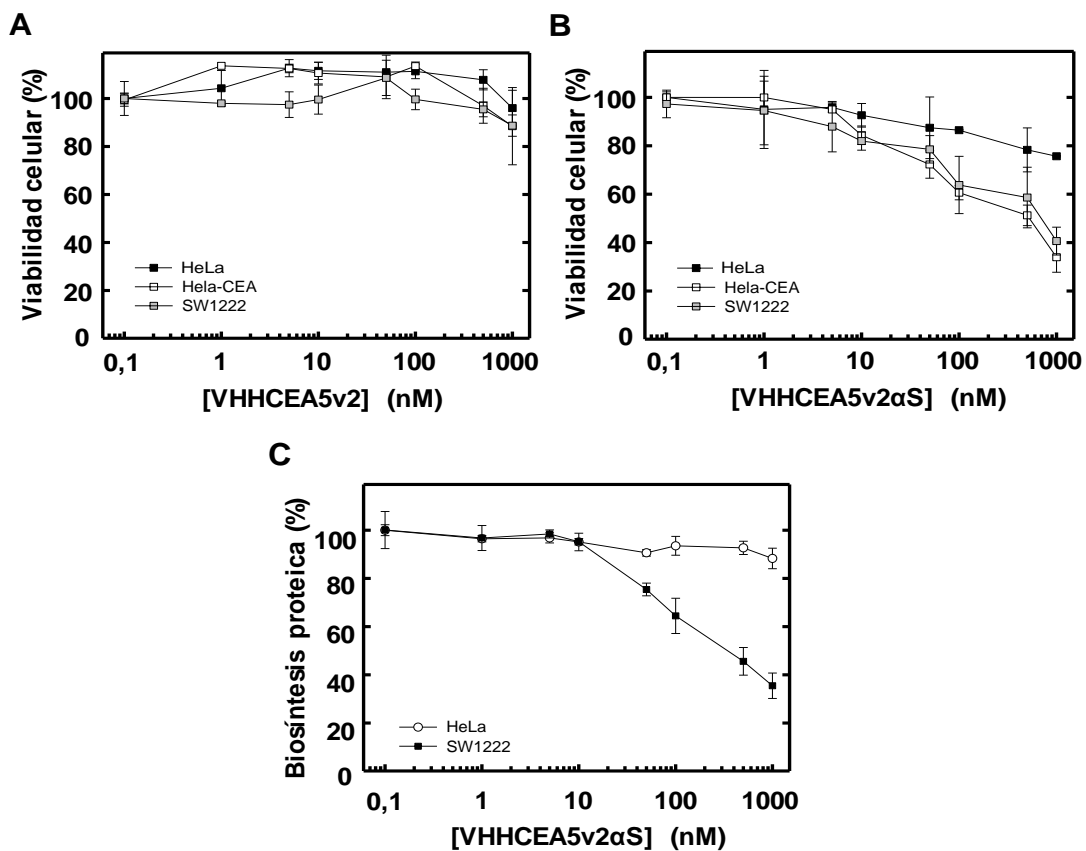


Figura 25. Ensayos de inhibición de la viabilidad celular y de la biosíntesis proteica. Células HeLa (CEA-negativa), y HeLa-CEA y SW1222 (ambas CEA-positivas) se incubaron con VHHCEA5v2 (A) y VHHCEA5v2 α S (B) para los ensayos de MTT. C) Ensayos de inhibición de la biosíntesis proteica causada por VHHCEA5v2 α S en cultivos de células HeLa y SW1222. Todos los resultados muestran el promedio \pm desviación estándar de ensayos realizados por triplicado tras 72 h de incubación con las construcciones.

3.-Discusión

Más de 30 años después del desarrollo de las primeras inmunotoxinas, la resolución de los problemas de toxicidad sistémica e inmunogenicidad asociados a los diseños iniciales ha acrecentado el interés en este grupo de proteínas terapéuticas como agentes para el tratamiento del cáncer. Si bien estudios recientes utilizando inmunotoxinas han obtenido resultados prometedores en pacientes con procesos recurrentes y refractarios, la mayoría de estos éxitos se han logrado en el tratamiento de cánceres hematológicos, manteniéndose elusiva la terapia efectiva de tumores sólidos. Por tanto, el desarrollo de diseños de inmunotoxina optimizados para el tratamiento antitumoral *in vivo* pasa por superar las limitaciones que actualmente restringen su uso terapéutico, principalmente relacionadas con una biodistribución deficiente, una baja localización y penetración tumoral, así como con los efectos derivados de cierta toxicidad inespecífica (**Kreitman 2009; Cuesta et al., 2010; Shan et al., 2013; Allewine et al., 2015**).

Recientemente se ha descrito la potencialidad de α -sarcina como dominio tóxico en el diseño de inmunotoxinas frente al cáncer colorrectal, mostrando dichas construcciones una potente y específica efectividad antitumoral *in vivo*, acompañada de un descenso significativo en la proliferación y angiogénesis tumorales, y un aumento en la apoptosis en los tumores tratados (**Tomé-Amat et al., 2015 c**). De este modo, mediante la fusión de α -sarcina a un scFv específico de un antígeno tumoral, su baja citotoxicidad inespecífica frente a las células no tumorales no sólo puede ser considerablemente o totalmente inhibida, sino que además la alta afinidad específica del dominio marcador promueve la acumulación efectiva de la toxina sobre las células tumorales (**Carreras-Sangrá et al., 2012; Jones et al., 2016**).

En este Bloque I se han presentado los resultados del diseño, producción, purificación y caracterización de tres nuevas inmunotoxinas dirigidas frente a CEA. Las nuevas construcciones, basadas en la ribotoxina α -sarcina, responden a tres diseños diferentes, buscándose a través de su caracterización contribuir a elucidar de la relación existente entre el formato y dominio marcador de una inmunotoxina (tamaño, valencia, afinidad funcional, estabilidad), y sus propiedades citotóxicas *in vitro* y antitumorales *in vivo*.

En primer lugar, mediante la aplicación de la plataforma *trimerbody* -desarrollada para la generación de anticuerpos recombinantes triméricos con propiedades optimizadas para el tratamiento tumoral *in vivo* (**Cuesta et al., 2019; Nuñez-Prado et al., 2015**)- se ha obtenido una inmunotoxina trimérica en disolución. Esta construcción, denominada

IMTXTRICEA α S, posee tres dominios de unión y tres cargas tóxicas por molécula. Mediante su caracterización, en comparación con su análogo monomérico IMTXCEA α S, se estudió el efecto de la trimerización estructural sobre las actividades de unión a antígeno, citotóxica y antitumoral; así como en qué medida las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución optimizadas propias del formato *trimerbody* se traducían en una mejora de la funcionalidad de IMTXTRICEA α S *in vivo*.

Por otro lado, con una hipótesis de trabajo diferente, centrada en la reducción del tamaño molecular de la construcción, se ha generado la primera inmunotoxina basada en α -sarcina, también CEA-específica, cuyo dominio marcador es un VHH. En primer lugar, dado lo novedoso de la construcción VHHCEA5v2 α S, se indagó en qué medida este diseño permitía las funcionalidades intrínsecas de ambos dominios proteicos, con especial atención en la unión de VHHCEA5v2 a CEA, dado el menor tamaño del *nanobody* (14,5 kDa) respecto a la α -sarcina (17 kDa). Además, mediante la aplicación de esta aproximación al tratamiento antitumoral *in vivo* se buscaba conseguir una mayor y más eficiente penetración tumoral (**Shan et al., 2013**), considerando el menor tamaño de VHHCEA5v2 α S (31,5 kDa) respecto a las inmunotoxinas monoméricas basadas en scFv (~45 kDa), así como el estudio de esta reducción en su tamaño sobre su capacidad de inhibición del crecimiento tumoral.

En lo correspondiente a IMTXCEA α S e IMTXTRICEA α S, ambas proteínas fueron purificadas a homogeneidad desde el medio de expresión extracelular de *P. pastoris*. Las dos construcciones mostraron un tamaño molecular acorde a sus formatos monomérico o trimérico en disolución y espectros de CD consistentes con un plegamiento globular mayoritario de lámina β . Además, ambas fueron capaces de unir específicamente el antígeno, no sólo inmovilizado en placas de ELISA, sino también en su entorno natural en la superficie celular; un hecho que además se vio acompañado de una internación tiempo-dependiente en sus células diana. Así mismo, ambas inmunotoxinas presentaron la actividad ribonucleolítica altamente específica de α -sarcina, causante de la inactivación del ribosoma, y mantuvieron su funcionalidad tras una prolongada incubación en condiciones análogas a las fisiológicas. Por tanto, ambas proteínas presentan un plegamiento adecuado y compatible con las propiedades estructurales y funcionales de los dominios que las integran.

La actividad citotóxica específica de ambas construcciones se evaluó *in vitro* utilizando la línea celular SW1222, considerada un modelo de cáncer colorrectal con niveles de expresión de CEA intermedios (**Bacac et al., 2016**). En este caso, IMTXTRICEA α S causó un mayor efecto citotóxico que su análoga monomérica, con valores de IC₅₀ en el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ensayo de inhibición de la biosíntesis de proteínas de 6 y 60 nM ($p < 0,01$), respectivamente. Este resultado demostró que la aplicación del diseño *trimerbody* a la construcción de inmunotoxinas basadas en α -sarcina incrementa significativamente su efecto citotóxico, al menos en condiciones *in vitro*. Por otro lado, de modo similar a la observado con otras scFv-inmunotoxinas basadas en la α -sarcina (**Carreras-Sangrà et al., 2012; Jones et al., 2016**), la trimerización de la construcción no alteró la elevada especificidad conferida por MFE23 scFv a las inmunotoxinas, que en ningún caso unieron ni causaron un efecto citotóxico significativo sobre las células tumorales CEA-negativas.

La explicación al incremento en la capacidad citotóxica *in vitro* de IMTXTRICEA α S, como consecuencia de su trimerización, parece involucrar múltiples factores. En primer lugar, debido a su trivalencia, y de acuerdo a lo esperado para el diseño *trimerbody*, IMTXTRICEA α S poseería una mayor afinidad funcional y una menor tasa de disociación por el antígeno que IMTXCEA α S (**Cuesta et al., 2010; Blanco-Toribio et al., 2013**). Hecho que parece demostrado por su mayor capacidad de unión a antígeno en superficie celular respecto a la forma monomérica. Además, la triple carga tóxica incluida en cada molécula de IMTXTRICEA α S podría potenciar de por sí su capacidad citotóxica, al promover una mayor acceso de α -sarcina al interior de las células diana. Por último, no hay que descartar un posible efecto “catalizador” de la internación del complejo CEA-inmunotoxina, provocado por la agregación del antígeno sobre la membrana celular como consecuencia de la trivalencia de IMTXTRICEA α S. Así, aunque CEA es frecuentemente referido como un antígeno que no se interna (**Cai et al., 2007**), este efecto “catalizador” respecto a la internación propia de CEA ha sido recientemente descrito para una IgG anti-CEA bivalente, en oposición a diversos scFv monovalentes internados de forma lenta (**Schmidt et al., 2008**). En conjunto, a falta de una caracterización más fina que explore comparativamente estos atributos entre ambas inmunotoxinas, nuestros resultados sugieren que la trimerización de la inmunotoxina produce un efecto sinérgico que implica un aumento significativo en su citotoxicidad *in vitro* tras 72 h de incubación.

El efecto antitumoral de ambas inmunotoxinas se confirmó *in vivo* utilizando ratones *nude* inoculados con tumores *xenograft* subcutáneos formados por células SW1222. En este experimento, ambas inmunotoxinas causaron una inhibición significativa del crecimiento tumoral, sin mostrar en ningún caso un efecto tóxico inespecífico a nivel sistémico. La inhibición del crecimiento tumoral, en concordancia con los ensayos de citotoxicidad *in vitro*, fue significativamente superior para IMTXTRICEA α S. Además, este efecto antitumoral de IMTXTRICEA α S se mantuvo durante un mayor tiempo una

vez finalizado el tratamiento, correspondiéndose con una mayor tasa de supervivencia. Respectivamente, los tumores de los ejemplares tratados con IMTXTRICEA α S mostraron un crecimiento lento y sostenido hasta el último día del experimento (día 30), en contraste con aquellos correspondientes al grupo no tratado, y también con los tratados con la inmunotoxina monomérica. Un resultado que, derivado de la mejor biodistribución y vida media en circulación otorgado por el diseño *trimerbody*, sugiere un mejor acceso y marcaje tumoral para IMTXTRICEA α S respecto a su análogo monomérico. Si bien estas propiedades han sido demostrados para construcciones triméricas N-terminales del MFE23 scFv (Cuesta *et al.*, 2009; Ríos *et al.*, 2019), caracterizadas por un tamaño molecular de 110 kDa, idóneo para la localización tumoral según las características de la “zona de marcaje tumoral” (Cuesta *et al.*, 2010), también se han obtenido resultados excelentes para el marcaje tumoral con construcciones hexavalentes de un tamaño muy similar a IMTXTRICEA α S (Compte *et al.*, 2018).

Por tanto, en términos de una mayor eficacia antitumoral, el perfeccionamiento terapéutico de IMTXTRICEA α S respecto a IMTXCEA α S se fundamentaría en la mejora de sus propiedades de localización tumoral y en aumento de la carga tóxica alcanzando las células diana. Así, estos resultados abundan en la idoneidad de la plataforma *trimerbody* como como armazón para el diseño de anticuerpos y moléculas bioactivas, derivadas de éstos, con fines diagnósticos y terapéuticos frente al cáncer (Sánchez-Arévalo Lobo *et al.*, 2006; Cuesta *et al.*, 2019; Nuñez-Prado *et al.*, 2015; Compte *et al.*, 2018; Ríos *et al.*, 2019). Además, mediante el uso de la plataforma ATTACK (Álvarez-Cienfuegos *et al.*, 2016), se podrían diseñar de forma sencilla inmunotoxinas triméricas con dominios marcadores dirigidos frente a múltiples antígenos tumorales; pudiendo incrementar su especificidad antitumoral, contribuyendo a evitar el escape tumoral provocado por la pérdida de expresión del antígeno diana y, por tanto, mejorar considerablemente la efectividad de los tratamientos (Harwood *et al.*, 2017; Ott *et al.*, 2017).

En lo que respecta al diseño de inmunotoxinas basadas en el anticuerpo monodominio VHHCEA5v2, tanto VHHCEA5v2 α S como su anticuerpo parental fueron expresados y purificados a homogeneidad con un rendimiento muy elevado, sensiblemente mayor al obtenido con las inmunotoxinas basadas en scFv. Su caracterización estructural confirmó la existencia de un plegamiento consistente con sus estructuras secundarias teóricas, ricas en lámina β . El registro de sus perfiles de desnaturalización térmica validó la alta estabilidad estructural descrita para el VHHCEA5v2 (Vaneycken *et al.*, 2010), si bien mostró una reducción considerable para la inmunotoxina derivada. En cualquier caso, esta limitación termodinámica, producida por la introducción de α -sarcina en

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VHHCEA5v2 α S -al igual que sucede en IMTXCEA α S respecto aMFE23 scFv- no parece tener un impacto reseñable sobre la estabilidad y la funcionalidad de VHHCEA5v2 α S tras ser sometida a condiciones mimetizando las fisiológicas.

Sin embargo, sorprendentemente, los ensayos de unión a antígeno mostraron una capacidad de unión a CEA por parte de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S drásticamente menor a la esperada. Así, aunque, tanto en ensayos de ELISA como de citometría de flujo, estas dos construcciones mostraron una unión a CEA semejante, su capacidad de unión fue significativamente menor a la registrada para MFE23 scFv. En cambio, en estudios previos ambos anticuerpos recombinantes aparecen descritos como poseedores de altas afinidades por CEA con parámetros de unión muy similares (**Graff et al., 2004; Vaneycken et al., 2010**). Estas diferencias en el comportamiento de VHHCEA5v2 no se explican ni sobre la base de una posible glicosilación producida por su expresión en *P. pastoris*, cuya localización interfiriese directa o indirectamente sobre el reconocimiento del antígeno, ni por la presencia de la extensión de histidinas C-terminal utilizada en nuestras construcciones; dado que la secuencia de VHHCEA5v2 no presenta ningún sitio potencial de glicosilación y que la molécula de VHHCEA5v2 descrita por Vaneycken *et al.* también presenta una extensión de histidinas con la misma localización.

De cualquier modo, aunque la unión de VHHCEA5v2 sobre su antígeno fue considerablemente menor a la esperada, la fusión de α -sarcina en posición C-terminal del *nanobody* no produjo ninguna reducción adicional de esta. Este hecho, sumado a que VHHCEA5v2 α S presentó inalterada la actividad ribonucleolítica propia de su dominio tóxico, animó a proseguir su caracterización funcional con el claro objetivo de comprobar en qué medida esta reducción en la actividad de VHHCEA5v2 expresado en *P. pastoris* condicionaba su efectividad citotóxica.

El estudio del efecto de VHHCEA5v2 y VHHCEA5v2 α S sobre cultivos de células HeLa, HeLa-CEA y SW1222; demostró que únicamente VHHCEA5v2 α S, pero no VHHCEA5, produjo una citotoxicidad específica y dosis-dependiente sobre las células CEA-positivas, no observándose efecto alguno sobre las células CEA-negativas. Aunque este resultado fue consistente a nivel cualitativo con el mecanismo de acción de las inmunotoxinas, cuantitativamente, su efecto sobre la inhibición de la biosíntesis de proteínas en células SW1222 mostró una IC₅₀ significativamente mayor que la descrita para IMTXCEA α S (330 vs 60 nM, respectivamente).

Este resultado, junto con los datos obtenidos para la unión de la inmunotoxina VHHCEA5v2 α S sobre las células CEA-positivas, sugiere que su reducido efecto

citotóxico *in vitro*, en relación con la también monomérica IMTXCEA α S, se debe a su menor capacidad de marcaje antigénico. Además, este “defecto” en sus capacidades de unión no parece originarse en la presencia de α -sarcina en el extremo C-terminal de la construcción; sino que, según lo mostrado, sería algo intrínseco a nuestro VHHCEA5v2 producido en *P. pastoris*. Por tanto, debido a estas evidentes limitaciones, la actividad antitumoral de la VHHCEA5v2 α S no fue ensayada *in vivo*, puesto que su reducida capacidad citotóxica *in vitro* no permite una comparación adecuada con IMTXCEA α S que nos informe sobre en qué medida su menor tamaño, a través de una mayor capacidad de penetración tumoral, influye sobre la potencia de su efecto antitumoral *in vivo*.

De este modo, teniendo en cuenta nuestros resultados y la literatura existente sobre inmunotoxinas basadas en VHH (**Geoghegan et al., 2015; Bachran et al., 2017; Deng et al., 2017**), el diseño efectivo de construcciones formadas por un VHH y α -sarcina sería perfectamente viable; pero implica, inequívocamente, la utilización de dominios marcadores con una funcionalidad intacta.

En suma, en primer lugar, el trabajo aquí presentado confirma el elevado potencial de CEA como diana terapéutica para el direccionamiento de inmunotoxinas antitumorales. Por un lado, las construcciones desarrolladas, basadas en MFE23 scFv y α -sarcina, presentan la elevada citotoxicidad, altamente específica, semejante a la descrita para otras inmunotoxinas basadas en scFv y esta ribotoxina. Además, mediante la aplicación del diseño *trimerbody* a estos componentes se ha obtenido una inmunotoxina trimérica, IMTXTRICEA α S, con propiedades citotóxicas y antitumorales *in vivo* significativamente mejoradas frente a su análogo monomérico. De este modo, nuestros resultados indican que la utilización de formatos de anticuerpos multivalentes otorga a las inmunotoxinas una mayor capacidad de unión a su antígeno diana, una mejor biodistribución *in vivo* y una mayor carga tóxica, que conduce a una reducción en la dosis necesaria para provocar el mismo efecto antitumoral que sus análogos monoméricos, reduciendo de este modo la posibilidad de provocar efectos secundarios no específicos. Por tanto, el desarrollo de construcciones recombinantes multivalentes se presenta como una prometedora alternativa para el diseño de la siguiente generación de inmunotoxinas antitumorales.

BLOQUE II.

DESARROLLO DE DOS INMUNOTOXINAS DIRIGIDAS FRENTE A LA ALERGIA

1.-Antecedentes

1.1.-Enfermedad alérgica respiratoria

Las alergias o reacciones de hipersensibilidad de tipo I son desórdenes inmunológicos caracterizados por una pérdida de tolerancia frente a ciertos antígenos ambientales ubicuos e ino cuos, denominados alérgenos. Entre sus manifestaciones clínicas más relevantes se encuentran el asma, la rinoconjuntivitis, la dermatitis atópica, la urticaria, diversos trastornos digestivos y la anafilaxia (**Galli et al., 2008**). En las últimas décadas, la prevalencia de estas enfermedades ha aumentado considerablemente, en especial en los países de renta media y baja, afectando en la actualidad a más de un 30% de la población mundial (**Pawankar et al., 2013; Pawankar, 2014; Brozek et al., 2015**). Con notables efectos negativos sobre la calidad de vida de las personas que las sufren, y un elevado impacto social y económico, las alergias representan un problema de salud pública de primer orden, requiriendo en la actualidad y en un futuro próximo, dada su tendencia creciente, de la realización de enormes esfuerzos para su prevención, diagnóstico y tratamiento adecuados (**Pawankar et al., 2014**).

Respecto al desarrollo de estas patologías, en los individuos sanos, el sistema inmune discrimina los estímulos patogénicos y no patogénicos, respondiendo apropiadamente a ellos, protegiendo al anfitrión frente a señales estimuladoras exageradas y proporcionando un estado de tolerancia inmune antígeno-específica (**Akdis, 2012**). Por el contrario, en aquellos individuos susceptibles, las enfermedades atópicas se manifiestan mediante una sensibilización alérgeno-específica caracterizada por la producción de anticuerpos IgE frente a esas sustancias. El desarrollo de la alergia está influido por múltiples factores, tanto intrínsecos (genética, sexo, edad) como extrínsecos (ambientales, estilo de vida), estando sus manifestaciones clínicas condicionadas por el grado de afectación de los órganos diana y por la presencia de determinados agentes agravantes, como son las infecciones por patógenos y los contaminantes ambientales (**Larche et al., 2006; Akdis, 2012; Akdis & Akdis, 2012**).

Los alérgenos, mayoritariamente proteínas o glicoproteínas, pero también hidratos de carbono o productos químicos de bajo peso molecular, como isocianatos y anhídridos; se encuentran presentes en diferentes fuentes ambientales, entre ellas pólenes, epitelios y heces de animales, alimentos, venenos de insectos y fármacos (**Kennedy et al., 2013; Scheurer et al., 2015; Woodfolk et al., 2015; Warrington et al., 2018**). Según su naturaleza y origen, estas sustancias presentan diferentes vías de acceso al organismo (contacto directo, inhalación, ingestión o inyección) y con una exposición

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

preferencial a través de determinadas áreas corporales (vías respiratorias, tracto gastrointestinal, epidermis, subcutánea) que desempeña un rol determinante en la sintomatología particular de los diversos procesos alérgicos (**Galli et al., 2008**).

1.1.1.-Mecanismo etiopatológico

En el caso de las alergias respiratorias, en los individuos atópicos, aeroalérgenos de diversos orígenes (pólenes, heces de ácaros e insectos, epitelios de animales, esporas de mohos y levaduras) son inhalados, entrando en contacto con las mucosas respiratorias donde producen un proceso inflamatorio local responsable de su sintomatología más destacada (**Kim et al., 2008**). La rinitis y el asma alérgico son afecciones heterogéneas que comparten una elevada comorbilidad y un mecanismo fisiopatológico semejante (**Galli et al., 2008; Kim et al., 2008**). De hecho, en la actualidad, ambas condiciones son entendidas como manifestaciones diferentes de un único síndrome, el síndrome respiratorio alérgico crónico, explicándose sus variaciones sintomatológicas sobre la base de las diferentes estructuras afectadas (**Togias et al., 2003**). En la rinitis, frecuentemente acompañada de conjuntivitis, la irritación de la mucosa nasal provoca secreciones, picor, obstrucción y, en ocasiones, pérdida de olfato; mientras que el asma se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias inferiores, presentando un incremento en la producción de moco, hiperreactividad bronquial, angioedema, broncoconstricción, sibilancias y falta de aire (**Togias et al., 2003; Bope et al., 2005**). En ambos casos, la exposición repetida o persistente a los alérgenos produce una cronificación de la inflamación, causante de alteraciones estructurales a largo plazo en los órganos afectados y de anomalías sustanciales en su funcionamiento, responsables del cuadro sintomatológico de esta enfermedad (**Galli et al., 2008**).

El mecanismo fisiopatológico de las alergias respiratorias, y en general de las hipersensibilidades de tipo I, incluye dos etapas diferenciadas, una de sensibilización y otra de provocación. En la primera de ellas, los alérgenos inhalados acceden a las mucosas respiratorias, donde son capturados por las células presentadoras de antígeno (APC; células de Langerhans, macrófagos, células B y, principalmente, células dendríticas) en compartimentos vesiculares intracelulares, siendo posteriormente procesados enzimáticamente en endosomas y lisosomas (**Galli et al., 2008**). Una vez activadas, las células dendríticas migran a los nódulos linfáticos locales, donde los péptidos resultantes son presentados a los linfocitos T *naive* CD4+ mediante su acoplamiento a los complejos de histocompatibilidad de clase II (MHC-II o HLA-II en

humanos) promoviendo bajo determinadas condiciones su polarización a linfocitos colaboradores de tipo 2 (Th2) (**Pichavant et al., 2005**). Los linfocitos Th2, a través de la producción de IL-4 e IL-13, estimulan el cambio de isotipo de la inmunoglobulina asociada a los linfocitos B, induciendo su diferenciación en células productoras de IgE alérgeno-específicos y la producción de estos anticuerpos IgE solubles (**Minton, 2008**). Las IgEs producidas se distribuyen por el organismo, uniéndose a los receptores de IgE de alta afinidad (FcεRI) presentes en células granulocíticas, células dendríticas, mastocitos y basófilos. Además, como consecuencia de esta sensibilización, el individuo queda provisto de una población remanente de linfocitos Th2 y B alérgeno-específicos de memoria que se activarán en caso de re-exposiciones posteriores al alérgeno (**Figura 1 A**) (**Woodfolk, 2007; Shamji & Durham, 2017**).

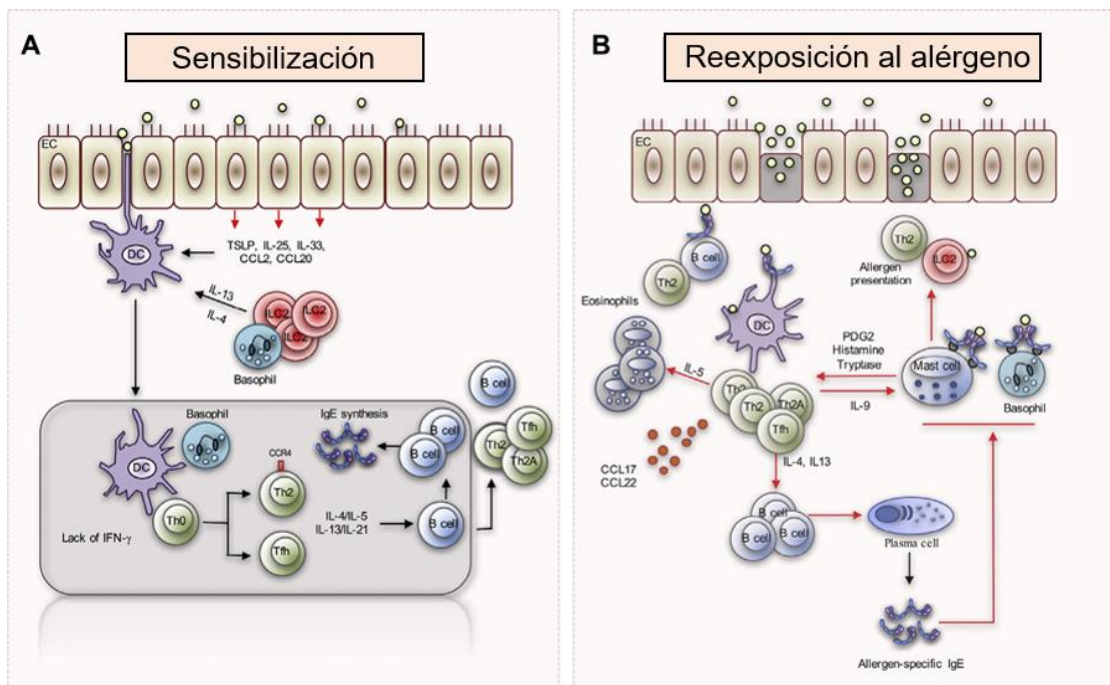


Figura 1. Mecanismos de la inflamación alérgica respiratoria. Resumen de las respuestas inmunes frente a los desencadenantes iniciales de la sensibilización alérgica (A) y de la inflamación alérgica tras la re-exposición a alérgenos inhalantes (B). Adaptado de **Shamji y Durham, 2017**.

En la etapa de provocación, la re-exposición al alérgeno causa su contacto con la IgE presente en la membrana de las células efectoras (mastocitos y basófilos), desencadenando el entrecruzamiento de los complejos IgE-receptor de IgE de alta afinidad (FcεRI) y su activación celular. Dicha activación se traduce en tres tipos de respuestas biológicas: a) secreción por exocitosis del contenido de gránulos preformados en el interior de las células cebadas, conteniendo histamina (**Naclerio et al., 1985**), heparina, proteasas (**Castells & Schwartz, 1988**), etc.; b) síntesis y secreción de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico, entre ellos diversos leucotrienos, el factor de activación plaquetario y la prostaglandina D₂ (**Serrano-Mollar**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

& Closa, 2005), y c) síntesis y secreción de diversas citoquinas y quimioquinas, como la IL-4 y el factor quimiotáctico de eosinófilos (ECF), que perpetúan y expanden la inflamación tipo Th2. La acción biológica de estos mediadores es responsable de la sintomatología asociada a las patologías alérgicas, causando vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, edema y cambios agudos en la funcionalidad de los órganos afectados (broncoconstricción, secreción de moco, urticaria) (**Soyer et al., 2013**). Además, durante la re-exposición alérgica, la IgE también participa facilitando el procesamiento y presentación peptídica de los alérgenos por las células dendríticas y los linfocitos B, a través de su unión a FcεRI y al receptor de IgE de baja afinidad (FcεRII), respectivamente; promoviendo la amplificación y desarrollo de las respuestas Th2 alérgeno-específicas (**Figura 1 B**) (**Galli & Tsai, 2012**).

Además, esta fase temprana de la respuesta alérgica puede estar seguida de una reacción tardía, sucedida entre 6 y 12 horas después de la exposición alérgica, y provocada por la acumulación y expansión local de leucocitos inflamatorios (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2). Estas células, reclutadas sobre el tejido por quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión endoteliales secretadas durante la respuesta alérgica temprana, se reactivan y expanden liberando nuevos mediadores inflamatorios y citoquinas de tipo 2, que perpetúan la respuesta inflamatoria, causando el estrechamiento de las vías respiratorias y la hipersecreción de moco característicos de las alergias respiratorias (**Durham et al., 1992; Galli et al., 2008**).

1.1.2.-Células innatas linfoides tipo 2

Como se ha comentado anteriormente, los principales eventos fisiopatológicos de las enfermedades alérgicas, incluyendo la activación IgE-dependiente de los mastocitos, la hipersecreción de moco y la eosinofilia tisular, son provocados por la acción de las citoquinas de tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-13, principalmente), cuya producción ha sido atribuida mayoritariamente a los linfocitos Th2 alérgeno-específicos (**Lloyd & Hessel; 2010**). Sin embargo, el papel protagonista desempeñado por el sistema inmune innato junto al reciente descubrimiento en humanos de las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2s) (**Allakhverdi et al., 2009**) y su implicación en el mecanismo etiopatogénico de la inflamación alérgica ha modificado profundamente las nociones preexistentes en torno al desarrollo y progresión de estas enfermedades (**Doherty & Broide, 2015; van Rijt et al., 2016; Shamji & Durham, 2017; Starkey et al., 2019**).

Las células ILC2s han sido descritas como una población de linfocitos innatos (ILCs) carente de marcadores de linaje y del receptor específico de antígeno de los linfocitos Th2, pero positiva para la expresión de c-kit, Sca-1, IL-7R α y ST2; y productora de citoquinas de tipo 2 mediante un mecanismo de acción independiente de antígeno (Moro *et al.*, 2010; Neill *et al.*, 2010; Mjosberg *et al.*, 2011; Halim *et al.*, 2014).

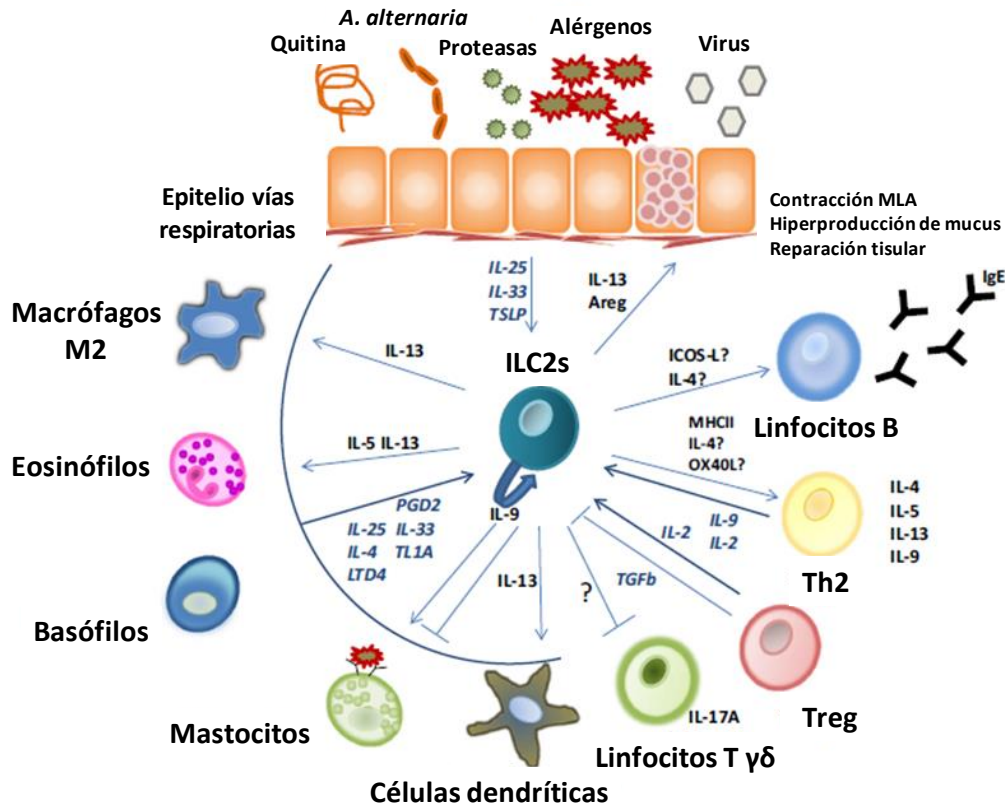


Figura 2. Principales interacciones de las células ILC2s en la inmunopatología del asma alérgico. Las células ILC2s responden a las alarminas, IL-25, IL-33 o TSLP, producidos por las células del epitelio respiratorio en respuesta a alérgenos, virus o helmintos. También pueden ser activadas por las células inmunes innatas a través de PGD2, LTD4, TL1A, IL-25, o IL-33. Su producción de IL-5 e IL-13 contribuye a la eosinofilia, hiperproducción de mucus e hiperreactividad de las vías respiratorias, produce la acumulación de macrófagos alternativamente activados y promueve la migración de células dendríticas del pulmón a los nódulos linfáticos. Además, las células ILC2s también interactúan con los linfocitos T y B, así como con las células del epitelio respiratorio. Adaptado de van Rijjt *et al.*, 2016.

Entre sus funciones se encuentran el mantenimiento de la inmunidad y la homeostasis tisular en las barreras epiteliales (piel, tracto gastrointestinal, vías respiratorias), participando en la respuesta inmune adaptativa de tipo 2, la regulación del desarrollo del tejido linfoide, la reparación tisular y el metabolismo de glúcidos y grasas (Monticelli *et al.*, 2011; Bar-Ephraim & Mebius, 2016; Wilhem *et al.*, 2017; Starkey *et al.*, 2019). Además, debido a su capacidad para producir elevadas cantidades de citoquinas de tipo 2 (IL-5 e IL-13, principalmente), las células ILC2s ejercen como actores fundamentales en la iniciación y el mantenimiento del mecanismo inmunopatológico inflamatorio subyacente a la rinitis, el asma, la dermatitis atópica y la enfermedad alérgica

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

gastrointestinal (**Neill et al., 2010; Halim et al., 2014; Doherty & Broide, 2015; Starkey et al., 2019**).

Respecto a la alergia respiratoria, las células ILC2s pulmonares pueden ser activadas por diferentes factores, incluyendo varias citoquinas, prostaglandinas (**Barnig et al., 2013**) y leucotrienos (**Figura 2**) (**Doherty et al., 2013**). Entre sus estímulos activadores destacan las citoquinas derivadas del epitelio -IL-25 (**Hams et al., 2012**), IL-33 (**Imai et al., 2013**) y linfopoyetina estromal tímica (TSLP) (**Kim et al., 2013**)-, que son secretadas como consecuencia de la estimulación alérgica u otro estímulo dañino, como diversas proteasas o la quitina procedente de helmintos. Estas citoquinas han mostrado un papel destacado en la iniciación de la respuesta inflamatoria mediada por las células ILC2s (**Barlow & McKenzie, 2014**), si bien su contribución relativa a este proceso es específicamente dependiente del tejido y estado de la patología (**van Rijt et al., 2016; Kouser et al., 2017**).

La activación antígeno-independiente de las células ILC2s implica su expansión poblacional y una potente producción de citoquinas proinflamatorias de tipo 2, que sitúa a estas células en una posición intermediaria entre la respuesta inmune innata y la respuesta proinflamatoria antígeno-dependiente propia de la inmunidad adquirida (**Figura 2**). Por tanto, a través de la secreción de estas citoquinas (mayoritariamente IL-5 e IL-13, pero también IL-4) y otros mediadores, las células ILC2s generan una respuesta inflamatoria alternativa, que favorece de forma directa el reclutamiento y activación local de células dendríticas y eosinófilos, y la activación de linfocitos B vía Th2 para la síntesis de IgE antígeno-específica; contribuyendo en conjunto a la sensibilización alérgica, la inflamación de la mucosa, la hipersecreción de moco, la hiperreactividad de las vías aéreas y la remodelación tisular en el epitelio subyacente (**Doherty & Broide, 2015; van Rijt et al., 2016; Starkey et al., 2019**). Además, las células ILC2s presentan la capacidad de adquirir un fenotipo de memoria, perdurando en el tejido una vez que la inflamación ha desaparecido, pudiendo responder posteriormente frente a alérgenos no relacionados, promoviendo la exacerbación y cronificación de la enfermedad (**Christianson et al., 2015; Martínez-González et al., 2016**).

En este proceso de polarización de la respuesta inflamatoria de tipo 2 en el epitelio respiratorio, IL-33 desempeña una función fundamental, al actuar como un factor de crecimiento y activación de las células ILC2s y otras poblaciones inmunes involucradas en las respuestas inmunes innatas y adaptativas frente a diversos patógenos y alérgenos respiratorios. Por este motivo, la desregulación de la señalización por IL-33

puede actuar en determinados contextos patológicos como un potente inductor de las enfermedades alérgicas respiratorias y de otras enfermedades inflamatorias crónicas (Lloyd, 2010; Paul & Zhu, 2010; Griesenauer & Paczesny, 2017; Chen *et al.*, 2018, Gabrielska *et al.*, 2019).

1.1.3.-Señalización por IL-33/ST2

IL-33 es un miembro de la familia de citoquinas de la IL-1 que desempeña múltiples roles en la homeostasis tisular, el metabolismo energético y la defensa frente a patógenos en diferentes órganos (pulmón, piel, riñón, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y sistema gastrointestinal); incluyendo tanto funciones inmunes de respuesta, como protectoras y reparadoras (Liew *et al.*, 2016). Además, participa de forma destacada en la patogénesis de varias afecciones inflamatorias, incluyendo diversas enfermedades alérgicas (Liew *et al.*, 2016; Griesenauer & Paczesny, 2017), autoinmunes (Pei *et al.*, 2014; Theoharides *et al.*, 2015), infecciosas (Donovan *et al.*, 2016), cardiovasculares (Tu *et al.*, 2013) y cancerígenas (Larsen *et al.*, 2018).

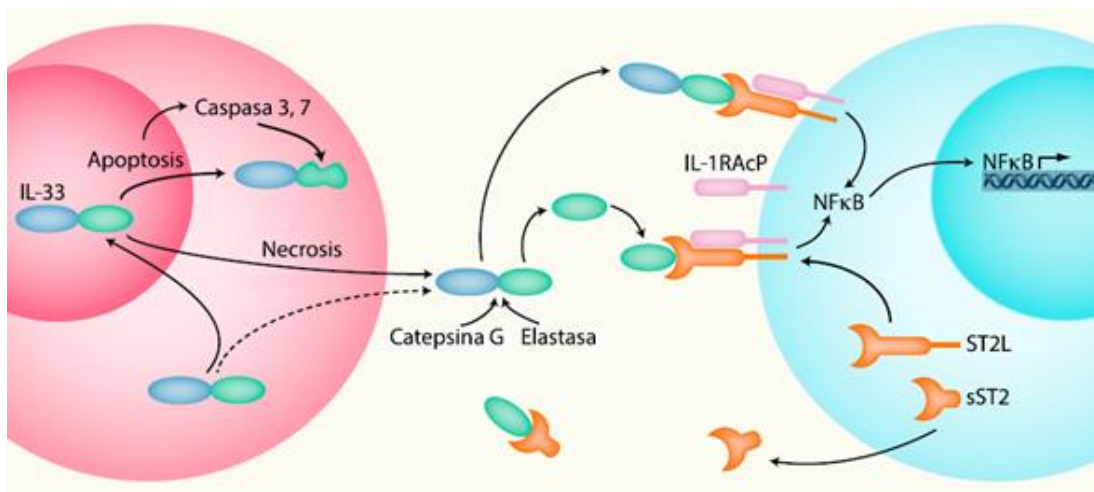


Figura 3. Mecanismo molecular de la señalización por IL33/ST2. Los principales eventos implicados en este mecanismo incluyen: a) la liberación de IL-33 al espacio extracelular en caso de necrosis celular, en oposición a su inactivación vía caspasa 3 y 7 durante los eventos apoptóticos, b) su procesamiento por proteasas extracelulares dando lugar a formas de IL-33 con mayor capacidad de unión a ST2 y c) su bloqueo por sST2 restringiendo la disponibilidad de IL-33 soluble capaz de unirse a ST2 en las células diana. Adaptado de Molofski *et al.*, 2015.

IL-33 se expresa constitutivamente en las barreras epiteliales y las células endoteliales, localizándose primariamente en el núcleo celular (Moussion *et al.*, 2008; Pichery *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a situaciones de daño tisular o lesión, IL-33 es rápidamente liberada al espacio extracelular donde se une a su receptor específico ST2, situado en la membrana de sus células diana, activando los mecanismos inmunes de la respuesta inflamatoria de tipo 2. Por este motivo, IL-33 ha sido clasificada como una “alarmina” o molécula indicadora de daño tisular (Carriere *et al.*, 2007; Lefrancais *et*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

al., 2012). El complejo receptor de IL-33 consiste en dos subunidades: ST2, subunidad específica de IL-33, y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP) (**Pychery et al., 2012; Cayrol & Girard, 2014**). ST2 existe en dos variantes transcripcionales alternativas, una forma transmembrana de mayor longitud, propiamente ST2; y una forma soluble, sST2, que carece de dominio transmembrana y actúa como un receptor señuelo previniendo la señalización a través de ST2 mediante el secuestro de IL-33 soluble (**Hayakawa et al., 2007; Mildner et al., 2010**). La señalización por IL-33, se produce mediante su unión a ST2 y la posterior asociación con el receptor accesorio IL-1RAcP formando un complejo heterotrimérico, IL-33/ST2/IL-1RAcP, que induce la señalización intracelular dependiente de MyD88 e IRAK1/4, activando las rutas de NF- κ B, JNK y ERK (**Ali et al., 2007; Chackerian et al., 2007; Liew et al., 2016**) (**Figura 3**).

La activación de la señalización por IL-33/ST2 desencadena múltiples respuestas inmunes pleiotrópicas implicando a diversas células expresando ST2 (**Griesenauer & Paczesny, 2017**), entre las que se incluyen linfocitos Th2 (**Lohning et al., 1998**), linfocitos T reguladores (**Schiering et al., 2014**), células ILC2s (**Neill et al., 2010**), macrófagos polarizados M2 (**Kurowska-Stolarska et al., 2009**), mastocitos (**Moritz et al., 1998**), eosinófilos (**Cherry et al., 2008**), basófilos (**Suzukawa et al., 2008**), neutrófilos (**Suzukawa et al., 2008**) y linfocitos NK inflamatorios (**Smithgall et al., 2008**). En estas células, IL-33 activa preferencialmente la respuesta inflamatoria tipo 2 mediante la polarización de los macrófagos al fenotipo M2 y la promoción de la síntesis de citoquinas de tipo 2 por las células ILC2s y los linfocitos Th2 (IL-5 y IL-13, principalmente), así como por los mastocitos (IL-4, IL-5, IL-6) (**Griesenauer & Paczesny, 2017; Tu et al., 2017**). De este modo, el eje IL-33/ST2 parece representar un papel crítico en la sensibilización y la promoción de la patología alérgica, y en particular en la génesis y fisiopatología del asma, la rinoconjuntivitis y la dermatitis atópica (**Garlanda et al., 2013; Griesenauer & Paczesny, 2017**).

La relevancia clínica de las células ILC2s y la señalización por IL-33/ST2 en la alergia respiratoria ha sido recogida por diferentes estudios. Los pacientes asmáticos presentan una mayor cantidad de células ILC2s (**Christianson et al., 2015**) y una mayor expresión de ST2 respecto a los sujetos control (**Spooner et al., 2013; Yagi et al., 2014**). Así mismo, los niveles de IL-25, IL-33 y células ILC2s en las vías respiratorias y la sangre de pacientes con rinitis y asma alérgicos fueron superiores durante la temporada de polinización o tras sufrir una estimulación alérgica (**Corrigan et al., 2011; Lao-Araya et al., 2014; Smith et al., 2016**); correlacionándose positivamente, junto a los niveles de IL-5 e IL-13, con la severidad de los síntomas mostrados (**Hirose et al., 2017**). Además, recientes análisis genómicos han relacionado polimorfismos en los genes codificantes

para IL-33, ST2, ROR α e IL-13 -críticos para el desarrollo y la activación de las células ILC2s- con una elevada susceptibilidad a padecer asma tipo 2 (**Moffat et al., 2010; Stadhouders et al., 2018**).

En conjunto, estos resultados presentan a las células ILC2s y a la vía de señalización IL-33/ST2 como actores críticos e interrelacionados en la iniciación, progresión y cronificación del mecanismo inflamatorio de tipo 2 asociado a las patologías alérgicas respiratorias. Por tanto, ambos actores representan dianas terapéuticas prometedoras para el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos frente a la enfermedad alérgica, en especial frente a aquellos procesos crónicos y refractarios a los tratamientos convencionales, como el asma severo resistente a corticoides y la rinoconjuntivitis crónica (**Starkey et al., 2019**). Además, debido a la multiplicidad de procesos fisiológicos en los que participa la señalización por IL-33/ST2, la modulación de este eje también representa una estrategia potencial para el tratamiento de otros desórdenes inmunes caracterizados por la desregulación de la señalización por citoquinas de tipo 2, entre los que se incluyen varias enfermedades inflamatorias pulmonares, cardiovasculares, renales, gastrointestinales y del sistema nervioso central (**Griesenauer & Paczesny, 2017; Chen et al., 2018**).

1.2.-Tratamiento de la enfermedad alérgica respiratoria

Según su forma de intervención sobre el mecanismo etiopatogénico de la enfermedad, los tratamientos existentes frente a las patologías alérgicas se dividen en tres grandes bloques: preventivo, sintomático y etiológico. El tratamiento preventivo está basado en la máxima terapéutica de la evitación de los agentes causantes de una patología mediante la aplicación de una serie de pautas conductuales para la minimización de la exposición alérgica. Aunque indudablemente resulta el tratamiento más efectivo, su consecución total no es siempre factible, pudiendo llegar a ser prácticamente imposible en procesos como la alergia respiratoria, causada por alérgenos ambientales cuya evitación absoluta es difícilmente alcanzable (**Garrote & Bonet, 2004**).

El tratamiento sintomatológico incluye la administración de diferentes fármacos que actúan contrarrestando o compensando diferentes procesos del mecanismo patogénico de las reacciones alérgicas responsables de sus manifestaciones sintomatológicas y clínicas. Al no tener efecto sobre la progresión de la enfermedad, este tipo de tratamiento exige una administración repetida mientras persistan los síntomas, lo que frecuentemente significa de por vida, a no ser que se produzca una desensibilización espontánea o terapéutica del paciente. Entre las familias de fármacos utilizadas para el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tratamiento de la alergia respiratoria se incluyen los antihistamínicos, diferentes broncodilatadores (metilxantinas, anticolinérgicos y agonistas β_2 de larga duración), los corticoides, los cromomas, los antagonistas del receptor de leucotrienos y los macrólidos inmunomoduladores (**Schultz & Martin, 2013**).

Por último, los tratamientos etiológicos (curativos) son acciones dirigidas frente a las causas subyacentes de la enfermedad, con el objetivo de lograr la recuperación de la tolerancia y el restablecimiento de una respuesta inmune adecuada. La inmunoterapia alérgeno-específica (AIT) es, hasta la fecha, el único tratamiento curativo para las patologías alérgicas reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Su mecanismo de acción, basado en la administración controlada y progresiva de un extracto alérgico, actúa sobre la base inmunopatológica de la enfermedad, de modo que no solo promueve una mejora sintomática duradera, sino que mediante la inducción de la tolerancia inmune alérgeno-específica es capaz de modificar el curso natural de la misma proveyendo de una curación a largo plazo. Su aplicación clínica ha resultado efectiva frente a la rinoconjuntivitis y el asma alérgico, las alergias alimentarias y la anafilaxia inducida por venenos (**Burks et al., 2013; Jutel et al., 2016**).

1.2.1.-Terapias mediante agentes biológicos

Pese a los importantes avances realizados en el tratamiento de las enfermedades alérgicas, aproximadamente el 5-10% de la población con estas patologías presenta asma recurrente o dermatitis atópica severa inadecuadamente controlados. Por este motivo, el desarrollo de terapias alternativas -más efectivas y con menores efectos adversos- frente a estas patologías persiste como uno de los retos fundamentales para la investigación biomédica contemporánea. Estas nuevas terapias deberían consistir en tratamientos curativos dirigidos a superar las limitaciones de los medicamentos farmacológicos actuales, que en su mayoría únicamente alivian temporalmente los síntomas clínicos de la enfermedad mediante la supresión de la inflamación (**Bousquet et al., 2009; Aktis, 2014**), y de la AIT, que aunque en ocasiones puede proveer de una curación a largo plazo, normalmente solo presenta un efecto moderador de la enfermedad conduciendo a una mejoría sintomática y a un descenso en la necesidad de tratamiento de control (**Durham et al., 2010 Aktis & Aktis, 2012**).

En este sentido, la terapia biológica se presenta como un tipo de inmunoterapia sistémica capaz de modular de forma dirigida el mecanismo patogénico de la enfermedad alérgica, provocando una mejora en su curso y/o sintomatología. Siendo empleada actualmente en el tratamiento de numerosas enfermedades, incluyendo el

cáncer y diferentes patologías autoinmunes e inflamatorias, su aplicación en el campo de las enfermedades alérgicas está especialmente enfocada al tratamiento de aquellos procesos alérgicos severos, que como el asma crónico refractario se muestran resistentes a la AIT y cuya sintomatología no puede ser controlada adecuadamente mediante los medicamentos habituales. Además, la especificidad de su mecanismo de acción convierte a los terapéuticos biológicos en herramientas idóneas para una medicina de precisión, personalizada y ajustada a las condiciones concretas de cada paciente, especialmente en aquellos procesos cuya heterogeneidad clínica y patogénica dificultan su tratamiento convencional (**Katial et al., 2017; Busse et al., 2019**). Entre las diferentes aproximaciones biológicas al tratamiento de las enfermedades alérgicas destacan aquellas basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales, incluyendo cuatro medicamentos aprobados para el tratamiento del asma, la rinitis y la dermatitis atópica refractarios (**Figura 4**), mediante los cuales se ha logrado disminuir significativamente la frecuencia de las exacerbaciones y la severidad de los síntomas de estas patologías (**Katial et al., 2017; Renert-Yuval & Guttman-Yassky, 2018; Tsetsos et al., 2018; Busse et al., 2019**).

El mecanismo de acción de estos anticuerpos terapéuticos está dirigido a la neutralización específica de determinadas moléculas que desempeñan un rol fundamental en la respuesta inflamatoria de tipo 2, comprendiendo dos aproximaciones principales según la diana molecular utilizada: la terapia anti-IgE y la terapia antagonista de citoquinas de tipo 2 (**Figura 4**) (**Katial et al., 2017; Busse et al., 2019**).

Terapia anti-IgE

La IgE desempeña un rol fundamental en la fisiopatología de las hipersensibilidades de tipo I, incluyendo la enfermedad alérgica respiratoria, la dermatitis atópica y la anafilaxis causada por alimentos o venenos de himenóptero (**Gould & Sutton, 2008**). Mediante su unión a FcεRI sensibiliza a mastocitos y basófilos para la liberación de mediadores inflamatorios en respuesta a la estimulación alérgica (**Stone et al., 2010; Galli & Tsai, 2012**). Además, su unión a FcεRI o FcεRII puede servir para la amplificación de la respuesta inmune alérgica mediante la facilitación de la presentación de antígeno por las células dendríticas y los linfocitos B, respectivamente (**Galli & Tsai, 2012**).

La principal aproximación de la terapia biológica anti-IgE está basada en el uso de anticuerpos bloqueantes, que mediante su unión a la región Fc de la IgE soluble neutralizan sus funciones biológicas al impedir su unión a sus receptores (**Figura 4**). Entre estos anticuerpos destaca el omalizumab (Xolair, Genentech/Novartis), el único agente terapéutico anti-IgE disponible para uso clínico, aprobado para el tratamiento del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

asma moderado y severo (**Pelaia et al., 2011**); cuya administración ha provocado una mejora general en la calidad de vida de los pacientes, una reducción en los síntomas de la enfermedad, y una disminución significativa en la frecuencia de las exacerbaciones y la necesidad de medicación de control (**Busse et al., 2001; Soler et al., 2001; Hanania et al., 2011; Deschildre et al., 2015**). Además, omalizumab parece prevenir nuevas sensibilizaciones, detener la progresión de la enfermedad (**Molinari et al., 2014**), y recientemente se ha demostrado también efectivo para ciertos casos de rinosinusitis (**Pelaia et al., 2011**), alergia alimentaria (**Rafi et al., 2010**), dermatitis atópica (**Sheinkopf et al., 2008**) y urticaria autoinmune crónica (**Kaplan et al., 2008**).

Estos efectos clínicos reflejan la capacidad de omalizumab para reducir la concentración de IgE libre en sangre, bloqueando su unión al receptor FcεRI en la membrana de las células efectoras, evitando la liberación alérgeno-dependiente de mediadores proinflamatorios y reduciendo la expresión de FcεRI en mastocitos, basófilos y células dendríticas por un mecanismo de regulación negativa (**MacGlashan, et al. 1997; Beck et al., 2004; Prussin et al., 2013**).

En conjunto, la experiencia clínica con omalizumab apoya el conocimiento acumulado sobre el rol fundamental de la IgE y la potencialidad de su utilización como diana terapéutica en las patologías alérgicas, contribuyendo al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas frente a esta molécula. Entre ellas se encuentran el diseño de péptidos bloqueantes de la unión IgE-FcεRI (**Buku et al., 2008**), la vacunación anti-IgE mediante péptidos sintéticos (**Peng et al., 2007**), la potenciación de la regulación negativa de la señalización a través de FcεRI en mastocitos y basófilos (**Zhu et al., 2002**) y el desarrollo de un anticuerpo frente al epítipo principal M1 de la IgE anclada a membrana de los linfocitos B (**Gauvereau et al., 2014a; Harris et al., 2016**).

Terapia antagonista de citoquinas de tipo 2

Las citoquinas IL-4, IL5, e IL-13, producidas principalmente por los linfocitos Th2 y las células ILC2s, pero también por otras células inflamatorias como los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos, desempeñan un papel destacado en diversos procesos de la etiopatogenia de las enfermedades atópicas (**Shamji et al., 2017**). Este hecho, junto al incremento de sus niveles en la mucosa respiratoria, la piel y la sangre en determinados procesos alérgicos, ha impulsado su utilización como dianas terapéuticas frente a estas patologías (**Maes et al., 2012; Hanania et al., 2016; Bagnasco et al., 2018**).

Entre las principales estrategias terapéuticas basadas en la utilización de anticuerpos frente a la señalización por estas moléculas sobresalen la terapia anti-IL-5 y aquella dirigida frente a la subunidad α del receptor de IL-4 (IL-4Rα) (**Figura 4**). La primera

modalidad engloba tres anticuerpos terapéuticos aprobados para el tratamiento del asma severo eosinofílico, dirigidos tanto al bloqueo de IL-5 (mepolizumab, Nucala, GlaxoSmithKline; reslizumab, Cinqair, Teva Respirator) como de la subunidad α de su complejo receptor (IL-5R α) (benralizumab, Fasenera, MedImmune) (**Katial et al., 2017; Bagnasco et al., 2018; Markham et al., 2018**). Respectivamente, la terapia frente a IL-4R α (dupilumab, Dupixent, Regeneron/Sanofi) actúa neutralizando la señalización por IL-4 e IL-13, y ha sido aprobada para el tratamiento de la dermatitis atópica moderada y severa (**Wenzel et al., 2016**).

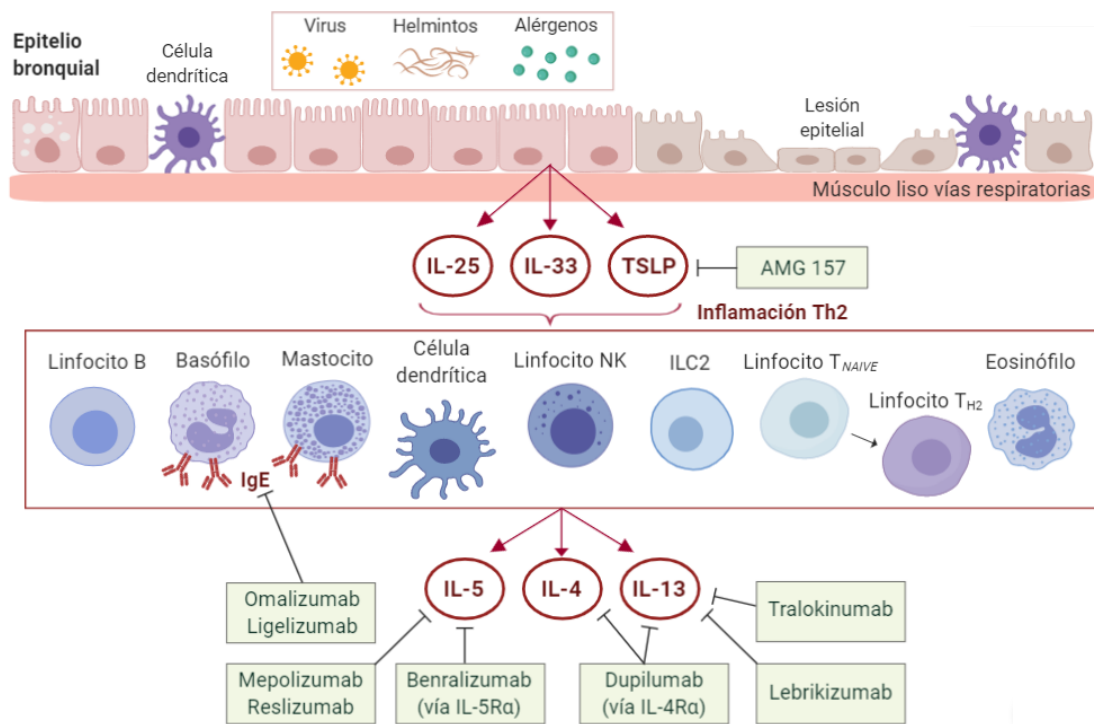


Figura 4. Dianas relevantes en la respuesta inflamatoria de tipo 2 para las terapias con anticuerpos bloqueantes. La imagen muestra las diferentes dianas moleculares y agentes terapéuticos aprobados y en desarrollo para el tratamiento de la inflamación alérgica de tipo 2.

Además, otras citoquinas implicadas en las respuestas inmunes de tipo 2 están siendo investigadas como dianas moleculares para el tratamiento de las enfermedades atópicas (**Figura 4**). Algunas de las aproximaciones más relevantes en este nuevo campo son el anticuerpo bloqueante anti-TSLP AMG 157 (**Gavreau et al., 2014b**) y los diferentes agentes dirigidos frente a las rutas de estimulación por IL-33 (**Chen et al., 2018**), IL-6 (**Chu et al., 2015**), IL-9 (**Antoniou, 2010**), IL-17 (**Busse et al., 2013**) e IL-25 (**Ballantyne et al., 2007; Shin et al., 2015**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.2.2.-Aproximaciones terapéuticas dirigidas a la señalización vía IL-33/ST2

En las últimas dos décadas se han desarrollado múltiples aproximaciones experimentales que bloquean la señalización por IL-33/ST2. Esta estrategia ha demostrado un elevado potencial terapéutico para el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias, siendo especialmente efectiva frente a las patologías crónicas pulmonares, como el asma alérgico severo y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (**Chen et al., 2018 Gabryelska et al., 2019**). Además, el reciente reconocimiento de las células ILC2s como actores fundamentales en la iniciación, progresión y cronificación de las respuestas inflamatorias de tipo 2, junto al papel destacado que desempeña la vía IL-33/ST2 en sus funciones patológicas, ha potenciado el interés en la investigación sobre los terapéuticos que actúan sobre estas dianas (**Gabryelska et al., 2019; Chen et al., 2018; Starkey et al., 2019**).

Las diferentes aproximaciones experimentales al bloqueo de IL-33/ST2 se dividen en tres clases, según el mecanismo por el que inhiban la unión de IL-33 a ST2: a) anticuerpos anti-IL-33, b) anticuerpos anti-ST2 y c) basadas en la utilización del receptor soluble sST2 (**Chen et al., 2018; Gabrielska et al., 2019**).

En un modelo de asma murino, el uso de un anticuerpo anti-IL-33 ha demostrado reducir la producción de citoquinas de tipo 2 por las células ILC2s (**Halim et al., 2012**), mientras que un anticuerpo anti-ST2 demostró causar el descenso de la expresión de IL-4 en los pulmones tras la provocación con OVA (**Kearley et al., 2009**). En otro estudio, el tratamiento con anticuerpos anti-IL-33 provocó una supresión de la inflamación e hiperreactividad de las vías respiratorias tras la exposición a alérgeno (**Gauvreau et al., 2014b**). El bloqueo de IL-33 o ST2 mediante anticuerpos, o la adición de sST2 en un modelo de inflamación alérgica respiratoria inducida mediante OVA, también redujo el número de eosinófilos detectados en el lavado del fluido broncoalveolar, a la par que los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 (**Oshikawa et a., 2002; Lee et al., 2014**). La vacunación anti-IL-33 en un modelo murino de asma producido por alergia a ácaros produjo una disminución de la hiperreactividad de las vías respiratorias, la eosinofilia y la inflamación pulmonar (**Lei et al., 2015**). Además, el tratamiento anti-ST2 mediante anticuerpos también tuvo efectos positivos sobre la rinitis alérgica (**Liu et al., 2009; Kim et al., 2012**) y redujo la severidad de la anafilaxia en un modelo de alergia alimentaria (**Galand et al., 2016**). Entre estos agentes, actualmente se están evaluando en ensayos clínicos (Fase I y II, respectivamente) dos anticuerpos bloqueantes de IL-33 (ClinicalTrials.gov: NCT03112577) y de ST2 (ClinicalTrials.gov:NCT03207243) para el tratamiento del asma alérgico severo (**Gabryelska et al., 2019**).

Además, más allá de estas aplicaciones en el tratamiento de la alergia y el asma, la inhibición de la señalización por IL-33/ST2 ha demostrado evitar la enfermedad de injerto *versus* huésped (GVHD) (**Scott et al., 2016**), mejorar el cuadro clínico y sintomatológico de la colitis ulcerosa (**Sedhom et al., 2013**), y reducir significativamente la inflamación pulmonar y la infiltración de neutrófilos y macrófagos producida por el humo de tabaco (**Qiu et al., 2013**). Igualmente, su aplicación frente a la EPOC también se haya en fase 2 de estudio clínico, tanto con anticuerpos frente a IL-33 como a ST2 (**Gabryelska et al., 2019**).

En conclusión, según los resultados obtenidos en ensayos clínicos y preclínicos, las terapias dirigidas específicamente frente al eje IL-33/ST2 representan una estrategia prometedora, con elevado potencial para el tratamiento de la enfermedad alérgica, en especial frente a aquellos procesos crónicos y refractarios a los tratamientos convencionales (**Chen et al., 2018; Gabrielska et al., 2019**).

1.3.-Inmunotoxinas frente a la enfermedad alérgica respiratoria: dos nuevas estrategias terapéuticas

Hasta la fecha, únicamente dos terapias con agentes biológicos han mostrado capacidad para prevenir nuevas sensibilizaciones alérgicas y detener la progresión de estas patologías: la inmunoterapia alérgeno específica (AIT) y la terapia con anticuerpos anti-IgE; aunque desafortunadamente, ninguno de estos tratamientos asegura una recuperación completa y eficaz de la enfermedad (**Molinari et al., 2014; Pelaia et al., 2018**). Para superar estas limitaciones en el tratamiento del asma y la alergia, gran parte de los esfuerzos investigadores se concentran en el desarrollo de nuevos inmunomoduladores de origen biológico (anticuerpos, citoquinas receptores solubles) dirigidos frente a moléculas y células involucradas en el mecanismo patogénico de la inflamación de tipo 2 (**Akdis, 2014; Chen et al., 2018**).

En los últimos años, entre las terapias biológicas dirigidas, las inmunotoxinas han surgido como herramientas prometedoras para el tratamiento del cáncer, enfermedades víricas, parasitarias y autoinmunes, debido a su habilidad para producir muerte celular de manera antígeno-específica (**Alewine et al., 2015; Spiess et al., 2016; Bachran et al., 2017; Fernandes et al., 2017**). En la actualidad, debido a los progresos realizados en su diseño y funcionalización, la aplicación potencial de estas moléculas a la terapia experimental de una patología concreta parece estar restringida únicamente por dos factores: a) la existencia de al menos una “tipología celular” desempeñando un papel

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

central en la patogenia de dicha enfermedad, susceptible de depleción selectiva; y b) la existencia de marcadores celulares específicos para dicha “tipología celular” frente a los que dirigir la inmunotoxina.

En base a lo descrito anteriormente, las enfermedades inflamatorias mediadas por una hipersensibilidad de tipo I son procesos inmunológicos complejos cuyos cuadros clínicos se asientan sobre la expansión y activación patológica de diferentes “tipos celulares” (mastocitos, basófilos, linfocitos B y Th2 alérgico específicos, células ILC2s, eosinófilos, etc.). Además, en la medida en que estos tipos celulares están caracterizadas por la expresión de fenotipos antigénicos propios en su membrana celular, las enfermedades alérgicas, o mejor dicho, ciertos endotipos de estas; parecen cumplir los requisitos necesarios para el desarrollo efectivo de inmunotoxinas terapéuticas.

Partiendo de la premisa anterior, en este Bloque II se propone la aplicación del concepto de inmunotoxina para el desarrollo de dos aproximaciones terapéuticas experimentales frente a las enfermedades alérgicas. Cada una de ellas conforma una estrategia funcional diferenciada, que caracterizada por una diana molecular y un mecanismo de acción propios, actúa a un nivel diferente de la respuesta inflamatoria de tipo 2. La primera estrategia se basa en un mecanismo de acción antígeno-dependiente, en el que la especificidad de la construcción está dirigida por la interacción alérgeno-IgE. Por el contrario, la segunda estrategia plantea un mecanismo de acción antígeno-independiente, no limitado a la especificidad de un alérgeno; sino dirigido, mediante la especificidad de reconocimiento entre una interleuquina y su receptor, a una etapa mediadora de la respuesta alérgica general.

En relación al diseño de las construcciones, ambas estrategias se basan en inmunotoxinas monocatenarias, producidas como proteínas de fusión con el dominio marcador en posición N-terminal, conectado mediante un *linker* peptídico de tres residuos (Gly-Gly-Arg) a α -sarcina. Es decir, siguen el diseño presentado para nuestras inmunotoxinas antitumorales en el apartado de “Resultados. Bloque I. Antecedentes. 1.- Inmunotoxinas antitumorales basadas en RNAsas fúngicas”.

1.3.1.-Estrategia alérgeno-dependiente: proDerp1 α S

Como un primer paso en la aplicación experimental de las inmunotoxinas como herramientas terapéuticas frente a las enfermedades alérgicas, se busca estudiar si es posible eliminar de forma dirigida aquellas poblaciones celulares con una implicación determinante en la inflamación alérgica. En concreto, la estrategia de acción alérgeno-dependiente plantea la posibilidad de deplecionar de forma específica aquellas células que participan en la respuesta inmune adquirida de tipo 2 mediante la interacción con el alérgeno sobre su membrana.

Cuadro 1: El alérgeno Der p 1

Der p 1, el alérgeno mayoritario de *Dermatophagoides pteronyssinus*, es uno de los alérgenos más prevalentes a nivel mundial apareciendo altamente relacionado con el asma y la rinosinusitis severos (Calderón *et al.*, 2015). La sensibilización a este aeroalérgeno alcanza a más del 80% de los sujetos alérgicos a ácaros, afectando a un 85% de los sujetos asmáticos y en total a más de un 20% de la población mundial (Dumez *et al.*, 2014).

Der p 1 es una cisteín-proteasa perteneciente a la familia de la papaína, cuya forma natural (nDer p 1) es sintetizada como una proenzima de 34 kDa (proDer p 1), incluyendo un dominio cisteín proteasa (222 aminoácidos) y un propéptido N-terminal que inhibe la actividad proteolítica (Takai *et al.*, 2002; Herman *et al.*, 2014). Este propéptido parece actuar también como una chaperona intramolecular asegurando el correcto plegamiento y secreción de la proteína nativa (Chevigné *et al.*, 2007); de modo que su inclusión en las formas recombinantes de Der p 1 ha sido descrita como necesaria para su producción en *P. pastoris* y plantas de tabaco (Jacquet *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009; Marconi *et al.*, 2012).

A modo de prueba de concepto y para la exploración de las posibilidades efectivas de esta aproximación terapéutica, se ha diseñado una inmunotoxina alérgeno-dirigida, proDerp1 α S, conformada como proteína de fusión de la forma precursora del alérgeno Der p 1 (Cuadro 1) (dominio marcador) y de la ribotoxina α -sarcina (dominio tóxico).

De acuerdo a sus componentes, la construcción proDerp1 α S presentaría un mecanismo de acción antígeno-dependiente, en el que su actividad citotóxica está dirigida frente a aquellos tipos celulares relevantes en la inflamación alérgica que presentan IgE Der p 1-específica unida a membrana (linfocitos B IgE+) o anclada a través de Fc ϵ RI (mastocitos y basófilos) (Figura 5) (Stone *et al.*, 2011; Zuidschewoude & van Sriel, 2012). En base a este hipotético mecanismo de acción, mediante depleción de las células efectoras de la respuesta alérgica y los linfocitos B productores de IgE,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proDerp1 α S se plantea como una herramienta experimental con potencial terapéutico para el tratamiento de la alergia a ácaros.

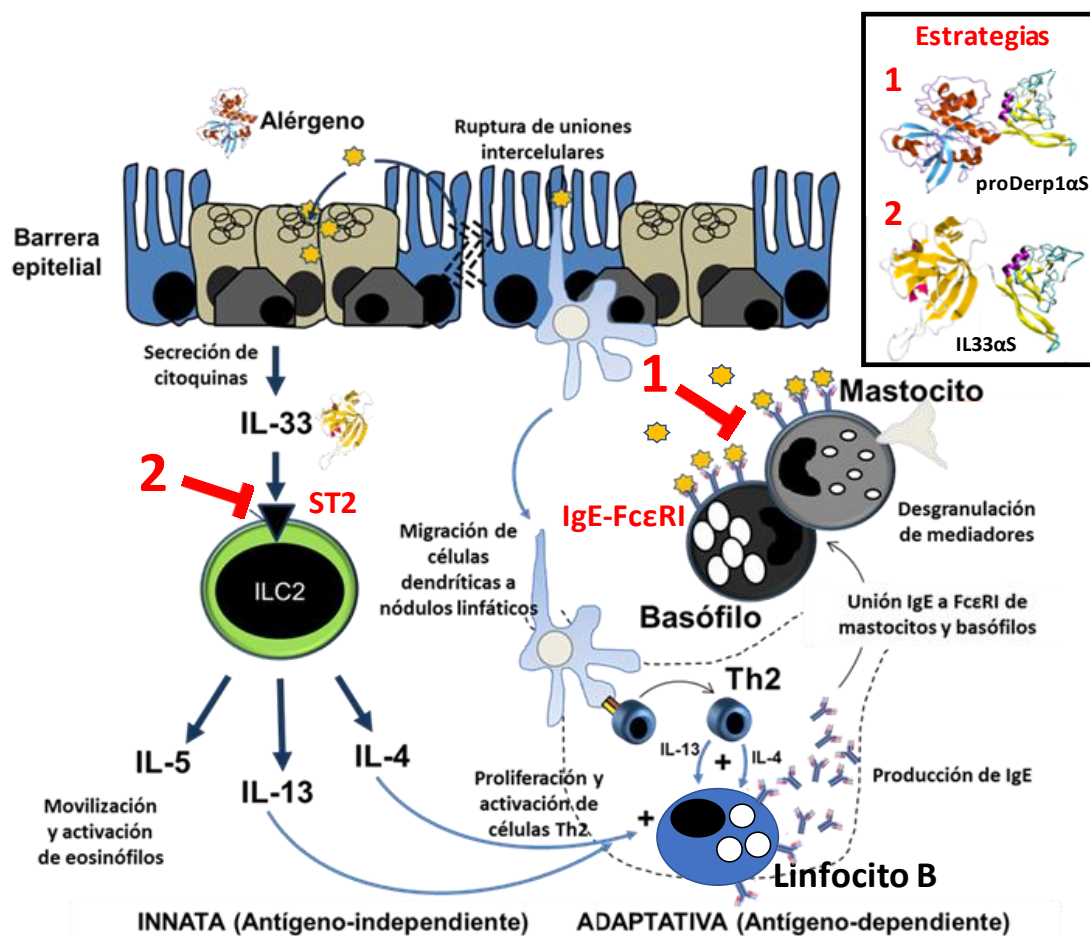


Figura 5. Mecanismos de acción de las inmunotoxinas frente a la alergia. Diagrama representando las dianas moleculares y celulares del mecanismo patogénico de la enfermedad alérgica respiratoria en el epitelio pulmonar. 1) Estrategia alérgeno-dependiente: tras su interacción específica a través de la IgE Der p 1-específica con las células efectoras (basófilos y mastocitos), proDerp1 α S provocaría su depleción selectiva. 2) Estrategia alérgeno-independiente: la inmunotoxina IL33 α S produciría la eliminación selectiva de las células ILC2s y los linfocitos Th2 mediante unión específica al receptor ST2 en su superficie celular.

1.3.2.-Estrategia alérgeno-independiente: IL33 α S

La segunda inmunotoxina frente a la alergia, IL33 α S, es una proteína de cadena única que incluye como dominio marcador la forma madura de IL-33 de ratón (IL-33₁₀₉₋₂₆₆) (**Cuadro 2**) fusionada a la ribotoxina α -sarcina (dominio tóxico).

Como se ha mencionado anteriormente, las células ILC2s han sido descritas como actores fundamentales en la iniciación, progresión y mantenimiento de la inflamación alérgica en el epitelio respiratorio, mediante un mecanismo de activación antígeno-independiente (**Paul & Zhu, 2010; Liew et al., 2016**). En diferentes modelos animales para el asma alérgico, el tratamiento con anticuerpos bloqueantes frente a sus rutas de activación TSLP, IL-25 e IL-33-dependientes ha mostrado reducir la inflamación y la

hiperreactividad de las vías respiratorias, así como el número de células ILC2s y los niveles de IL-5 e IL-13 en la mucosa pulmonar tras la exposición a alérgeno (**Gauvreau et al., 2014b; Lee et al., 2014; Shin et al., 2015**). Además, el uso de tratamientos combinados, bloqueando simultáneamente estas citoquinas, ha mostrado suprimir la inflamación de tipo 2, junto a la producción de IL-13 e IL-5 por las células ILC2s, el remodelado de las vías respiratorias y la fibrosis durante la inflamación alérgica pulmonar (**Vannela et al., 2016**).

Cuadro 2: La interleuquina IL-33

IL-33 murina está formada por seis exones codificantes, que dan lugar a una proteína de 266 aminoácidos. Los exones 1-3 codifican para los dominios N-terminal implicados en la localización nuclear y actividades moduladoras de la transcripción de IL-33, mientras que los exones 4-7 codifican para el dominio C-terminal homólogo a IL-1, implicado en la unión al receptor ST2 (**Carriere et al., 2007**). Este dominio homólogo a IL-1 (aminoácidos 109-266) consiste en un plegamiento tipo trébol formado por 12 láminas β , similar a otros miembros de la familia de la IL-1 (**Lingel et al., 2009**).

Mientras que la proteólisis llevada a cabo por las caspasas-1, -3 y -7 en el dominio homólogo a IL-1 inactiva la unión de IL-33 a ST2 (**Lüthi et al., 2009**), el procesamiento N-terminal de la proforma de IL-33 es fundamental para el adecuado desempeño de sus actividades biológicas. Este es llevado a cabo por diversas proteasas extracelulares, comunes en sitios de inflamación (incluyendo la catepsina G de neutrófilos y diversas serín-proteasas de mastocitos), que actúan sobre una región corta de aminoácidos situada entre el dominio de unión nuclear y el homólogo a IL-1. Las formas de IL-33 procesadas resultantes, 19 kDa, exhiben una bioactividad, mediada por la unión a ST2, entre 10 y 30 veces superior a la proforma, y son funcionalmente similares a IL-33₁₀₉₋₂₆₆ murina recombinante (mIL-33), 18 kDa, disponible comercialmente (**Lefrancais et al., 2012; 2014**).

De acuerdo con estos resultados, el desarrollo de estrategias experimentales que neutralicen por completo la actividad de las células ILC2s se presenta como una aproximación terapéutica prometedora para el tratamiento de aquellas patologías, como en el asma severo y crónico, en las cuales las ILC2s desempeñan un rol patogénico crucial.

En este sentido, IL33 α S presenta un mecanismo de acción dirigido a producir la depleción específica de aquellas células expresando el receptor ST2, destacando durante la inflamación alérgica pulmonar crónica los linfocitos Th2 y, especialmente, las células ILC2s (**Liew et al., 2016; Starkey et al., 2019**) (**Figura 5**).

2.-Resultados

2.1.-proDerp1 α S

En este primer apartado del Bloque II se presentan los resultados obtenidos en relación con el diseño, producción, purificación y caracterización de proDerp1 α S, una inmunotoxina alérgeno-específica para el tratamiento de la alergia a ácaros, utilizando como control rproDer p 1 (**Figura 6**):

1. **proDerp1 α S**: inmunotoxina quimérica en cadena única compuesta por la forma precursora del alérgeno Der p 1 (dominio marcador) unido mediante el *linker* peptídico Gly-Gly-Arg a α -sarcina (dominio tóxico).
2. **rproDer p 1**: forma precursora recombinante del alérgeno Der p 1 producida en *P. pastoris*. Purificada y caracterizada para ser utilizada como control no citotóxico en la caracterización funcional de la inmunotoxina proDerp1 α S.

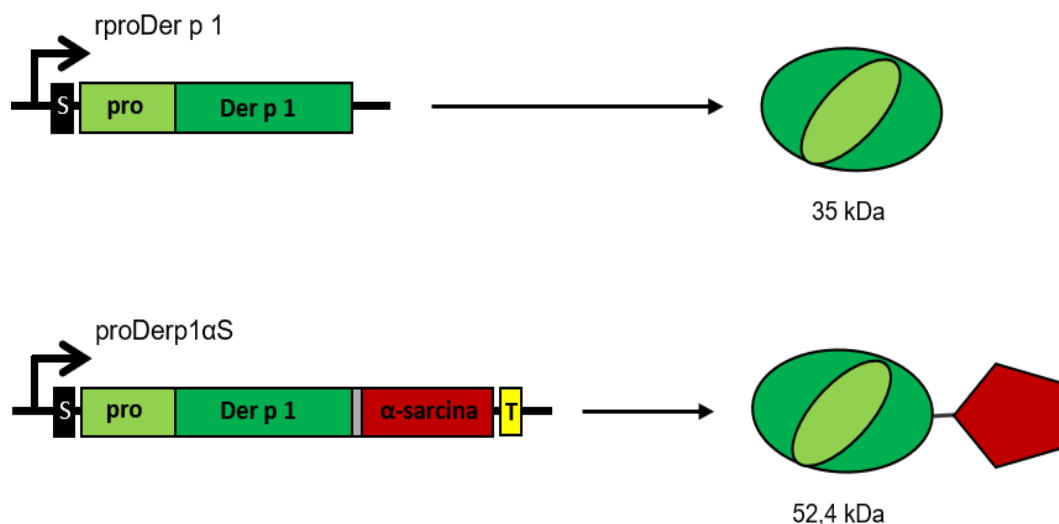


Figura 6. Diagramas mostrando la disposición genética y los dominios proteicos de rproDer p 1 y proDerp1 α S. En ambos casos, los componentes de las secuencias de cDNA (izquierda) y los dominios estructurales de ambas proteínas (derecha) se indican del siguiente modo: péptido señal para la secreción factor- α (S, negro), secuencia pro- (verde claro), Der p 1 (verde oscuro), linker Gly-Gly-Arg (gris) α -sarcina (rojo), y extensión de histidinas (T, amarillo).

2.1.1.-Diseño y obtención de los plásmidos de expresión

La obtención de los plásmidos de expresión para proDerp1 α S y la forma precursora del alérgeno Der p 1 se realizó a partir de los vectores pPICZ α AIMTXA33 α S y pUCIDT-proDerUCM, que contenían el cDNA de α -sarcina y proDer p 1, respectivamente.

Para la obtención de pPICZ α AproDerp1 α S se digirió el plásmido pUCIDT-proDerUCM con *EcoRI* y *NotI*, y se insertó el fragmento liberado “5'*EcoRI*-proDer p 1-*NotI*3'” en el fragmento grande del plásmido pPICZ α AIMTXA33 α S digerido con *EcoRI* y *NotI*. De esta manera, el cDNA codificante para proDer p 1 se clonó en fase con el extremo 3' del factor α y el extremo 5' del *linker* peptídico Gly-Gly-Arg. El producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α F' para su amplificación. Una vez comprobada la identidad de secuencia de los transformantes, 10 μ g de plásmido lineal se electroporaron en células de *P. pastoris*, cepas BG11 y KM71.

El plásmido pPICZ α AproDer1 para la expresión de proDer p 1 en *P. pastoris*, se construyó mediante el clonaje en fase con el factor α del cDNA de proDer p 1, en este caso sin incluirse una extensión de histidinas en su extremo C-terminal. La amplificación del fragmento “5'*EcoRI*-proDerp1-STOP-*SaI*3'” se realizó desde el vector pUCIDTproDerUCM mediante los oligonucleótidos 9 y 10, incluyendo los sitios de restricción *EcoRI* (5') y *SaI* (3'). Tras ello, el fragmento amplificado por PCR y el vector pPICZ α AIMTXA33 α S se digirieron con las mismas endonucleasas, insertándose el fragmento “5'*EcoRI*-proDerp1-STOP-*SaI*3'” en el plásmido pPICZ α A. El producto de la ligación se transformó en células *E. coli* DH5 α F' para su amplificación y, por último, el plásmido linealizado mediante *PmeI* fue electroporado en células *P. pastoris* KM71.

2.1.2.-Producción y purificación de proDerp1 α S

Las pruebas de producción para ambas construcciones se realizaron de acuerdo con lo descrito para las inmunotoxinas antitumorales anti-CEA en el Bloque I de Resultados. En ambos casos, el análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes y reductoras de los medios de expresión tras 24 y 48 h de inducción mostró la presencia de bandas acordes al tamaño esperado (resultados no mostrados).

La producción a gran escala de proDerp1 α S se realizó mediante 24 h de crecimiento a 30°C en medio BMGY. Tras esto, la masa celular del cultivo se indujo en medio BMMY durante 48 h a 25°C, suplementando con metanol al 0,5% (v/v) tras 24 h de inducción. Tras dializar el medio de expresión frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5; este se aplicó en una columna de afinidad de metal inmovilizado Ni²⁺-NTA agarosa, obteniendo la proteína de fusión altamente concentrada mediante la elución con tampón de diálisis suplementado con imidazol 250 mM (**Figura 7 A**). El imidazol de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las fracciones conteniendo la proteína purificada se eliminó consecutivamente, mediante su diálisis frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5.

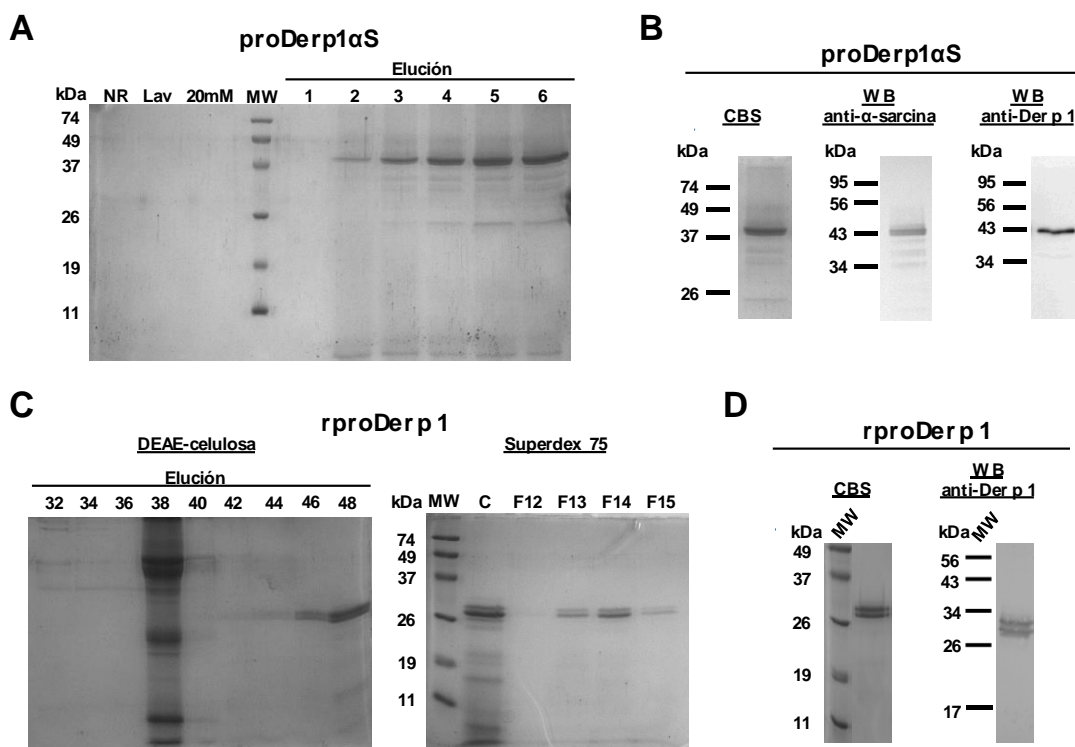


Figura 7. Análisis electroforético y Western blot de la purificación de proDerp1αS y rproDer p 1. A) Tinción con azul de Coomassie del PAGE-SDS de las fracciones recogidas durante la purificación de proDerp1αS mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA. Se muestran: NR, no retenido; Lav, fracción de lavado con tampón de cromatografía; 20 mM, fracción de lavado con tampón de cromatografía conteniendo imidazol 20 mM; y las primeras seis fracciones (1 ml) eluidas con imidazol 250 mM. B) PAGE-SDS e inmunodetección de proDerp1αS purificado mediante sendos anticuerpos policlonales frente a α-sarcina y Der p 1. C) Muestra de las fracciones obtenidas durante la purificación de rproDer p 1. Izquierda, elución en DEAE-celulosa, y derecha, análisis preparativo en Superdex 75. D) PAGE-SDS (tinción azul de coomassie, CBS) e inmunodetección mediante un anticuerpo policlonal frente a Der p 1 de rproDer p 1 purificado.

La producción de rproDer p 1 se llevó a cabo de manera idéntica a la de proDerp1αS, siguiendo el protocolo descrito en el párrafo anterior. Para su purificación, el medio de inducción, una vez separado de la fracción celular, se dializó frente a tampón bicarbonato amónico 20 mM, pH 8,2 en bolsas de diálisis de 6-8 kDa, tras lo que se aplicó a una columna de DEAE-celulosa para su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico. La proteína retenida se eluyó mediante tampón bicarbonato amónico 20 mM, NaCl 1M, pH 8,2; obteniéndose un pico de elución simétrico y homogéneo en composición, cuya movilidad mediante análisis electroforético PAGE-SDS se ajustó con el tamaño esperado para rproDer p 1 (**Figura 7 C, izquierda**). Como paso previo a su liofilización, las fracciones conteniendo proteína fueron homogeneizadas y dializadas frente a tampón bicarbonato amónico 20 mM pH 8,2. Una vez liofilizada, la muestra se resuspendió altamente concentrada en PBS (1 mg/ml), aplicándose de forma seriada en una columna Superdex 75, mediante la cual rproDer p 1 se separó de los contaminantes

peptídicos de pequeño tamaño arrastrados desde su producción. Las diferentes fracciones de la cromatografía de penetrabilidad FPLC se analizaron mediante electroforesis en PAGE-SDS en condiciones desnaturalizantes para comprobar su composición y pureza (**Figura 7 C, derecha**).

De este modo, tanto proDerp1 α S como rproDer p 1 fueron producidos en altas cantidades y purificados a homogeneidad, de acuerdo a criterios de movilidad electroforética e inmunodetección mediante *Western blot* (**Figura 7 C y D**). Los rendimientos finales de purificación para ambas proteínas fueron 1 mg/l de medio inducción para proDerp1 α S y 30 mg/l para rproDer p 1; y sus $\epsilon_{280\text{nm}}$ teóricos 75.325 M⁻¹·cm⁻¹ y 51.800 M⁻¹·cm⁻¹, respectivamente.

2.1.3.-Caracterización estructural

La identidad estructural de las construcciones purificadas se comprobó mediante análisis electroforético PAGE-SDS conteniendo β -mercaptoetanol, seguido de la inmunodetección de sus componentes estructurales mediante *Western blot*. La banda proteica correspondiente a proDerp1 α S purificado fue reconocida específicamente por sendos antisueros anti- α -sarcina y anti-Der p 1, mostrando la naturaleza de química de la construcción (**Figura 7 B**). De forma paralela, rproDer p 1 fue reconocido por el antisuero anti-Der p 1 (**Figura 7 D**). Además, los tamaños moleculares experimentales obtenidos mostraron que ambas proteínas purificadas incluían en su estructura el propéptido N-terminal de 80 aminoácidos correspondiente a la forma precursora inmadura del alérgeno Der p 1.

El espectro de CD en el UV-lejano registrado para proDerp1 α S se correspondió con un plegamiento globular formado mayoritariamente por hélice α , junto a una considerable contribución de lámina β (**Figura 8 A**). Este espectro es concordante con las estructuras secundarias de los dos componentes de la inmunotoxina, mayoritaria en hélice α para Der p 1 (**Chruszcz et al., 2008**) y en lámina β para α -sarcina (**Martínez del Pozo et al., 1988; García-Ortega et al., 2002**).

Mediante el análisis por espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF, proDerp1 α S reveló un tamaño monomérico de 53.073 Da (**Figura 8 B**), el cual está en concordancia con el tamaño teórico esperado para la construcción (52,4 kDa). La diferencia entre ambos valores se explica por la proteólisis del factor α durante la secreción de la proteína, donde el corte por Kex2 añade 4 residuos extra a la construcción en posición N-terminal (EasySelect™ Pichia Expression Kit, Invitrogen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

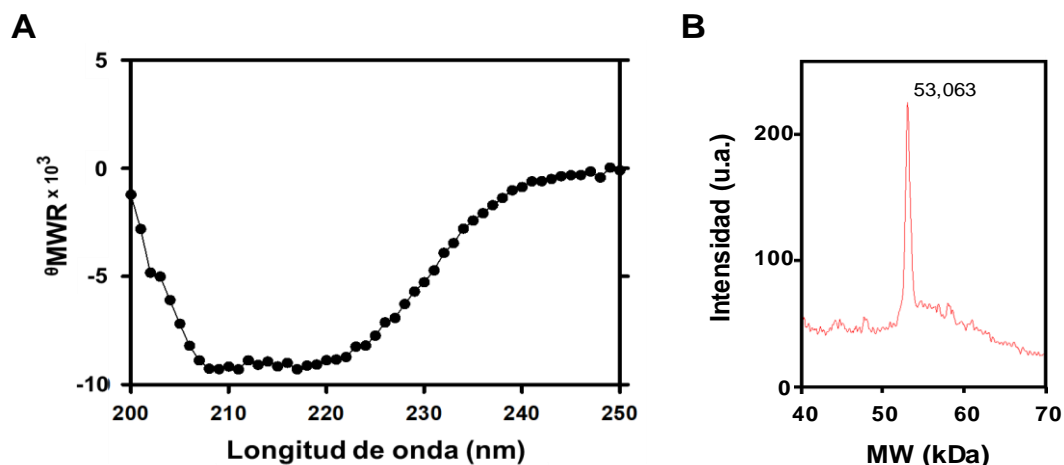


Figura 8. Caracterización estructural de proDerp1 α S. A) Espectro de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano (θ_{MRW} , elipticidad molar por residuo expresada como: grado \times cm² \times dmol⁻¹). Espectro realizado en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4 con una concentración de proteína de 0,15 mg/ml. B) Espectro de masas MALDI-TOF registrado para la proteína purificada.

2.1.4.-Caracterización funcional

La caracterización funcional de proDerp1 α S incluyó el estudio de las actividades enzimáticas de las proteínas que conforman sus dominios marcador y tóxico. Es decir, la caracterización de la actividad cisteín proteasa propia de Der p 1 y, como viene siendo habitual, la actividad ribonucleolítica de α -sarcina.

La especificidad de la acción citotóxica de proDerp1 α S depende de su correcto reconocimiento por IgE Der p 1-específica. Esta función se estudió mediante ensayos de ELISA utilizando sueros de pacientes sensibilizados y no sensibilizados a Der p 1.

Por último, el efecto de la inmunotoxina sobre células presentando IgE en su membrana plasmática se estudió utilizando cultivos celulares de hFc ϵ RI RBL-2H3, tratados con sueros de pacientes alérgicos y no alérgicos a Der p 1, y sobre basófilos circulantes contenidos en preparaciones de PBMCs obtenidas desde muestras sanguíneas de pacientes alérgicos y no alérgicos a Der p 1.

2.1.4.1.-Caracterización de la actividad cisteín proteasa

La actividad cisteín proteasa de rproDer p 1 y proDerp1 α S se caracterizó mediante el ensayo del péptido fluorogénico Boc-QAR-AMC (**Schultz et al., 1998**). El registro de la fluorescencia emitida por el AMC libre, producto de la proteólisis del sitio QAR, mostró una considerable actividad cisteín proteasa de proDerp1 α S frente a este substrato peptídico; si bien esta fue menor a la registrada para la forma madura del alérgeno

obtenida a partir del extracto de ácaros, nDer p 1 (**Figura 9 A**). Por el contrario, rproDer p 1 no mostró ninguna actividad hidrolítica sobre Boc-QAR-AMC (**Figura 9 B**).

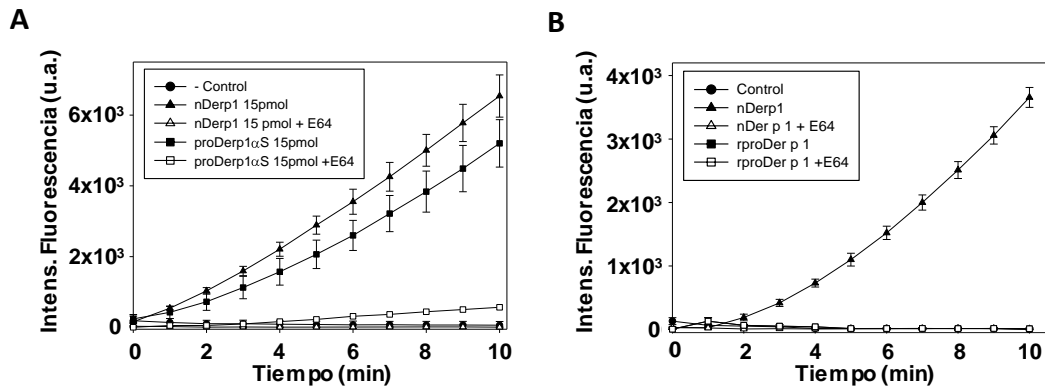


Figura 9. Caracterización de la actividad cisteín proteasa sobre el péptido fluorogénico Boc-QAR-AMC. Comparación equimolar de la hidrólisis producida por 15 pmol de proDerp1αS (A) y rproDer p 1 (B) frente a nDer p 1 como control. Ambos ensayos incluyen muestras tratadas con el inhibidor de cisteín proteasas E64. Los resultados representan la media ± desviación típica de duplicados para cada ensayo.

En concordancia con lo descrito en la bibliografía, el resultado para rproDer p 1 mostró como la presencia del propéptido N-terminal en proDer p 1 inhibe la actividad cisteín proteasa característica de la forma madura de Der p 1 (**Jacquet et al., 2002; Takai et al., 2002**). Sin embargo, la actividad proteolítica mostrada por proDerp1αS sugiere que la fusión del dominio α-sarcina en posición C-terminal de proDer p 1 altera de algún modo esta actividad inhibidora. Este hecho, podría explicarse atendiendo a la estructura tridimensional de proDer p 1 (**Meno et al, 2005**), donde los residuos N- y C-terminal se sitúan próximos en la superficie de la molécula. Así, la presencia de α-sarcina en posición C-terminal de proDerp1αS afectaría al correcto plegamiento o disposición del propéptido sobre el centro activo de Der p 1, impidiendo su función inhibidora de la actividad cisteín proteasa.

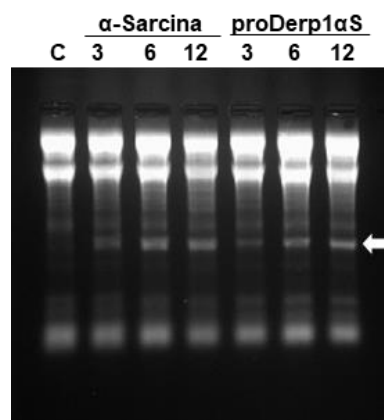


Figura 10. Caracterización de la actividad ribonucleolítica. Ensayo de reticulocitos comparando la actividad ribonucleolítica de cantidades equimolares (pmol) de α-sarcina y proDerp1αS sobre el SRL de ribosomas de mamífero. La flecha indica la movilidad electroforética correspondiente al fragmento α liberado, producto característico de la actividad ribonucleolítica de α-sarcina. C, control negativo (ausencia de proteína).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1.4.2.-Caracterización de la actividad ribonucleolítica

Los ensayos de reticulocitos mostraron que proDerp1 α S presenta la actividad ribonucleolítica inactivadora de ribosomas de α -sarcina. Como se muestra en la **Figura 10**, cantidades equimolares de α -sarcina *wt* y proDerp1 α S, ensayadas frente a un extracto de reticulocitos, causaron una liberación equivalente de fragmento α .

2.1.4.3.-Caracterización del reconocimiento por IgE específica

El estudio del reconocimiento de proDerp1 α S por IgE humana, mediante ELISA indirecto, mostró una unión semejante para las tres proteínas ensayadas, nDer p 1, proDer p 1 y proDerp1 α S, para todos los sueros de pacientes alérgicos a Der p 1 analizados (#1-15). Esta unión alérgeno-IgE no se registró en ningún caso con los sueros de pacientes no alérgicos ensayados (C1, C2) (**Figura 11 A**). Los ELISA de inhibición mostraron una inhibición semejante sobre el reconocimiento por IgE de nDer p 1 por rproDer p 1 y proDerp1 α S, pero ésta fue significativamente menor en ambos casos a la inhibición autóloga del propio nDer p 1 ($P < 0,05$) (**Figura 11 B**).

En conjunto, estos resultados indican un comportamiento similar en la unión por IgE a nDer p 1, rproDer p 1 y proDerp1 α S, siendo las tres proteínas reconocidas específicamente por aquellos sueros de pacientes alérgicos a Der p 1, pero no por los sueros control. Las diferencias observadas mediante ELISA de inhibición, que indicaron un menor reconocimiento alérgico de rproDer p 1 y proDerp1 α S respecto a nDer p 1, se podrían explicar por las diferencias estructurales y epitópicas existentes entre la forma natural de Der p 1 -procesada y glicosilada-, y la forma recombinante del precursor de dicho alérgeno utilizado para la expresión recombinante (**Meno et al., 2005**). Además, hay que destacar que la inclusión de α -sarcina en la construcción proDerp1 α S, no alteró significativamente el reconocimiento epitópico por IgE respecto al alérgeno rproDer p 1 independiente.

2.1.4.4.-Caracterización de la actividad biológica sobre células hFc ϵ RI RBL-2H3

Una vez comprobado que la inmunotoxina proDerp1 α S es reconocida de manera específica por IgE de sueros de pacientes alérgicos a Der p 1, pero no por los sueros de pacientes control; se procedió a la caracterización de su actividad biológica *in vitro* utilizando el modelo celular hFc ϵ RI RBL-2H3. Mediante ensayos de liberación de β -hexosaminidasa y de inhibición de la viabilidad celular se analizó la unión de proDerp1 α S a IgE anclada sobre el receptor hFc ϵ RI; así como la desgranulación y la

citotoxicidad específica producida por la inmunotoxina tras sensibilizar las células con IgE Der p 1-específica procedente de los sueros alérgicos a Der p 1.

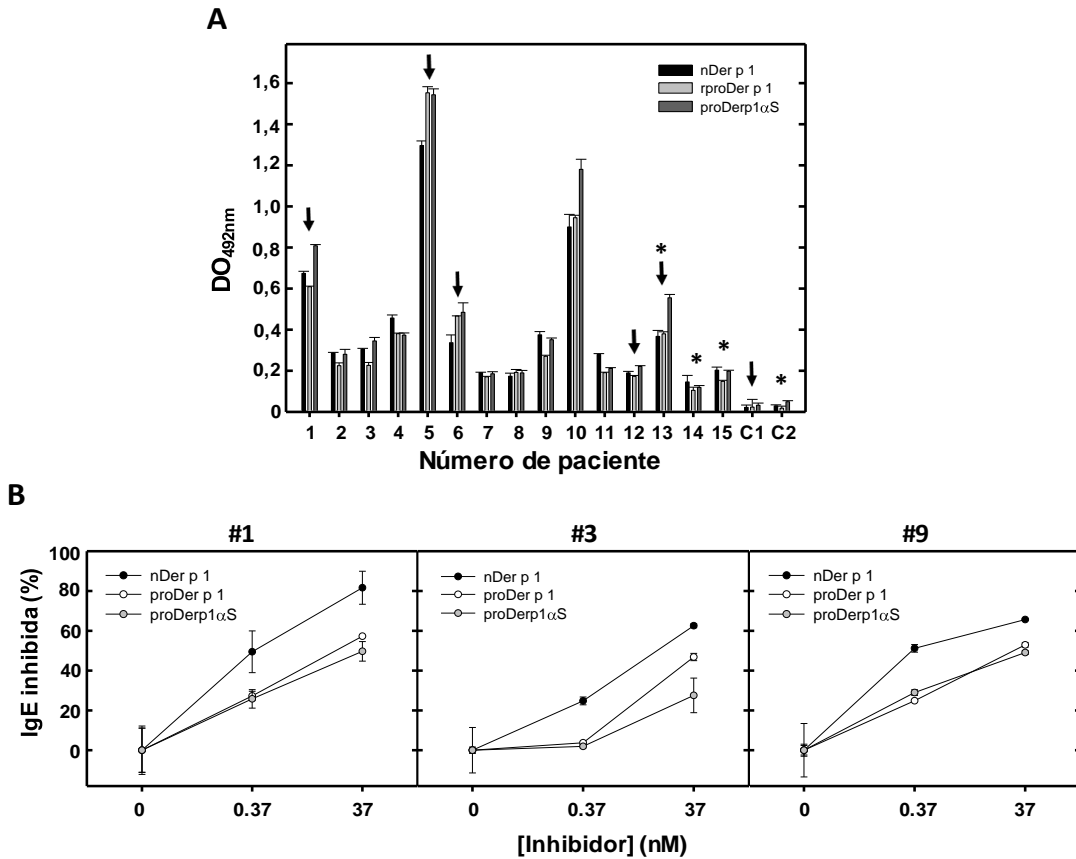


Figura 11. Ensayos de reconocimiento por IgE sérica. A) ELISA indirecto sobre nDer p 1, rproDer p 1 y proDerp1αS utilizando sueros (diluidos 1/10) de pacientes alérgicos (#1-15) y no alérgicos (C1, C2) a Der p 1. Las flechas indican los sueros seleccionados para los ensayos celulares *in vitro* con células hRBL-2H3 y los asteriscos aquellos pacientes utilizados en los test de activación de basófilos. B) ELISA de inhibición del reconocimiento de nDer p 1 por IgE (pacientes #1, 3, 9), mediante la competición epitópica con rproDer p 1 y proDerp1αS, utilizando cantidades equimolares para las tres proteínas. Los resultados muestran las medias ± desviación típica de ensayos realizados por duplicado.

Los niveles de desgranulación de las células hFcεRI RBL-2H3 sensibilizadas con sueros de pacientes alérgicos a Der p 1 (n=5), medidos 1 h después de la estimulación, fueron similares para rproDer p 1 y proDerp1αS (**Figura 12**). En ambos casos, la liberación de β-hexosaminidasa manifestó un efecto dosis-dependiente, sufriendo una saturación y reducción de sus niveles a concentraciones de proDerp1αS en torno a 100 nM. Además, la activación de las células hFcεRI RBL-2H3 se observó únicamente cuando los cultivos fueron sensibilizados con sueros de pacientes alérgicos, pero no con los sueros control (n=2), lo que indica la estricta dependencia de IgE Der p 1-específica de esta activación celular. α-Sarcina *wt* nunca causó desgranulación, independientemente del suero utilizado para la sensibilización (**Figura 12**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

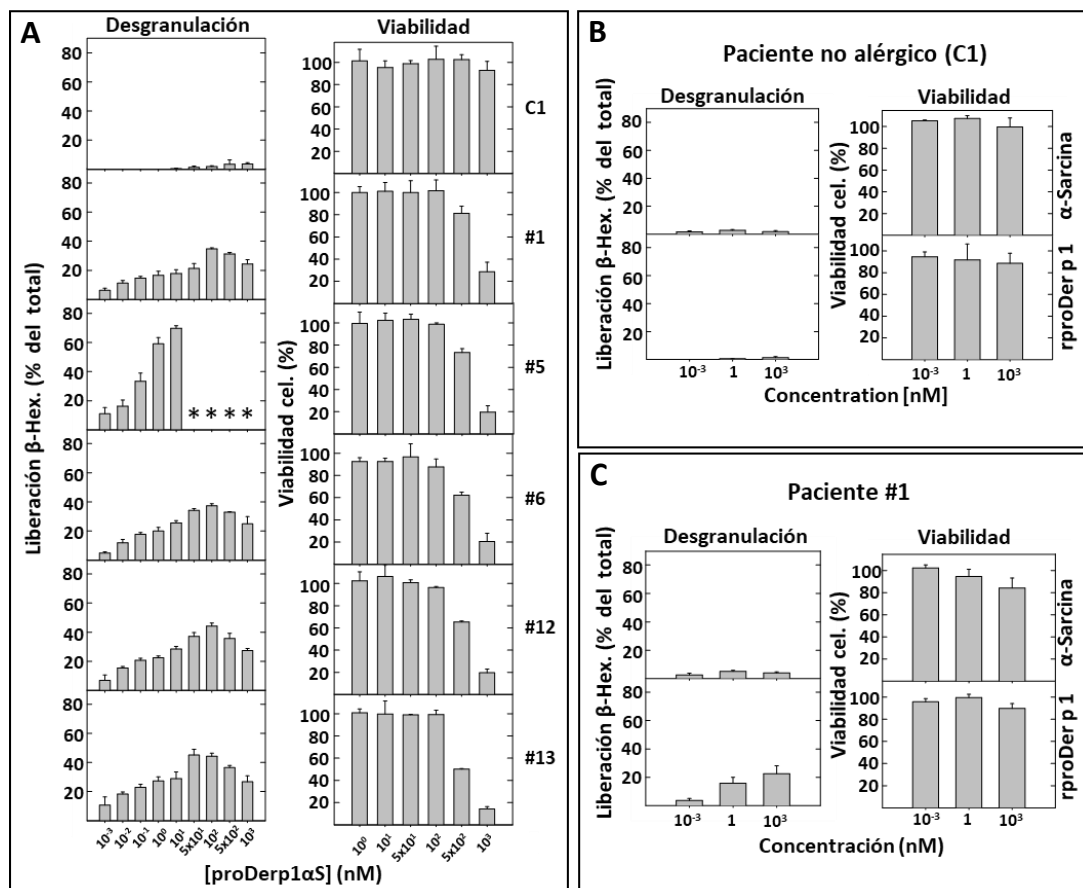


Figura 12. Ensayos de desgranulación y citotoxicidad *in vitro* con células hRBL-2H3. A) Células hRBL-2H3 sensibilizadas previamente con suero de pacientes alérgicos (#1, 5, 6, 12, 13) y no alérgicos (C1) a Der p 1 fueron tratadas con proDerp1αS, analizándose la liberación de β-hexosaminidasa (β-Hex. % del total) y la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT (* indica la limitación de suero disponible de este paciente). α-Sarcina y rproDer p 1 fueron utilizados como controles para ambos ensayos, mostrándose el resultado de para el suero #1 (B), representativo de los pacientes alérgicos, y del suero control C1 (C). Todos los experimentos se realizaron por duplicado, indicando las barras su promedio ± su desviación típica.

El efecto de proDerp1αS sobre la viabilidad celular de cultivos de células hFcεRI RBL-2H3 sensibilizadas, y su especificidad según el suero contenga IgE Der p 1-específica o no, se analizó 24 horas después de la estimulación con la inmunotoxina. En este caso, proDerp1αS mostró una citotoxicidad específica promoviendo la muerte celular exclusivamente en aquellas células sensibilizadas con sueros de pacientes alérgicos a Der p 1 (n=5), pero no sobre aquellas sensibilizadas con sueros de pacientes no alérgicos a Der p 1 (n=2) (**Figura 12**). Comparativamente a los valores de inhibición de la viabilidad celular para proDerp1αS sobre las células sensibilizadas con IgE Der p 1-específica, ni rproDer p 1 ni α-sarcina *wt* produjeron un efecto citotóxico reseñable en las células hFcεRI RBL-2H3 sensibilizadas (n=5) y no sensibilizadas (n=2) con IgE Der p 1-específica. Los resultados para estos controles con un suero IgE anti-Der p1 positivo (alérgico) y otro negativo (no alérgico) representativos se muestran en la **Figura 12**.

2.1.4.5.-Caracterización de la toxicidad de proDerp1 α S

Además de los ensayos sobre las células hFc ϵ RI RBL-2H3, como preámbulo a la caracterización de la actividad de proDerp1 α S sobre los basófilos de pacientes alérgicos a Der p1, la toxicidad inespecífica de la construcción se evaluó sobre diferentes modelos celulares (HeLa, Calu-3, LAD2, Raw 264.7).

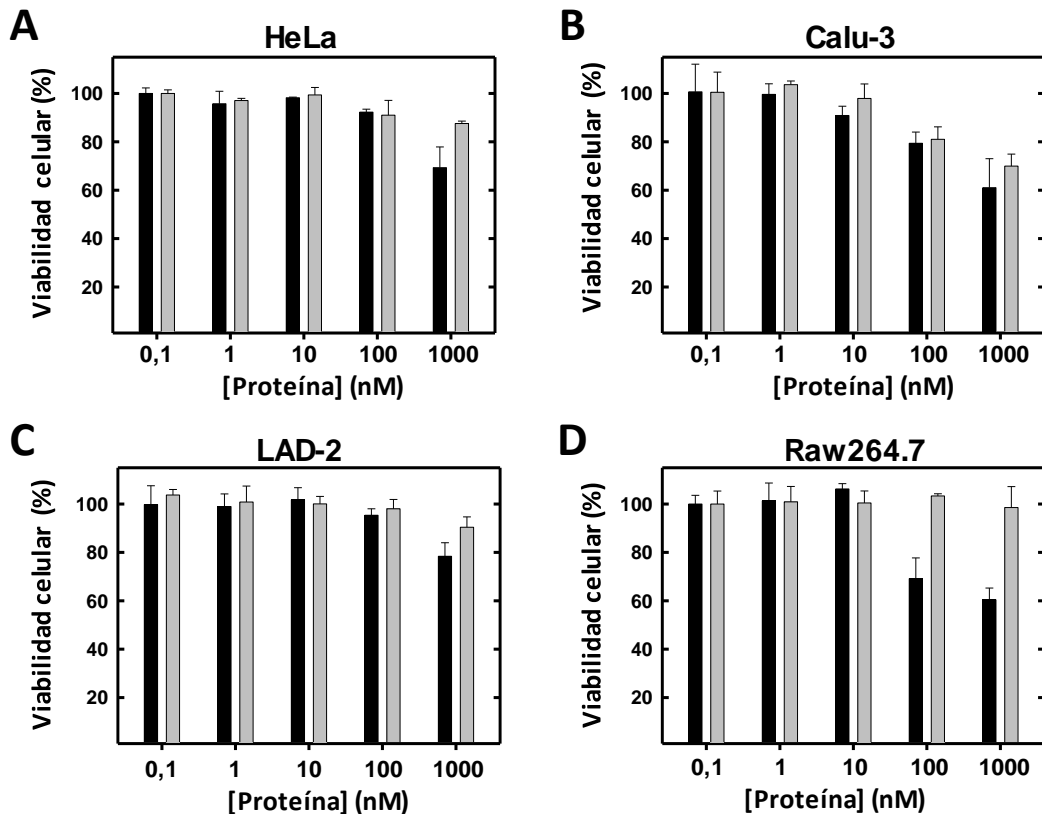


Figura 13. Ensayos de viabilidad celular comparando el efecto tóxico de α -sarcina wt (barras negras) y proDerp1 α S (barras grises) sobre diversos modelos celulares. Resultados de los experimentos de viabilidad celular obtenidos, mediante ensayos de MTT incubando durante 24 h con diluciones seriadas de las proteínas analizadas diferentes cultivos celulares: A) HeLa, B) Calu-3, C) LAD2 y D) Raw 264.7. Los resultados muestran las medias \pm desviación típica de ensayos realizados por duplicado.

Tras 24 h de incubación, proDerp1 α S mostró un efecto tóxico inespecífico limitado, siendo la viabilidad de los cultivos igual o superior al 90% para los ensayos de concentración 1 μ M, excepto EN el caso de las células Calu-3 ($69,97 \pm 4,94$ %) (Figura 13). Además, proDerp1 α S causó siempre una inhibición de la viabilidad celular menor a la producida por α -sarcina wt, mostrando como la fusión de un componente proteico a α -sarcina reduce su citotoxicidad inespecífica como parte de las inmunotoxinas, tal y como ha sido descrito para anteriores construcciones caracterizadas por nuestro grupo (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1.4.6.-Caracterización de la actividad biológica en basófilos humanos

De forma semejante a los estudios realizados con las células hFcεRI RBL-2H3, la actividad de proDerp1αS sobre basófilos circulantes de pacientes alérgicos y no alérgicos a Der p 1 se caracterizó mediante ensayos de desgranulación/activación y ensayos de citotoxicidad.

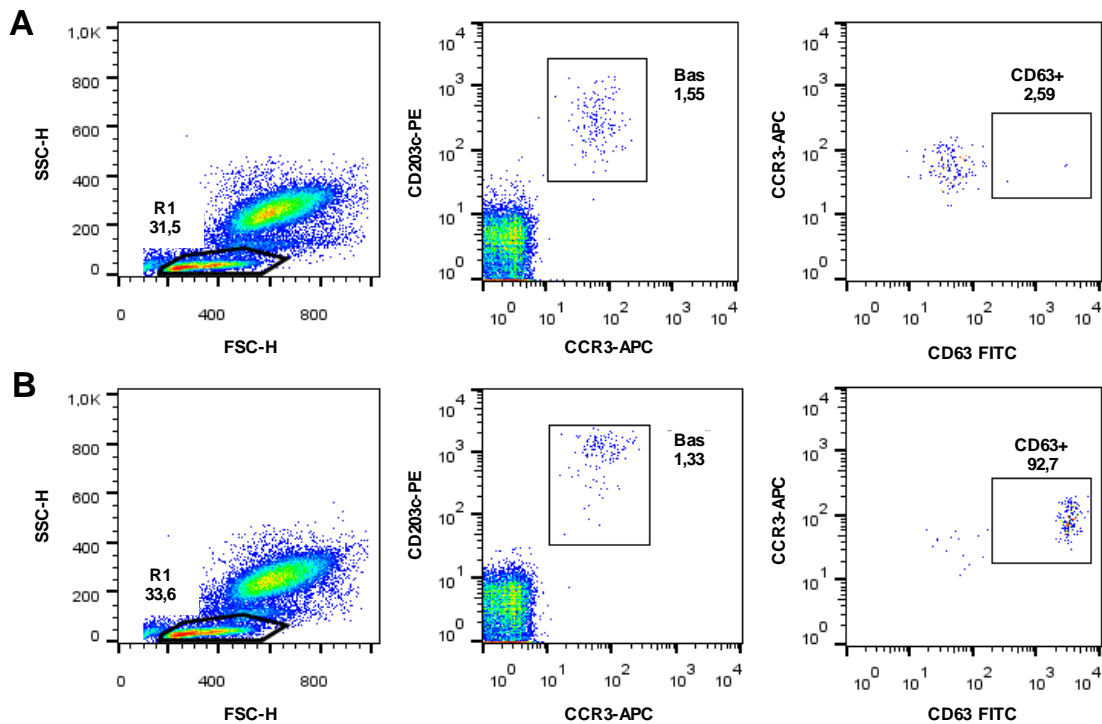
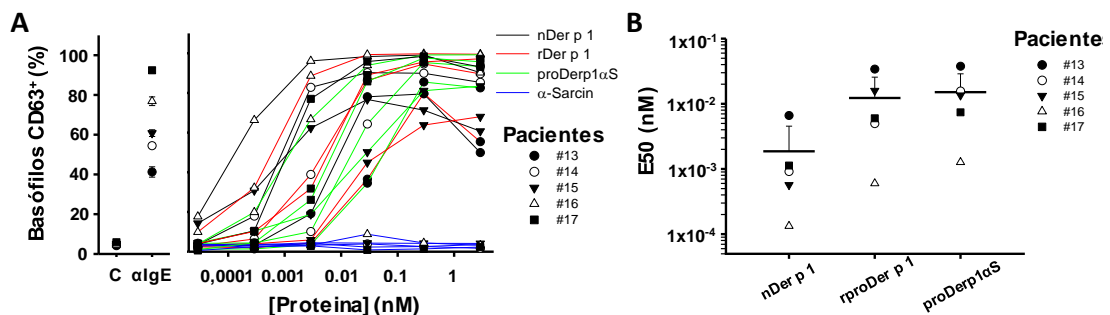


Figura 14. Gráficos de citometría de flujo obtenidos para los ensayos de BAT. Resultados obtenidos en los estudios de desgranulación utilizando sangre de un paciente alérgico a Der p 1 (#13). Los ensayos muestran: A) sangre no estimulada con alérgeno y B) estimulada con 2,3 nM de nDer p1. Las diferentes gráficas muestran: la representación de tamaño (FSC-H) y complejidad (SSC-H) de los leucocitos obtenidos tras la estimulación y la lisis de los eritrocitos, mostrándose la región linfocito-basófilo R1 (izquierda); el doble marcaje CCR3-APC/CD203c-PE de la subpoblación R1, mostrando aquellos eventos doblemente positivos identificados como basófilos (Bas) (centro), y el marcaje de activación con el indicador de desgranulación CD63-FITC (derecha).

La desgranulación de basófilos mediada por alérgeno se evalúa de manera rutinaria mediante el ensayo de activación de basófilos (BAT). Tras la estimulación de muestras de sangre completa con las diferentes proteínas ensayadas, los eritrocitos se lisaron y los basófilos se seleccionaron con un marcaje CCR3+/CD203c+ dentro de la población de linfocitos-basófilos. Los niveles de desgranulación se evaluaron mediante la cuantificación de la exposición en la membrana plasmática del marcador CD63 (**Figura 14**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de BAT mostraron una tendencia similar, dosis dependiente, en la desgranulación causada por nDer p 1, rproDer p 1 y proDerp1 α S en el caso de pacientes alérgicos a Der p 1 (n=5), mientras que α -sarcina *wt* no provocó desgranulación observable en ningún paciente (**Figura 15 A**). Por otro lado, los individuos control, no alérgicos a Der p 1 (n=5), no mostraron para ninguna de las proteínas ensayadas ningún efecto sobre la expresión de CD63 diferenciable de los controles no estimulados (datos no mostrados). De acuerdo a la concentración de alérgeno necesaria para producir un 50% de la activación máxima (EC_{50}), dentro de la muestra de cinco pacientes alérgicos, nDer p 1 ($0,00187 \pm 0,00267$ nM) presentó una actividad estimuladora casi 10 veces mayor que rproDer p 1 ($0,0123 \pm 0,0134$ nM) y proDerp1 α S ($0,0151 \pm 0,0138$ nM) (**Figura 15 B**). Respectivamente, los valores de EC_{50} para rproDer p 1 y proDerp1 α S no mostraron diferencias significativas en un análisis estadístico ANOVA ($P < 0,186$).



Una vez comprobado que proDerp1 α S se unió de forma específica a IgE anti-Der p 1 anclada al receptor Fc ϵ RI en los basófilos, provocando su desgranulación de manera semejante a nDer p 1, se estudió su capacidad citotóxica específica sobre estas células.

Con este fin, de acuerdo a lo descrito en el apartado de Materiales y Métodos, cultivos celulares conteniendo 200.000 PBMCs de pacientes alérgicos (n=3) o no alérgicos (n=2) a Der p 1 se incubaron con diluciones seriadas de proDerp1 α S, rproDer p 1 y α -sarcina *wt* (0,1; 10; 1000 nM) durante 24 y 72 h. Finalmente, las células se marcaron mediante un anticuerpo anti-CCR3-APC para la selección de los basófilos, y mediante los marcadores LIVE/DEAD y Anexina V-FITC para el análisis de la viabilidad celular y la apoptosis, respectivamente.

Los resultados obtenidos, presentados en la **Figura 16**, no mostraron ningún efecto citotóxico específico de proDerp1 α S sobre los basófilos de los pacientes alérgicos a Der p 1. En primer lugar, en los ensayos utilizando las proteínas a una concentración de 0,1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

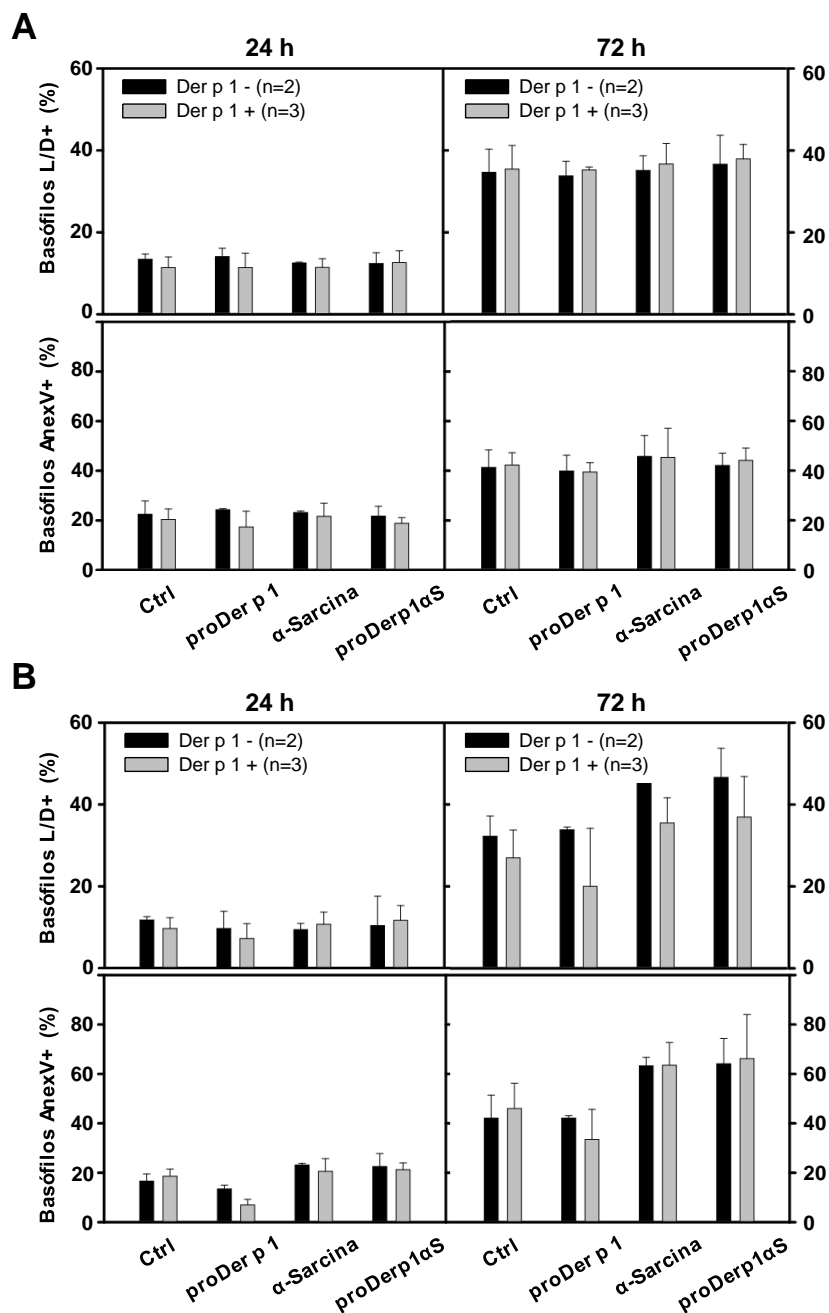


Figura 16. Efecto citotóxico de proDerp1αS sobre basófilos de pacientes no alérgicos (barras negras) y alérgicos a Der p 1 (barras grises). Las gráficas muestran el efecto de las diferentes proteínas ensayadas a una concentración de 1 nM (A) y 1 μM (B) sobre la viabilidad celular, mediante el marcaje con LIVE/DEAD, y sobre los niveles de apoptosis, mediante el marcaje con Anexina V-FITC tras 24 y 72 h de incubación. Los resultados incluyen los valores promedio ± desviación típica obtenidos para dos pacientes no alérgicos y tres pacientes alérgicos a Der p 1.

o 10 nM no se observó ninguna variación significativa ni en el marcaje con Anexina V ni con la sonda LIVE/DEAD para ninguno de los tratamientos a ninguno de los tiempos analizados, 24 y 72 h (**Figura 16 A**). En los ensayos realizados a 1 μM, tras 72 h de incubación, tanto α-sarcina *wt* como proDerp1αS causaron un aumento significativo en el porcentaje de basófilos apoptóticos y no viables independientemente del tipo de paciente del que se habían obtenido ($P < 0,05$) (**Figura 16 B**). Sin embargo, la ausencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de este mismo efecto a las 24 h de estimulación, junto con la consideración de que este efecto únicamente se observó en los ensayos de concentración 1 μM , parece indicar que este resultado es consecuencia de la acumulación temporal de cierta citotoxicidad inespecífica frente a los basófilos causada tanto por proDerp1 αS como por α -sarcina *wt*.

Por tanto, aunque proDerp1 αS mostró interactuar de forma específica con la IgE presente en la membrana celular de los basófilos de los pacientes alérgicos a Der p1 (ensayos de BAT), al no mostrarse ningún efecto significativo sobre su viabilidad celular o apoptosis relativa respecto al número total de PBMCs; estos resultados cuestionaron la internación del complejo alérgeno-IgE-Fc ϵ RI tras su formación en la membrana celular de los basófilos.

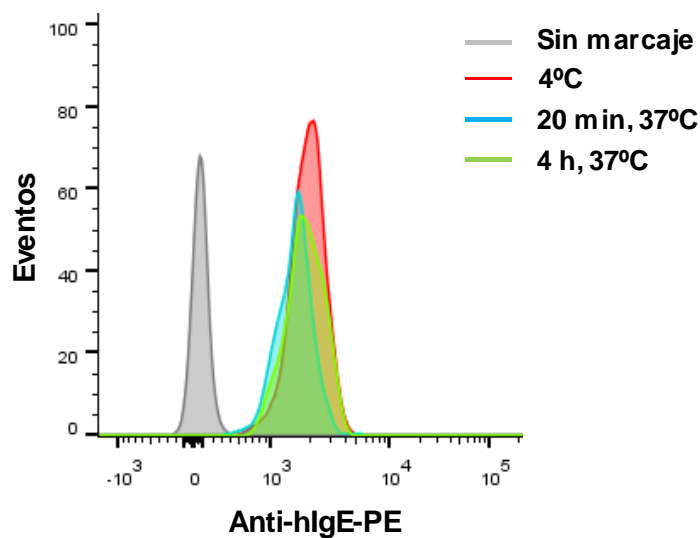


Figura 17. Ensayo de internación de IgE unida a Fc ϵ RI tras la estimulación con proDerp1 αS . Representación de los histogramas obtenidos para el marcaje anti-IgE de los basófilos (CCR3+/CD203c+) contenidos en las distintas alícuotas de sangre ensayadas. Después de su estimulación con proDerp1 αS durante 10 min a 37°C, las diferentes alícuotas de sangre del paciente #17 (alérgico a Der p 1) fueron incubadas durante: 4 h a 4°C como control de no-internación (rojo), 20 min a 37°C y después a 4°C (azul), y 4 h a 37°C (verde). Un tubo sin marcar, incubado 4 h a 37°C se incluyó como control (gris).

Para comprobar si esta internación alérgeno-dependiente, necesaria para el mecanismo de acción de proDerp1 αS , ocurre en los basófilos; se realizó un seguimiento de la cantidad IgE presente en su superficie celular transcurridos diferentes tiempos desde su estimulación con proDerp1 αS . Como se muestra en la **Figura 17**, los niveles de IgE en la membrana de los basófilos sensibilizados a Der p1 (paciente #17), detectados utilizando un anticuerpo anti-hIgE-PE, se mantuvieron estables durante las 4 h posteriores a la incubación con proDerp1 αS . Por tanto, estos resultados indican que el complejo IgE Der p 1-específica-Fc ϵ RI no sufrió una internación alérgeno-dependiente al menos durante las 4 h siguientes a la estimulación con proDerp1 αS .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.-IL33 α S

En este segundo apartado del Bloque II se presentan los resultados en relación con el diseño, producción, purificación y caracterización de una inmunotoxina alérgeno-independiente dirigida frente a aquellas células expresando el receptor ST2 en el contexto de la respuesta inflamatoria de tipo 2. Esta inmunotoxina, IL33 α S, se desarrolló siguiendo nuestro diseño de inmunotoxina monomérica incorporando como dominio marcador la forma madura de IL-33 murina (mIL-33). De forma paralela se muestra la producción y purificación de mIL-33, utilizada como control no tóxico durante la caracterización la inmunotoxina.

1. **mIL-33**: forma madura de la IL-33 murina (aminoácidos 109-266) producida de forma heteróloga en *P. pastoris* para ser utilizada como control funcional del dominio interleuquina en la caracterización de la inmunotoxina IL33 α S.
2. **IL33 α S**: inmunotoxina quimérica en cadena única compuesta por la forma madura de la IL-33 murina (dominio marcador) fusionada a α -sarcina (dominio tóxico) mediante el *linker* tripeptídico Gly-Gly-Arg.

2.2.1.-Diseño y obtención de los plásmidos de expresión

La obtención de los plásmidos de expresión para IL33 α S y mIL-33 de ratón se realizó, de manera análoga a lo descrito para las anteriores construcciones, desde los vectores pPICZ α AIMTXA33 α S (anteriormente obtenido por el grupo) y pUCIDT-proILUCM, el cual contenía el cDNA de la IL-33 murina completa.

Para la construcción del vector pPICZ α AIL33 α S, la secuencia codificante para mIL-33 se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 11 y 13. El fragmento amplificado se digirió con *EcoRI* y *NotI* y se insertó en la posición del dominio marcador del pPICZ α AIMTXA33 α S, anteriormente digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación se transformó en células *E. coli* cepa DH5 α F', tras lo que se electroporó en células de *P. pastoris* BG11.

El plásmido pPICZ α AIL33 para la expresión de mIL-33 en *P. pastoris*, se construyó mediante el clonaje del cDNA de mIL-33 en fase con el factor α , incluyéndose una extensión de seis histidinas en posición C-terminal. El fragmento "5'*EcoRI*-mIL-33-STOP-*SalI*3'" se amplificó desde el vector pUCIDTILUCM mediante los oligonucleótidos 11 y 12, incluyendo los sitios de restricción *EcoRI* (5') y *SalI* (3'). El fragmento amplificado se digirió con esas mismas endonucleasas, y se clonó en el vector

pPICZαAIMTXA33αS digerido también con *EcoRI* y *SalI*. El producto de la ligación se transformó en células *E. coli* DH5αF' y el plásmido de uno de los transformantes se utilizó para electroporar células *P. pastoris* BG11 y KM71.

2.2.2.-Producción y purificación de IL33αS

La primera prueba de producción de IL33αS, realizada según las condiciones estándar para las inmunotoxinas anteriormente descritas, mostró una gran cantidad de proteína secretada al medio extracelular, pero susceptible de degradación, para las cuatro colonias ensayadas (**Figura 18 A**). Esta degradación, detectada mediante un antisuero anti-α-sarcina, mostró dos bandas mayoritarias que se corresponden con los tamaños de IL33αS completa y α-sarcina escindida.

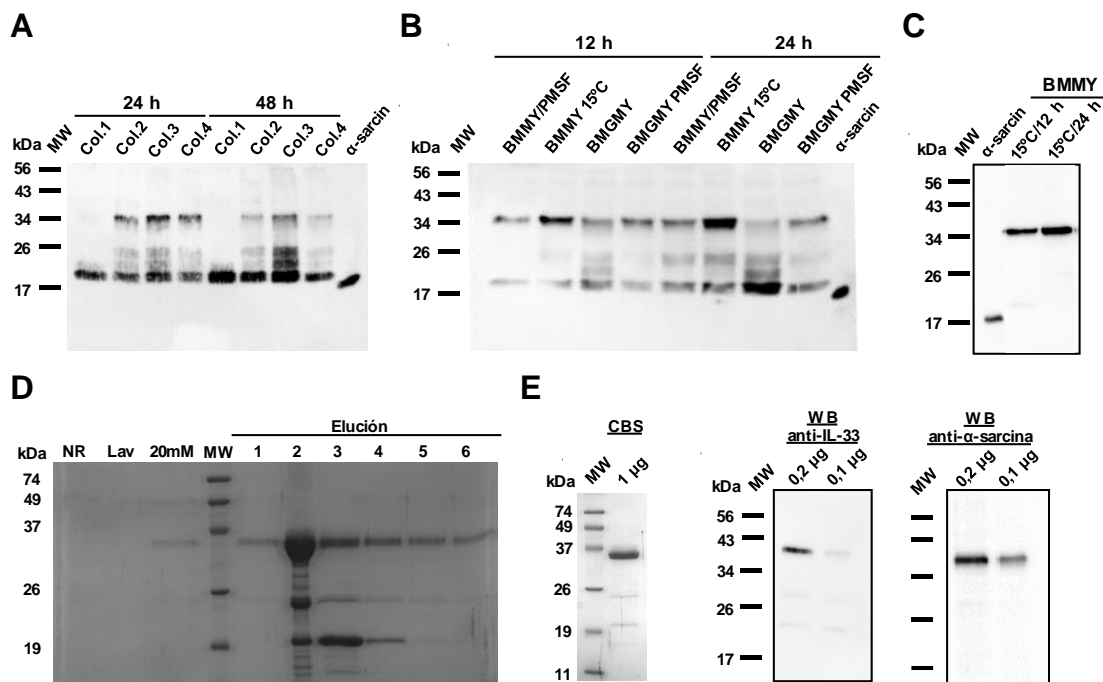


Figura 18. Análisis electroforético PAGE-SDS de la producción y purificación de IL33αS. A) Análisis de los medios extracelulares de las pruebas de producción de IL33αS mediante *Western blot* anti-α-sarcina tras 24 y 48 h de inducción a 25°C en BMMY. B) Análisis de los medios extracelulares tras 12 y 24 h de inducción en diferentes condiciones: temperatura, 15/25°C (25°C para todos aquellos casos no especificados); medio de inducción, BMMY/BMGMY, e inclusión de PMSF 1 mM (en los casos indicados). C) Seguimiento de la producción a gran escala de IL33αS mediante *Western blot* anti-α-sarcina del medio extracelular. D) Tinción con azul de Coomassie del PAGE-SDS de las fracciones recogidas durante la purificación de IL33αS mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA. Se muestran: NR, no retenido; Lav, fracción de lavado con tampón de cromatografía; 20 mM, fracción de lavado con tampón de cromatografía conteniendo imidazol 20 mM; y las primeras seis fracciones (1 ml) eluidas con imidazol 250 mM. E) IL33αS purificada: tinción azul de Coomassie (CBS) e inmunodetección mediante un anticuerpo policlonal anti-α-sarcina o un monoclonal anti-IL-33.

Las nuevas pruebas de expresión, buscando eliminar la degradación de la construcción, incluyeron las siguientes modificaciones en las condiciones de inducción de los cultivos: a) reducción de la temperatura de 25 a 15°C, b) adición de 1mM fluoruro de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fenilmetilsulfonilo (PMSF), c) utilización del medio de inducción BMGMY y d) reducción del tiempo de inducción máximo de 48 a 24 h. Además, esta segunda ronda de pruebas de expresión, se realizó con la colonia #3, la cual había presentado la menor degradación entre las colonias ensayadas en las primeras pruebas (**Figura 18 A**). De este modo, como se muestra en la **Figura 18 B**, la reducción de la temperatura a 15°C y la adición de PSMF 1 mM, provocaron una disminución independiente de la degradación de IL33 α S. Por último, mediante la combinación de estas dos condiciones en una nueva prueba de expresión se consiguió la secreción al medio extracelular de IL33 α S en gran cantidad y sin degradación observable (**Figura 18 C**).

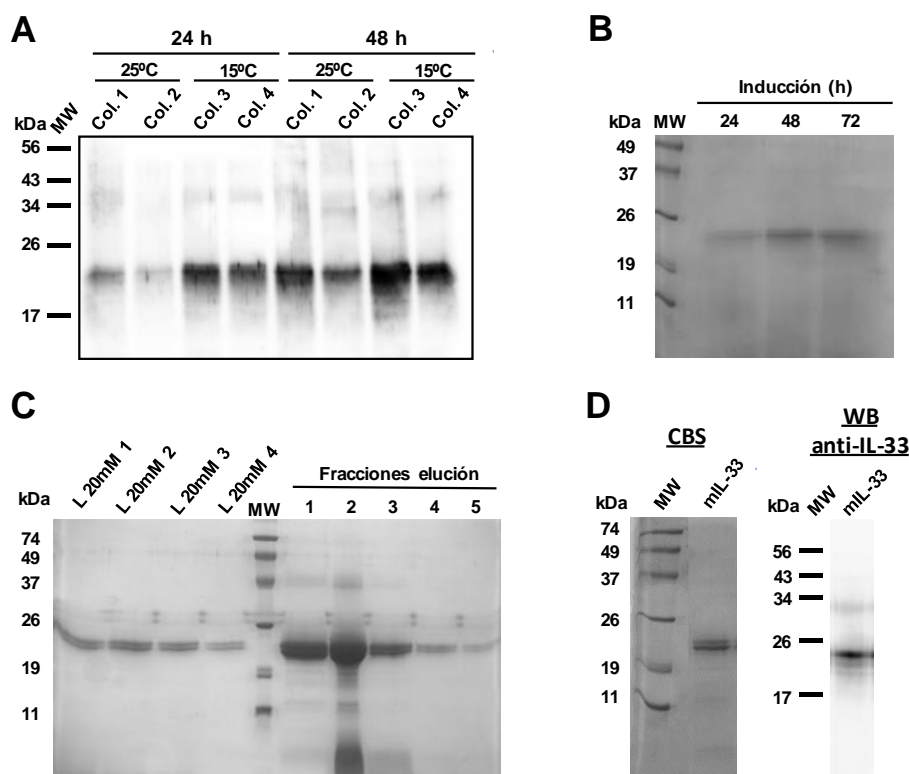


Figura 19. Análisis electroforético de la producción y purificación de mIL-33 recombinante. A) Análisis de los medios de extracelulares de las pruebas de producción de mIL-33 mediante *Western blot* anti-IL-33 tras 24 y 48 h de inducción a 25/15°C en BMMY suplementado con PMSF 1 mM. B) Análisis del medio extracelular de la producción a gran escala de mIL-33, tinción azul de Coomasie. C) Tinción con azul de Coomasie del PAGE-SDS de las fracciones recogidas durante la purificación de mIL-33 mediante cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA. Se muestran: cuatro fracciones de lavado imidazol 20 mM (L 20mM 1-4) y las primeras cinco fracciones eluidas con imidazol 250 mM. D) mIL-33 purificada: tinción azul de Coomasie (CBS) e inmunodetección mediante un anticuerpo monoclonal anti-IL-33.

La producción a gran escala de IL33 α S se llevó a cabo mediante el crecimiento habitual del cultivo, pero con una inducción en medio BMMY conteniendo PMSF 1mM durante 24 h a 15°C. El medio de expresión se dializó exhaustivamente en tampón fosfato 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5 y se aplicó a una columna de Ni²⁺-NTA agarosa. Tras los correspondientes lavados, mediante la elución con tampón de diálisis suplementado con imidazol 250 mM se obtuvieron diferentes fracciones conteniendo la inmunotoxina altamente concentrada (**Figura 18 D**). Por último, tras la diálisis para eliminar el imidazol,

se obtuvo la inmunotoxina IL33 α S purificada a homogeneidad, presentando una muy baja degradación de sus componentes, de acuerdo con el análisis electroforético (**Figura 18 E**).

Las condiciones de expresión optimizadas para la producción de IL33 α S fueron ensayadas para la producción recombinante de mL-33. Tanto en las pruebas de expresión (**Figura 19 A**) como en la producción a gran escala (**Figura 19 B**), el análisis de los medios de inducción mostró una banda proteica acorde al tamaño esperado para mL-33 murina (18,4 kDa).

La producción a gran escala de mL-33 se realizó en las mismas condiciones que para IL33 α S, tras lo cual la purificación desde el medio extracelular se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna Ni²⁺-NTA agarosa. Debido a la gran cantidad de proteína presente en el medio de inducción, la proteína eluyó tanto en los lavados con tampón fosfato imidazol 20 mM como en las fracciones recogidas tras la elución con imidazol 250 mM (**Figura 19 C**). Finalmente, las diferentes fracciones conteniendo mL-33 recombinante fueron homogeneizadas y dializadas para eliminar el imidazol.

Por tanto, tras su producción en *P. pastoris*, ambas proteínas, IL33 α S y mL-33, se purificaron en altas cantidades y a homogeneidad, de acuerdo a los criterios de movilidad electroforética y de inmunodetección de sus componentes (**Figura 18 E y Figura 19 D, respectivamente**). Los rendimientos finales fueron de 5 mg/l de medio de inducción para IL33 α S y de 15 mg/l para mL-33, con unos coeficientes de extinción molar $\epsilon_{280\text{nm}}$ de 37.360 y 14.690 M⁻¹·cm⁻¹, respectivamente.

2.2.3.-Caracterización estructural

La caracterización estructural de IL33 α S incluyó el análisis de sus componentes mediante *Western blot*, el registro de su espectro de CD en el UV-lejano y el estudio de su tamaño molecular en disolución.

El análisis de la identidad molecular de IL33 α S mediante análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes y reductoras, seguido de una inmunodetección por *Western blot*, mostró un reconocimiento específico anti-IL-33 y anti- α -sarcina, confirmando la naturaleza quimérica de la construcción (**Figura 18 E**).

El espectro de CD para la inmunotoxina purificada, mostrado en la **Figura 20 A**, sugiere un plegamiento globular formado mayoritariamente por lámina β , concordante con la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estructura secundaria de mL-33 (Liu *et al.*, 2013) y α -sarcina (Martínez del Pozo *et al.*, 1988; García-Ortega *et al.*, 2002).

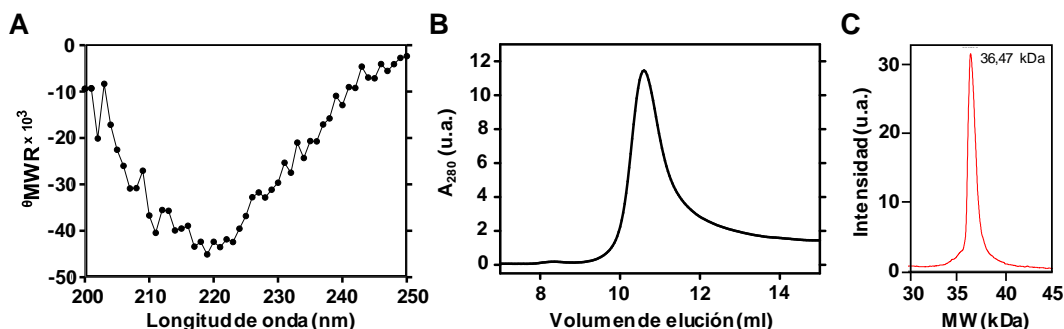


Figura 20. Caracterización estructural de IL33 α S. A) Espectro de CD en el UV-lejano (θ_{MRW} , elipticidad molar por residuo expresada como: grado \times $cm^2 \times$ $dmol^{-1}$). Espectro realizado en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4 con una concentración de proteína de 0,15 mg/ml. B) Análisis cromatográfico en columna Superdex 75 mediante FPLC. La proteína mostró un único pico simétrico de elución al volumen esperado para su tamaño teórico de 35,8 kDa. C) Espectro de masas MALDI-TOF registrado para la proteína purificada.

Finalmente, el análisis del tamaño molecular de la proteína en disolución mediante cromatografía de penetrabilidad FPLC mostró un único pico de elución acorde al volumen estimado para su tamaño teórico (**Figura 20 B**), correspondiéndose con una estructura de 36.470 Da mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (**Figura 20 C**).

2.2.4.-Caracterización funcional

Los estudios funcionales de IL33 α S incluyeron la evaluación *in vitro* de las actividades específicas de sus dominios IL-33 y α -sarcina, junto al examen de su actividad biológica conjunta y citotóxica sobre las células Raw 264.7, descritas en la literatura como células ST2-positivas (Bae *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

2.2.4.1.-Caracterización de la unión al receptor ST2/IL1RAP

En términos de unión a su receptor en superficie celular, IL33 α S se comportó de manera semejante a mL-33 recombinante. Ambas proteínas marcaron de una manera específica aquellas células ST2-positivas, Raw 264.7; pero no las células HeLa, ST2-negativas (**Figura 21 A**). Los ensayos de internación realizados con células en cultivo a 37°C, mostraron que, tras su unión al receptor, mL-33 sufrió una veloz internación celular (**Figura 21 B**), donde se acumuló de manera progresiva con el incremento del tiempo de incubación (**Figura 21 C**). Contrariamente, cuando la unión y la internación se desarrollaron a 4°C, las células mostraron un menor marcaje, que además, fue apagado en gran proporción mediante el apagamiento de la fluorescencia extracelular con azul de Tripán (**Figura 21 B y C**).

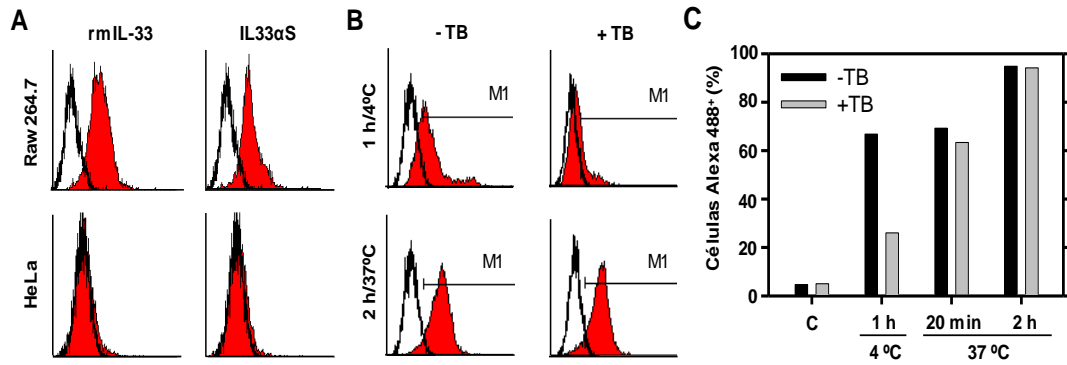


Figura 21. Estudios de unión e internación mediante citometría de flujo. A) Ensayos de unión mediante citometría de flujo de mIL-33 (izquierda) e IL33αS sobre células Raw 264.7 (ST2-positivas) y HeLa (ST2-negativas). Los histogramas muestran el marcaje registrado tras la incubación de las células con ambas construcciones marcadas con Alexa 488 durante 1 h a temperatura ambiente. B) Histogramas de los ensayos de internación en células Raw 264.7 utilizando mIL-33-Alexa 488. Se muestran las fluorescencias registradas tras la incubación de las células con la construcción durante 1 h a 4°C y 2 h a 37°C, antes y después del apagamiento de la fluorescencia externa con azul de Tripán. C) Representación del % de células Raw 264.7 positivas para Alexa 488 en las diferentes condiciones de incorporadas en los ensayos de internación con mIL-33.

2.2.4.2.-Caracterización de la actividad ribonucleolítica

De forma semejante al resto de inmunotoxinas descritas a lo largo de este trabajo, IL33αS mantiene la actividad ribonucleolítica de α-sarcina. Como se muestra en la **Figura 22**, ambas proteínas, α-sarcina e IL33αS, mostraron una actividad ribonucleolítica específica similar.

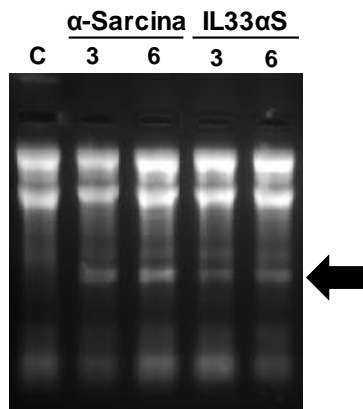


Figura 22. Caracterización funcional del dominio tóxico de la IL33αS. Ensayo de reticulocitos mostrando la liberación del fragmento-α, marcado por una flecha negra, como consecuencia de la actividad hidrolítica de α-sarcina sobre el SRL. Gel mostrando un ensayo realizado con 3 y 6 pmol de la inmunotoxina y α-sarcina fúngica. C, control negativo (ausencia de actividad ribonucleolítica).

2.2.4.3.-Caracterización de la actividad biológica y citotóxica sobre las células Raw 264.7

Por último, como parte de su caracterización funcional *in vitro*, se estudió el efecto de IL33αS sobre la activación celular y la promoción de la apoptosis en cultivos de células Raw 264.7, ST2-positivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

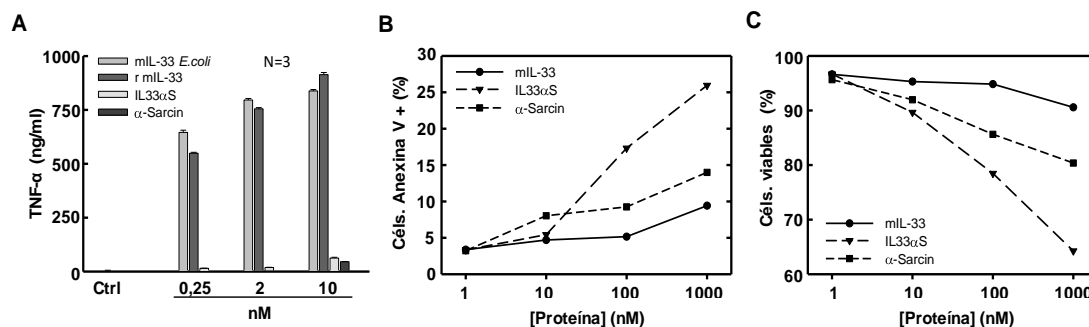


Figura 23. Actividad biológica y citotóxica de IL33αS sobre células Raw 264.7. A) Cuantificación de la secreción de TNF-α por células Raw 264.7 tras 24 h de estimulación con mL-33 comercial, mL-33 e IL33αS. Actividad citotóxica de IL33αS sobre células Raw 264.7 evaluada mediante marcaje con Anexina V-FITC/ioduro de propidio (IP) tras 24 h de incubación de los cultivos con la proteína: B) células marcadas como Anexina V positivas y C) células viables, Anexina V negativas e IP negativas.

Tras 24 h de incubación con las células, IL-33₁₀₉₋₂₆₆ comercial producida en *E. coli* (BioLegend) y la forma recombinante mL-33 producida en *P. pastoris* (mL-33) produjeron un potente incremento, dosis dependiente, en los niveles de TNF-α secretados al medio extracelular respecto al control de células no estimuladas (**Figura 23 A**). Por el contrario, aquellos cultivos tratados con IL33αS mostraron únicamente un ligero incremento en los niveles de TNF-α extracelular respecto al control sin tratamiento. Además, el resultado para IL33αS no se diferenció, a ninguna de las tres concentraciones ensayadas, de la secreción inespecífica de TNF-α producida por α-sarcina (**Figura 23 A**).

Por último, la citotoxicidad promovida por IL33αS sobre las células Raw 264.7 se evaluó mediante ensayos de muerte/apoptosis. Tras 24 h de incubación, el marcaje con Anexina V indicó un efecto proapoptótico de la construcción superior al mostrado por α-sarcina *wt* y mL-33 recombinante producida en *P. pastoris* (**Figura 23 B**). De forma paralela, el porcentaje de células vivas, Anexina V-FITC-negativas y yoduro de propidio-negativas, se redujo en mayor medida en aquellos cultivos tratados con IL33αS, que en los tratados con α-sarcina *wt* y mL-33 (**Figura 23 C**).

3.-Discusión

3.1.-proDerp1αS

En la actualidad, las hipersensibilidades de tipo I representan un importante problema de salud a nivel global, cuya prevalencia e impacto socioeconómico está previsto que aumente durante las próximas décadas; por lo que su adecuada prevención, diagnóstico y tratamiento se plantean como uno de los grandes retos sanitarios del siglo XXI

(**Pawankar et al., 2013**). En lo referido a su tratamiento, pese al amplio conocimiento alcanzado acerca de su mecanismo etiopatogénico; la variabilidad, complejidad y origen multifactorial de estas enfermedades persisten como importantes impedimentos para el desarrollo de una terapia plenamente efectiva. De este modo, aunque la inmunoterapia alérgeno-específica (AIT) se presenta en la actualidad como el único tratamiento con potencial curativo frente a las enfermedades alérgicas (**Campana et al., 2017; Curin et al., 2018**), su aplicación clínica plantea considerables restricciones, mostrando una efectividad variable entre pacientes, posibles efectos secundarios adversos y una limitada acción sobre los mecanismos efectores de la respuesta inflamatoria de tipo 2; factores que en conjunto pueden llegar a contrarrestar los beneficios clínicos potenciales de las terapias (**Akdis et al., 2014; Dhami et al., 2017; Nurmatov et al., 2017; Valenta et al., 2018**). Por otra parte, los mecanismos subyacentes al éxito o fracaso de la AIT continúan siendo mayoritariamente desconocidos, dificultando su optimización funcional y la adecuada aplicación en la práctica clínica de estas terapias.

Por este motivo, con el objetivo de desarrollar tratamientos más eficaces, convenientes y seguros para los pacientes alérgicos, en las últimas décadas se han desarrollado numerosas aproximaciones terapéuticas alternativas y/o complementarias a la AIT. Muchas de ellas, frecuentemente basadas en agentes biológicos, buscan superar las limitaciones del mecanismo de acción de la AIT mediante la modulación específica de la fase efectora de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, para así provocar una mejora en el curso y/o sintomatología de estas patologías.

Entre los diferentes agentes moduladores de la fase efectora de la respuesta alérgica propuestos como potenciales agentes terapéuticos destacan aquellos que presentan como diana molecular la IgE. Según su diana terapéutica particular y su mecanismo de acción, en este grupo se encuadran tres estrategias principales: a) los anticuerpos IgE bloqueantes, con el omalizumab (Xolair®, Novartis) a la cabeza (**Busse et al., 2001; Schulman, 2001; Kopp, 2011**), b) los anticuerpos dirigidos frente a la forma de IgE de membrana (mIgE) expresada en los linfocitos B de memoria (**Feichtner et al., 2008; Chen et al., 2010; Chowdhury et al., 2012; Gauvreau et al., 2014a; Nyborg et al., 2016**), y c) los anticuerpos dirigidos frente a FcεRI, buscando originar la inhibición de las células efectoras (**Khodoun et al., 2013; Hong et al., 2016**).

De este modo, aunque en la actualidad los anticuerpos IgE bloqueantes se presentan como una opción terapéutica adecuada para el tratamiento de diversas enfermedades alérgicas, en las que la IgE desempeña un papel significativo; las limitaciones relativas a sus posibilidades de aplicación y eficacia clínica han impulsado el desarrollo de otras

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alternativas experimentales dirigidas a la inhibición funcional y/o la neutralización de los linfocitos B mIgE+ y las células efectoras de la alergia. Entre estas estrategias destacan: a) la depleción selectiva de mastocitos y basófilos, bien mediante micelas cargadas de fármacos proapoptóticos conjugadas a un Fab anti-FcεRI (**Peng et al., 2015**) o mediante la inhibición del *check point* inmune mediante la proteína de fusión CTLA4-Fcε (**Perez-Witzke et al., 2016**); y b) la eliminación de los linfocitos B memoria mIgE+ mediante la citotoxicidad celular asociada a anticuerpo dirigida sobre mIgE (**Chen et al., 2010; Chowdhury et al., 2012; Gauvreau et al., 2014a; Nyborg et al., 2016**).

Incluida en esta estrategia terapéutica, basada en agentes citotóxicos dirigidos frente a aquellas células IgE- y/o FcεRI-positivas, se encuentra nuestra propuesta de inmunotoxina alérgeno-dirigida proDerp1αS; cuya producción y caracterización se han presentado en el Bloque II de Resultados. Debido a su mecanismo de acción, sustentado en la especificidad del reconocimiento IgE-alérgeno, proDerp1αS se postula como un agente citotóxico de precisión frente a aquellas células inmunes que presentan IgE Der p 1-específica en su membrana celular. De manera que, según nuestro planteamiento, su aplicación sistémica en un contexto de alergia a *D. pteronyssinus* promovería una depleción selectiva, y potencialmente terapéutica, de las células efectoras y de los linfocitos B memoria mIgE+ Der p 1-específicos. En este sentido, el desarrollo y caracterización de proDerp1αS responde a su utilización como prueba de concepto de una nueva clase de inmunotoxinas alérgeno-dirigidas, incluyendo el estudio de sus propiedades citotóxicas y la evaluación de sus posibilidades de aplicación terapéutica frente a las enfermedades alérgicas.

La producción de proDerp1αS se realizó satisfactoriamente en *P. pastoris*, purificándose desde el medio de expresión como una única especie proteica de 53 kDa, altamente homogénea, soluble y monomérica en disolución. Su tamaño se correspondió con el esperado para la proteína quimérica completa, incluyendo el propéptido N-terminal de la forma inmadura de Der p 1, necesario para el correcto plegamiento y secreción al medio extracelular de Der p 1 (**Chevigné et al., 2007; Zhang et al., 2009**). Por tanto, pese a la complejidad molecular de la construcción y a la potencial actividad endoproteasa del dominio Der p 1, proDerp1αS presentó una integridad molecular adecuada, cumpliendo los requisitos para su correcta purificación y posterior caracterización.

Los resultados de su caracterización bioquímica indicaron que esta inmunotoxina presenta integradas en una sola molécula la actividad endopeptidasa propia de Der p 1 y ribonucleolítica de α-sarcina. De forma interesante, en línea con lo descrito en la

literatura, el precursor inactivo rproDer p 1 no presentó actividad catalítica alguna sobre el sustrato peptídico Boc-QAR-AMC (**Jacquet et al., 2002; Takai et al., 2002**), mientras que la construcción proDerp1 α S desplegó una actividad similar a la forma natural de Der p 1. Una explicación a este fenómeno reside en la proximidad física descrita entre el dominio inhibitor N-terminal y el extremo C-terminal dentro de la estructura tridimensional de proDer p 1 (**Meno et al., 2005**). De modo que, la presencia del dominio α -sarcina en posición C-terminal de proDerp1 α S podría interferir sobre la adecuada funcionalidad y posición del dominio inhibitor N-terminal de proDer p 1 dentro de la inmunotoxina.

La especificidad citotóxica de proDerp1 α S, como en todas las inmunotoxinas, depende de la correcta funcionalidad de su dominio marcador. En este caso, como éste no está formado por un anticuerpo, sino por la forma inmadura del alérgeno Der p 1; según la hipótesis planteada para su mecanismo de acción, su correcta funcionalidad se define en base a su adecuado reconocimiento por las IgEs específicas de Der p 1. En todos los ensayos realizados para la caracterización de esta unión, la inmunotoxina se comportó de manera análoga al alérgeno rproDer p 1. Es decir, tanto en los ensayos de unión directa por IgE sérica, de inhibición competitiva, de desgranulación con células hFc ϵ RI RBL-2H3 como de BAT, la presencia de α -sarcina en proDerp1 α S no alteró de forma significativa, ni por exceso ni por defecto, el reconocimiento de la construcción por IgE. Además, dicho reconocimiento fue en todo caso específico, sucediendo únicamente con los sueros y basófilos de pacientes alérgicos a Der p 1, pero nunca con aquellos individuos no alérgicos a Der p 1. Finalmente, mediante los ensayos de ELISA inhibición competitiva y BAT, rproDer p 1 y proDerp1 α S mostraron un reconocimiento por IgE análogo, aunque ligeramente inferior a nDer p 1. Un resultado esperable, dadas las diferencias moleculares existentes entre la molécula rproDer p 1, no procesada y no glicosilada en N132, y la forma natural de Der p 1 frente a la que se han sensibilizado los pacientes alérgicos, mayoritariamente procesada y glicosilada en N132 (**Jacquet et al., 2002; Meno et al., 2005; Zhang et al., 2009**).

En conjunto, los resultados obtenidos para el reconocimiento por IgE, junto con los del análisis espectroscópico mediante CD en el UV-lejano, acordes con los de los componentes individuales de proDerp1 α S (**García-Ortega et al., 2002; Chruszcz et al., 2008**), sugirieron una elevada similitud conformacional y un elevado grado de conservación de los epítomos alérgicos entre el dominio proDer p 1 de proDerp1 α S y la forma natural de Der p 1. Por tanto, proDerp1 α S mostró comportarse en términos de actividad serín proteasa y alergenicidad de un modo equivalente a nDer p 1, pero

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

incorporando en su estructura la actividad ribonucleolítica potencialmente citotóxica de α -sarcina.

Abundando en los ensayos celulares, proDerp1 α S produjo una desgranulación dosis-dependiente tanto sobre las células hFc ϵ RI RBL-2H3 sensibilizadas con sueros conteniendo IgEs Der p 1-específicas como sobre los basófilos de pacientes alérgicos a Der p 1, pero en ningún caso sobre las células hFc ϵ RI RBL-2H3 sensibilizadas con sueros negativos para IgE Der p 1-específica o sobre basófilos de individuos no alérgicos a Der p 1. Estos resultados, junto al mecanismo de desgranulación mediada por alérgeno descrito para las células efectoras de la respuesta alérgica (**Passante & Frankish, 2009; Stone et al., 2010**), indican que la unión de proDerp1 α S a la superficie celular de hFc ϵ RI RBL-2H3 y los basófilos se produce específicamente a través del complejo IgE-Fc ϵ RI, provocando como consecuencia el entrecruzamiento de los receptores Fc ϵ RI y la consiguiente desgranulación celular.

En consonancia con los ensayos de desgranulación, el efecto citotóxico de proDerp1 α S sobre las células hFc ϵ RI RBL-2H3 se mostró estrictamente dependiente de la presencia de IgEs Der p 1-específicas en su superficie celular, causando la inhibición de la viabilidad celular únicamente sobre los cultivos sensibilizados con suero de pacientes alérgicos a Der p 1. En estos casos, aunque la concentración necesaria para causar un descenso significativo de la viabilidad celular fue elevada ($IC_{50} > 0,1 \mu M$), cuando proDerp1 α S se ensayó a $1 \mu M$ sí produjo una potente inhibición de la viabilidad celular que alcanzó valores del 75-80% para los cinco sueros IgE anti-Der p 1 positivos utilizados. Además, estos ensayos reafirmaron la especificidad de acción de proDerp1 α S, que no produjo ningún efecto significativo sobre la viabilidad de los cultivos de células hFc ϵ RI RBL-2H3 sensibilizados con suero de individuos no alérgicos a Der p 1.

A diferencia de los resultados obtenidos con las células hFc ϵ RI RBL-2H3, proDerp1 α S no produjo ningún efecto citotóxico específico sobre los basófilos de los pacientes alérgicos a Der p 1. Dado que la unión de la inmunotoxina a los basófilos IgE Der p 1-positivos fue comprobada previamente mediante el ensayo de BAT, mostrándose altamente específica y eficaz, existen tres posibles explicaciones causales para esta ausencia de acción citotóxica: a) la carencia de internación celular del complejo proDerp1 α S-IgE-Fc ϵ RI, b) la degradación completa del dominio tóxico de la construcción antes de su liberación al citoplasma y c) la resistencia de los basófilos al mecanismo de acción citotóxico de las ribotoxinas. Debido a que las opciones 2) y 3) no han sido descritas previamente para ninguna otra inmunotoxina ni ribotoxina, que alguna

de ellas sucediese en los basófilos parece extremadamente improbable (**Alewine et al., 2015; Olombrada et al., 2017 a**). Por tanto, la opción más factible es la ausencia de internación en los basófilos de los complejos IgE-FcεRI tras su entrecruzamiento en la membrana plasmática mediado por la unión del alérgeno. De este modo, la explicación del comportamiento radicalmente divergente, en términos de citotoxicidad específica producida por proDerp1αS, entre las células hFcεRI RBL-2H3 y los basófilos humanos IgE Der p 1-positivos se fundamentaría en las diferencias en el destino de la IgE celular tras su unión al alérgeno. Para las células RBL-2H3 ha sido descrito un rápido proceso de internación de estos complejos alérgeno-IgE-FcεRI (**Istersky et al., 1983; Furuichi et al., 1986**), semejante al que tiene lugar en los mastocitos tisulares (**Sancho-Serra et al., 2011; Hellman et al., 2017**). Por su parte, los basófilos humanos han mostrado internar IgE sérica a través de FcεRI de una forma alérgeno-independiente (**Greer et al., 2014**), pero esta internación no ha sido demostrada tras la unión de alérgeno, lo que concuerda con la comprensión actual de los basófilos circulantes como células puramente efectoras, que no participan en la presentación de antígeno y que por tanto no lo internan (**Eckl-Dorna et al., 2012; Sharma et al., 2013**).

Apoiando esta conjetura, los ensayos estudiando la internación de los complejos proDerp1αS-IgE-FcεRI en basófilos de pacientes alérgicos a Der p 1 mostraron que los niveles de IgE en la membrana celular permanecieron invariables durante las 4 h posteriores a la estimulación con proDerp1αS. Por tanto, aún sin datos experimentales sobre el destino de la IgE a tiempos mayores y sin el registro directo de la internación celular de proDerp1αS; estos resultados, sumados a la ausencia de algún efecto citotóxico específico observable tras 72 h desde a la estimulación con la inmunotoxina, sugieren que los basófilos humanos circulantes no internan el alérgeno una vez unido a IgE, sino que lo capturan y mantienen unido en su membrana durante largos periodos de tiempo.

De este modo, según nuestros resultados, el requerimiento de internación celular implícito al mecanismo de acción de proDerp1αS imposibilita su efecto citotóxico IgE-mediado sobre los basófilos circulantes; pero sí permite su actividad sobre las células hFcεRI RBL-2H3, donde el alérgeno unido a IgE presente en membrana sí parece ser internado (**Istersky et al., 1983; Furuichi et al., 1986**). Por tanto, aunque derivadas a partir de basófilos, pero habitualmente descritas como una línea modelo de mastocitos con una mezcla heterogénea de las funciones de ambos tipos celulares (**Passante & Frankish, 2009**), las células RBL-2H3 se comportan de manera semejante a los mastocitos tisulares, en los que también se ha demostrado la internación del complejo alérgeno-IgE-FcεRI (**Sancho-Serra et al., 2011; Hellman et al., 2017**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por tanto, en el contexto sistémico de la alergia a *D. pteronyssinus*, proDerp1 α S se presenta como una molécula con potencial citotóxico específico sobre los mastocitos tisulares marcados con IgE Der p 1-específica, pero no sobre los basófilos primados circulantes. Por otra parte, debido a sus implicaciones en el riesgo de anafilaxia, la activación alérgeno-dependiente de las células efectoras producida por proDerp1 α S se presenta como una importante limitación para el desarrollo de aproximaciones terapéuticas frente a la alergia basadas en este tipo de moléculas alérgeno-dirigidas. En este sentido, pese a que la utilización de α -sarcina como dominio tóxico de la construcción parece ideal para evitar la liberación extracelular de mediadores anafilácticos durante la eliminación citotóxica de las células cebadas (**Min et al., 2012; Peng et al., 2015**); las posibilidades de utilización de un alérgeno como dominio marcador de la construcción parecen restringidas en base al mecanismo de acción de la inmunotoxina alérgeno-dirigida, donde la desgranulación sucede minutos después de la unión del dominio alérgico al complejo IgE-Fc ϵ RI (**Galli & Tsai, 2012; Gould & Ramadani, 2015, Hellman et al., 2017**), mientras que la acción citotóxica de las inmunotoxinas basadas en α -sarcina requiere del transcurso de horas a días (**Nelson-Sangrà et al., 2012; Jones et al., 2016**).

Por último, hemos discutidos el efecto potencial que presentaría proDerp1 α S sobre los linfocitos B memoria mIgE-Der p 1+; los cuales, debido a su función productora de IgE-específica soluble, se plantean como la diana celular más relevante de nuestra aproximación en un contexto *in vivo*, cuya eliminación proveería de un mayor impacto terapéutico sobre el curso de la enfermedad alérgica (**Hu et al., 2018**). Para estas células ha sido descrita una eficiente internación de alérgenos naturales tras su unión a mIgE (**Laffleur et al., 2015; Laffleur et al., 2017**), que el caso de proDerp1 α S actuaría mediando el acceso de la construcción al interior celular, permitiendo el desempeño de su actividad citotóxica. Lamentablemente, debido a la escasez de esta población celular en sangre periférica, no se ha podido corroborar esta hipótesis mediante ensayos con PBMCs. Para estos estudios, analizando el impacto citotóxico de proDerp1 α S sobre los linfocitos B mIgE+ alérgeno-específicos, la opción más adecuada sería la utilización de un modelo de ratón alérgico a Der p 1. Un modelo que además permitiría estudiar el efecto *in vivo* de la inmunotoxina sobre el balance desgranulación/citotoxicidad de las células efectoras y su efecto citotóxico sobre otras poblaciones celulares implicadas en el mecanismo etiopatogénico de la alergia, así como su efecto sistémico sobre los niveles de diversos marcadores de la enfermedad alérgica (IgE-específica en sangre, citoquinas Th2, producción de mucus, infiltración de eosinófilos en el epitelio pulmonar, etc).

En conclusión, en base a los resultados obtenidos con proDerp1 α S, las inmunotoxinas alérgeno-dirigidas se muestran como un nuevo tipo de herramientas biotecnológicas capaces de provocar muerte celular de forma específica sobre aquellas células que reconozcan su dominio marcador a través de IgE. En este sentido, estas construcciones se comportarían de manera semejante a los diseños de inmunotoxina antitumoral desarrollados previamente por nuestro grupo (**Carreras-Sangrà et al., 2012; Tome-Amat et al., 2015c**), mostrando una actividad citotóxica altamente efectiva y dependiente de su internación celular. Respecto a sus posibilidades de aplicación como agentes terapéuticos frente a las enfermedades alérgicas, los resultados aquí presentados corroboran el planteamiento de estas moléculas como agentes citotóxicos frente a las células efectoras de la alergia, pero resultan insuficientes para afirmar rotundamente su potencial terapéutico, manifestando la necesidad de una caracterización *in vivo* en profundidad de los efectos de estas moléculas sobre el curso de la enfermedad alérgica. Por último, en caso de confirmarse que la utilización de un alérgeno como dominio marcador supusiese un impedimento definitivo para la adecuada función *in vivo* de estas construcciones, existen otros dominios marcadores con potencial terapéutico para el diseño de inmunotoxinas frente a la alergia. Entre estos destacan los anticuerpos frente a Fc ϵ RI y frente al dominio C ϵ mX de mIgE, utilizados actualmente en diversas aproximaciones terapéuticas centradas en la eliminación de las células efectoras de la alergia (**Peng et al., 2015**) y los linfocitos B mIgE+ (**Gavreau et al., 2014^a; Nyborg et al., 2016**), respectivamente. En definitiva, la existencia de multitud de dianas moleculares potencialmente aptas para el desarrollo de inmunotoxinas frente a estas patologías (**Hu et al., 2018**), la relevancia actual de los anticuerpos terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades alérgicas (**Landolina & Levi-Schaffer, 2016; Katial et al., 2017**) y las excelentes propiedades de estas moléculas en términos de especificidad y potencia citotóxica (**Alewine et al., 2015**), convierten a las inmunotoxinas en una familia de herramientas biotecnológicas con un gran potencial de desarrollo en el campo de los tratamientos de las enfermedades alérgicas.

3.2.-IL33 α S

Las citoquinas son importantes reguladores de la inmunidad innata y adaptativa que contribuyen decisivamente a la etiopatogenia de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En los últimos años, el desarrollo de diferentes inmunomoduladores específicos actuando sobre las rutas de señalización en las que participan estas moléculas, principalmente anticuerpos monoclonales e inhibidores de citoquinas, ha

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ampliado las opciones de tratamiento existentes frente a múltiples enfermedades como el cáncer, la alergia, la depresión y la artritis reumatoide (**Thompson et al., 2016; Katial et al., 2017; Kappelmann et al., 2018; Conlon et al., 2019**).

Hasta la fecha, respecto al tratamiento de las enfermedades alérgicas, la investigación en este tipo de agentes se ha centrado en el desarrollo de anticuerpos antagonistas de la señalización por citoquinas de tipo 2, específicamente frente a IL-4, IL-5 e IL-13, y sus receptores celulares. Aunque esta estrategia ha generado importantes resultados, destacando los diferentes anticuerpos terapéuticos aprobados para el tratamiento del asma y la rinitis alérgica (**Katial et al., 2017; Busse et al., 2019**), el reciente descubrimiento de nuevos actores moleculares implicados en la génesis y mantenimiento de la respuesta inflamatoria subyacente a las enfermedades alérgicas ha inaugurado un frente de investigación inédito centrado en la neutralización de citoquinas como TSLP (**Gavreau et al., 2014b**), IL-25 (**Shin et al., 2015**) e IL-33 (**Chen et al., 2018**).

En el marco de estas estrategias experimentales, la inmunotoxina IL33 α S se plantea como una aproximación dirigida frente a aquellas células que respondan a IL-33, en especial las células ILC2s, que desempeñan un rol fundamental en la exacerbación y mantenimiento de la inflamación alérgica pulmonar crónica de tipo 2 (**Liew et al., 2016; Starkey et al., 2019**). Debido a su mecanismo de acción, dirigido a provocar la muerte específica de las células ST2-positivas, IL33 α S representa un planteamiento diferencial y altamente novedoso frente a las aproximaciones terapéuticas convencionales actuando sobre el eje IL-33/IL-1RAP, centradas en su mayoría en la neutralización funcional de esta vía de señalización (**Chen et al., 2018; Gabrielska et al., 2019**).

Respecto a la utilización de citoquinas como dominio marcador de las inmunotoxinas, esta aproximación ha sido explorada desde los primeros diseños de esta clase de moléculas (**Strom et al., 1990**), habiendo quedado refrendada su validez y efectividad tras la aprobación para uso terapéutico de dos agentes antineoplásicos, formados, respectivamente, por IL-2 e IL-3 fusionadas a la toxina diftérica (*denileukin diftitox*, Ontak[®], y *tagraxofusp*, Elzonris[®]) (**Kim et al., 2020**). De este modo, aunque IL33 α S supone un desarrollo novedoso, debido a que sus dianas celulares no han sido abordadas previamente mediante este tipo de agentes, la viabilidad funcional de su especificidad y mecanismo de acción aparece respaldada por estos antecedentes.

La producción de IL33 α S se realizó, siguiendo los métodos habituales para nuestras inmunotoxinas basadas en α -sarcina, mediante su expresión heteróloga en la levadura *P. pastoris*. Sin embargo, a diferencia del resto de construcciones presentadas en esta

Tesis Doctoral, su inducción en condiciones estándar (medio de inducción BMMY y 25°C) dio lugar a una importante degradación molecular que resultaba incompatible con su adecuada purificación y caracterización. Con el objetivo de optimizar este balance se realizaron pruebas de expresión adicionales, lográndose eliminar por completo la degradación de la proteína mediante su inducción a 15°C en presencia del inhibidor de serín proteasas PMSF. De este modo, tras la optimización de sus condiciones de inducción, IL33 α S se purificó a homogeneidad, de forma soluble y monomérica, poseyendo la construcción un tamaño molecular acorde a su naturaleza química y un espectro de CD consistente con un plegamiento globular formado mayoritariamente por lámina β , estructura secundaria dominante en α -sarcina e IL-33 (**García-Ortega et al., 2002; Liu et al., 2013**).

La especificidad de la acción citotóxica de IL33 α S depende de su capacidad de unión al receptor heterodimérico ST2/IL1RAcP a través de su dominio marcador anclado a membrana, mL-33. Para IL-33, esta interacción ha sido descrita como un mecanismo dividido en dos fases consecutivas, incluyendo una unión de alta afinidad de IL-33 a su receptor primario ST2 y una unión posterior de baja afinidad del correceptor IL1RAcP sobre el heterodímero formado por IL-33/ST2, que da lugar a la estructura heterotrimérica. De este modo, la interacción específica de IL-33 con ST2 actúa como requisito indispensable para el posterior ensamblaje de IL1RAcP y la activación de la señalización vía MyD88/MAPK/NF κ B por el complejo receptor heterotrimérico (**Lingel et al., 2009; Molofski et al., 2015**). Tal y como se explica a continuación, la particularidad de este mecanismo en dos etapas secuenciales resultó fundamental para entender la interacción ocurrida entre IL33 α S y los receptores ST2 e IL1RAcP en la superficie de sus células diana.

En los ensayos de citometría de flujo para caracterizar su unión a ST2, IL33 α S se comportó de manera análoga a mL-33 recombinante, mostrando una unión altamente eficaz y específica sobre las células Raw 264.7, ST2-positivas (**Bae et al., 2012; Li et al., 2014**), pero no sobre las células HeLa, ST2-negativas. Sin embargo, aunque las dos proteínas marcaron las células Raw 264.7 de una manera semejante -presumiblemente a través de su interacción específica con ST2-, en los posteriores ensayos de estimulación celular únicamente mL-33 recombinante produjo la respuesta biológica esperada, expresada como la liberación de TNF- α equivalente a la inducida por la forma comercial de mL-33; mientras que el tratamiento con IL33 α S no causó ningún efecto significativo respecto a las células no estimuladas. De esto puede deducirse que, pese a no impedir la unión de IL33 α S a ST2, la presencia del dominio α -sarcina en el C-terminal de la construcción sí parece interferir con la posterior unión de IL1RAcP sobre

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el heterodímero IL33 α S/ST2, impidiendo la activación de la señalización vía MyD88/MAPK/NF- κ B y, por tanto, la secreción de TNF- α . Esta explicación se ve reforzada por el modelo estructural descrito para la interacción de IL-33 con ST2 y IL1RAcP, donde el extremo C-terminal de IL-33 se sitúa próximo a la región de interacción entre ST2 y IL1RAcP, pero alejado de la superficie de unión de IL-33 con ST2 (**Lingel et al., 2009**). Por tanto, según esta hipótesis, el propio diseño estructural de IL33 α S sería el responsable de impedir la activación de las células ST2-positivas esperada como consecuencia de su dominio mL-33.

Respecto a su dominio tóxico, IL33 α S incorporó adecuadamente la actividad ribonucleolítica de α -sarcina sin que la presencia del dominio marcador mL-33 alterase su funcionalidad. De este modo, de acuerdo a su naturaleza quimérica, IL33 α S se presenta como una proteína de fusión que incorpora en una sola molécula la capacidad de IL-33 para unirse específicamente a las células ST2-positivas y de la ribotoxina α -sarcina para causar la inhibición de la síntesis proteica una vez en el interior celular. Además, de manera fundamental para sus posibilidades de aplicación terapéutica, su unión a través de ST2 a sus células diana no provocó la activación celular vía MyD88/MAPK/NF- κ B propia de IL-33 (**Lingel et al., 2009; Bae et al., 2012; Molofski et al., 2015**). Un aspecto, este último, que actuaría como un elemento añadido a su potencial citotoxicidad ST2-dirigida para conseguir el objetivo propuesto para IL33 α S de neutralizar la respuesta inflamatoria desencadenada por las células responsivas a IL-33.

Como paso previo a la caracterización de su actividad citotóxica, nos propusimos estudiar si, tras su unión a ST2, IL33 α S sufría la internación celular necesaria para el correcto desempeño de su mecanismo de acción. En conjunto, la internación de los receptores de citoquina inducida por ligando es un proceso bien descrito entre los eventos implicados en la regulación de su señalización (**Carpenter & Cohen, 1990**). En el caso de ST2, frente a una elevada estabilidad en superficie celular en condiciones de no estimulación, la unión de IL-33 ha demostrado provocar la rápida internación, ubiquitinación y degradación del complejo receptor (**Zhao et al., 2012**). De forma coherente, nuestros experimentos con las células Raw 264.7 también mostraron una veloz internación de mL-33 recombinante, que parecía confirmar lo adecuado del uso de la dualidad de IL-33/ST2 como dominio marcador y diana molecular de nuestra inmunotoxina IL33 α S. Sin embargo, debido a la limitación temporal de esta investigación y a la hipótesis –demostrada errónea– de que en términos de internación IL33 α S se asemejaría a mL-33, estos experimentos no se realizaron con IL33 α S. De este modo, tras los ensayos de activación celular donde se mostró que la unión de IL33 α S a ST2

no promovía la formación del complejo receptor heterotrimérico, se evidenció que los resultados obtenidos para la internación de mIL-33, que sí promueve dicha trimerización, no pueden aplicarse a IL33 α S. Por tanto, sin información directa sobre su internación, pero con la certeza de que el comportamiento de ésta debe diferir fundamentalmente del observado para mIL-33, a falta de futuros de ensayos para estudiar este proceso, la realidad de la internación de IL33 α S se tendrá que inferir en base a su efecto citotóxico.

Por último, en los ensayos realizados para evaluar su actividad citotóxica frente a las células Raw 264.7, tras 24 h de incubación, IL33 α S exhibió un efecto proapoptótico e inhibidor de la viabilidad celular superior al causado tanto por α -sarcina *wt* como por mIL-33, para la que también ha sido descrita cierta actividad proapoptótica (**Akcay et al., 2011; Na et al., 2012**). Este resultado, añadido a la capacidad de marcaje celular ST2-dependiente de la construcción, se muestra indicativo de que la actividad citotóxica de IL33 α S presenta un comportamiento ST2-dirigido, en el que el dominio marcador mIL-33 actúa guiando y potenciando de forma específica el efecto citotóxico de α -sarcina frente a sus células diana. Dado lo preliminar de este resultado, para confirmar que IL33 α S presenta la acción citotóxica ST2-específica predicha por su mecanismo de acción, se requiere completar su caracterización incluyendo ensayos con al menos otra línea celular ST2-positiva y una línea ST2-negativa. Además, su bajo efecto citotóxico, que provoca un descenso en la viabilidad celular del 35% tras 24 h de tratamiento a una concentración de 1 μ M, debería evaluarse en profundidad, ampliando los tiempos de incubación hasta las 48 y 72 h, para obtener una perspectiva más amplia de su efecto citotóxico real. Así, la evaluación directa del comportamiento de internación de IL33 α S también aportaría información relevante para la interpretación de estos resultados; puesto que, aunque el efecto citotóxico potenciado de IL33 α S respecto a α -sarcina indica que la construcción sufre algún tipo de internación celular tras su unión a ST2, su actividad inhibidora de la unión de IL1RAcP sobre ST2 sugiere que el complejo IL33 α S/ST2 no sería internado del modo descrito para IL-33/ST2/ IL1RAcP, sino siguiendo el reciclaje basal del receptor ST2. Un proceso que, debido a su vida media de 5 h en superficie celular y su degradación proteasomal (**Zhao et al., 2012**), podría dar cuenta de una reducida acción citotóxica de IL33 α S sobre sus células diana.

Recapitulando, la caracterización de IL33 α S mostró un tamaño molecular y un plegamiento compatibles con las propiedades estructurales y funcionales de una proteína de fusión formada por mIL-33 murina (IL-33₁₀₉₋₂₆₆) y α -sarcina. Además, ambos dominios exhibieron una correcta funcionalidad, dotando a IL33 α S de capacidad de marcaje celular ST2-dependiente y de la actividad ribonucleolítica inactivadora de ribosomas propia de las ribotoxinas. Por último, IL33 α S mostró provocar la muerte

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

celular de las células Raw 264.7, ST2-positivas, sin causar su activación celular como consecuencia de su unión a ST2.

En base a estos resultados, la actividad citotóxica específica de IL33 α S se plantea como una herramienta con potencial para producir la depleción selectiva de las células ILC2s y los linfocitos Th2, ST2-positivas, en un contexto de inflamación alérgica pulmonar crónica caracterizado por elevados niveles locales de estas subpoblaciones celulares (Doherty & Broide, 2015; Liew *et al.*, 2016; Starkey *et al.*, 2019). De modo que, siguiendo nuestra hipótesis de partida, la reducción o eliminación de estas poblaciones celulares en el epitelio pulmonar podría contribuir a la mejora o resolución del proceso inflamatorio subyacente a dichas patologías.

En conclusión, la caracterización recogida en este trabajo, presenta a IL33 α S como una prueba de concepto funcional de una inmunotoxina cuya actividad citotóxica está específicamente dirigida por la unión de mL-33 al receptor ST2. La determinación de su potencial de aplicación *in vivo*, su efecto frente a las células ILC2s ST2-positivas y las consecuencias fisiopatológicas de esta actividad sobre el curso y sintomatología de la enfermedad permitirán evaluar con mayor profundidad el potencial de IL33 α S u otras aproximaciones similares como posibles opciones terapéuticas de las patologías alérgicas respiratorias crónicas. En cualquier caso, IL33 α S inaugura todo un campo de herramientas citotóxicas ST2-dirigidas con posibilidades de aplicación terapéutica frente a las enfermedades alérgicas independientemente del alérgeno causante de las mismas.

CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral, en consonancia con los objetivos planteados, permiten concluir que:

1.-Se dispone de la metodología necesaria para la producción, purificación y caracterización estructural y funcional de inmunotoxinas recombinantes compuestas por múltiples dominios marcadores (scFv, VHH, proDer p 1, IL-33) fusionados a la ribotoxina α -sarcina, dirigidas frente a diferentes enfermedades, como el cáncer o la alergia.

2.-Los diferentes diseños de inmunotoxinas antitumorales (IMTXCEA α S, IMTXTRICEA α S y VHHCEA5v2 α S) muestran una combinación eficaz de la funcionalidad de sus respectivos dominios marcadores y α -sarcina, produciendo un potente efecto citotóxico CEA-específico sobre sus células diana.

3.-En base a su formato *trimerbody*, IMTXTRICEA α S posee una capacidad de unión a CEA, una citotoxicidad específica *in vitro* y una actividad antitumoral *in vivo* significativamente superiores a su análogo monomérico, IMTXCEA α S. Así, la generación de inmunotoxinas triméricas basadas en el formato *trimerbody* se muestra como una estrategia adecuada para la optimización de estos inmunoterapéuticos.

4.-La quimera alérgeno-toxina, proDerp1 α S, no sólo reconoce específica y eficazmente sueros de pacientes sensibilizados, en forma análoga al alérgeno Der p 1, sino que la incorporación del dominio tóxico añade un efecto citotóxico sobre las células RBL-2H3 hFc ϵ RI sensibilizadas con IgE Der p 1-específica, utilizadas como modelo. Sin embargo, este efecto citotóxico no aparece sobre los basófilos de pacientes alérgicos a Der p 1, debido a la falta de internación del complejo inmunotoxina-IgE-Fc ϵ RI en estas células.

5.-IL33 α S mostró una unión celular ST2-específica semejante a IL-33, pero sin provocar la activación celular propia de la interacción IL-33/ST2. Sin embargo, la construcción sí causó un efecto citotóxico ST2-dependiente sobre las células Raw 264.7 basado en un mecanismo de acción alérgeno-independiente.

6.-La capacidad para provocar muerte celular antígeno-específica postula a las inmunotoxinas basadas en α -sarcina como herramientas con potencial terapéutico, no solo frente al cáncer, si no también frente a otras patologías, como la alergia.

BIBLIOGRAFÍA

- Akcay, A., Nguyen, Q., He, Z., Turkmen, K, Won Lee, D., Hernando, A.A., Altmann, C., Toker, A., Pacic, A., Ljubanovic, D.G., Jani, A., Faubel, S. & Edelstein, C.L. (2011). IL-33 exacerbates acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, (11), 2057-2067.
- Akdis, M. & Akdis, C.A. (2012). IgE class switching and cellular memory. *Nature Immunology*, 13(4), 312-314.
- Akdis, M. (2014). New treatments for allergen immunotherapy. *The World Allergy Organization journal*, 7(1), 23.
- Alewine, C., Hassan, R. & Pastan, I. (2015). Advances in anticancer immunotoxin therapy. *Oncologist*, 20(2),176-185.
- Ali, S., Huber, M., Kollwe, C., Bischoff, S., Falk, W. & Martin, M. (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18660-18665.
- Allakhverdi, Z., Comeau, M., Smith, D., Toy, D., Endam, L., Desrosiers, M., Liu, Y., Howie, K., Denburg, J., Gauvreau, G. & Delespesse, G. (2009). CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2), 472-478.
- Almqvist, Y., Steffen, A., Lundqvist, H., Jensen, H., Tolmachev, V. & Sundin, A. (2007). Biodistribution of 211At-Labeled Humanized Monoclonal Antibody A33. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 22(4), 480-487.
- Alvarez-Cienfuegos, A., Nuñez-Prado, N., Compte, M., Cuesta, A., Blanco-Toribio, A., Harwood, S., Villate, M., Merino, N., Bonet, J., Navarro, R., Muñoz-Briones, C., Sørensen, K., Mølgaard, K., Oliva, B., Sanz, L., Blanco, F. & Alvarez-Vallina, L. (2016). Intramolecular trimerization, a novel strategy for making multispecific antibodies with controlled orientation of the antigen binding domains. *Scientific Reports*, 6(1).
- Álvarez-García, E., García-Ortega, L., Verdún, Y., Bruix, M., Martínez del Pozo, Á. & Gavilanes, J. (2006). Tyr-48, a conserved residue in ribotoxins, is involved in the RNA-degrading activity of α -sarcin. *Biological Chemistry*, 387(5), 535–541.
- Antignani, A. & FitzGerald, D. (2013). Immunotoxins: The Role of the Toxin. *Toxins*, 5(8), 1486-1502.
- Antoniou, S. A. (2010). MEDI-528, an anti-IL-9 humanized antibody for the treatment of asthma. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 12, 233–239.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. & Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*, 414(3):521–6.
- Arruda, L.K., PlattsMills, T.A., Fox, J.W. & Chapman, M.D. (1990). Aspergillus fumigatus allergen I, a major IgE binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *Journal Experimental Medicine*, 172: 529–532.
- Arezumand, R., Alibakhshi, A., Ranjbari, J., Ramazani, A. & Muyldermans, S. (2017). Nanobodies As Novel Agents for Targeting Angiogenesis in Solid Cancers. *Frontiers in immunology*, 8, 1746.
- Arruda, L.K., Mann, B.J. & Chapman, M.D. (1992) Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f1, in Aspergillus fumigatus. Implications for the immunopathogenesis of Aspergillus-related diseases. *Journal of Immunology*, 149: 3354–3359.
- Arshad, S.H. (2010) Does exposure to indoor allergens contribute to the development of asthma and allergy?. *Currently Allergy Asthma Reports*;10:49-55.
- Artis, D. & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517:293-301
- Bacac, M., Fauti, T., Sam, J., Colombetti, S., Weinzierl, T., Ouaret, D., Bodmer, W., Lehmann, S., Hofer, T., Hosse, R.J., Moessner, E., Ast, O., Bruenker, P., Grau-Richards, S., Schaller, T., Seidl, A., Gerdes, C., Perro, M., Nicolini, V., Steinhoff, N., Dudal, S., Neumann, S., von Hirschheydt, T., Jaeger, C., Saro, J., Karanikas, V., Klein, C. & Umaña, P. (2016). A Novel Carcinoembryonic Antigen T-Cell Bispecific Antibody (CEA TCB) for the Treatment of Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 22(13):3286-97.
- Bachran, C., Schröder, M., Conrad, L., Cragolini, J.J., Tafesse, F.G., Helming, L., Ploegh, H.L. & Sweet, L.K. (2017). The activity of myeloid cell-specific VHH immunotoxins is target-, epitope-, subset- and organ dependent. *Scientific Reports*, 7(1), 17916.

BIBLIOGRAFÍA

- Bae, S., Kang, T., Hong, J., Lee, S., Choi, J., Jhun, H., Kwak, A., Hong, K., Kim, E., Jo, S. & Kim, S. (2012). Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8205-8213.
- Bagnasco, D., Caminati, M., Ferrando, M., Aloè, T., Testino, E., Canonica, G., & Passalacqua, G. (2018). Anti-IL-5 and IL-5Ra: Efficacy and Safety of New Therapeutic Strategies in Severe Uncontrolled Asthma. *Biomed Research International*, 2018, 1-8.
- Ballantyne, S., Barlow, J., Jolin, H., Nath, P., Williams, A., & Chung, K. *et al.* (2007). Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6), 1324-1331.
- Bandara, G., Beaven, M.A., Olivera, A., Gilfillan, A.M. & Metcalfe, D.D. (2015). Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33. *European Journal of Immunology*, 45(11), 3034–3044.
- Bar-Ephraim, Y.E. & Mebius, R.E. (2016). Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. *Immunological Reviews*, 271, 185–199.
- Barlow, J.L. & McKenzie, A.N. (2014). Type-2 innate lymphoid cells in human allergic disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 14(5), 397–403.
- Barnig, C., Cernadas, M., Dutile, S., Liu, X., Perrella, M.A., Kazani, S., Wechsler, M.E., Israel, E. & Levy, B.D. (2013). Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Science Translational Medicine*, 5(174), 174ra26.
- Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarström, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S.H., Lucka, L., Najjar, S.M., Neumaier, M., Obrink, B., Shively, J.E., Skubitz, K.M., Stanners, C.P., Thomas, P., Thompson, J.A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S. & Zimmermann, W. (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Experimental Cell Research*, 252(2), 243-9.
- Beauchemin, N. & Arabzadeh, A. (2013). Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 32(3-4), 643-671.
- Beck, L.A., Marcotte, G.V., MacGlashan, D., Togias & A., Saini, S. (2004). Omalizumab-induced reductions in mast cell FcεRI expression and function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 527–530.
- Begent, R.H.J., Verhaar, M.J., Chester, K.A., Casey, J.L., Green, A.J., Napier, M.P., Hope-Stone, L.D., Cushen, N., Keep, P.A., Johnson, C.J., Hawkins, R.E., Hilson, A.J.W. & Robson, L. (1996). Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nature Medicine*, 2, 979-984.
- Bemani, P., Mohammadi, M. & Hakakian, A. (2018). ScFv Improvement Approaches. *Protein Peptides Letters*, 25(3), 222-229.
- Berger, M., Shankar, V., & Vafai, A. (2002). Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. *American Journal of Medical Science*, 324.
- Berger, E.A. & Pastan, I. (2010). Immunotoxin complementation of HAART to deplete persisting HIV-infected cell reservoirs. *PLOS Pathogens*, 6, e1000803.
- Blakey, D.C., Skilleter, D.N., Price, R.J., Watson, G.J., Hart, L.I., Newell, D.R., Thorpe, P.E. (1988). Comparison of the pharmacokinetics and hepatotoxic effects of saporin and ricin A-chain immunotoxins on murine liver parenchymal cells. *Cancer Research*. 48(24 Pt 1), 7072-7078.
- Blanco-Toribio, A., Sainz-Pastor, N., Álvarez-Cienfuegos, A., Merino, N., Cuesta, A.M., Sánchez-Martín D, Bonet J, Santos-Valle P, Sanz L, Oliva B, Blanco FJ, Álvarez-Vallina L. (2013). Generation and characterization of monospecific and bispecific hexavalent trimerbodies. *MAbs*, 5(1),70-9.
- Blanco-Toribio, A., Lacadena, J., Nuñez, N., Alvarez-Cienfuegos, A., Villate, M., Compte, M., Sanz, L., Blanco, F., Alvarez-Vallina, L. (2014). Efficient production of single-chain fragment variable-based N-terminal trimerbodies in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 13:116
- Blomme, K., Tomassen, P., Lapeere, H., Huvenne, W., Bonny, M., Acke, F., Bachert, C. & Gevaert P. (2013). Author information. Prevalence of allergic sensitization versus allergic rhinitis symptoms in an unselected population. *International Archives of Allergy and Immunology*, 160, 200-207.
- Blythman, H.E., Casellas, P., Gros, O., Gros, P., Jansen, F.K., Paolucci, F., Pau, B., & Vidal, H. (1981) Immunotoxins: Hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. *Nature*, 290, 145–146.

- Boder, E.T., & Wittrup, K.D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15, 553–557.
- Boehm, M.K., Corper, A.L., Wan, T., Sohi, M.K., Sutton, B.J., Thornton, J.D., Keep, P.A., Chester, K.A., Begent, R.H. & Perkins, S.J. (2000). Crystal structure of the anti-(carcinoembryonic antigen) single-chain Fv antibody MFE-23 and a model for antigen binding based on intermolecular contacts. *The Biochemical journal*, 346 (2), 519-28.
- Boehm, M.K. & Perkins, S.J. Structural models for carcinoembryonic antigen and its complex with the single-chain Fv antibody molecule MFE23. *FEBS Lett.*, 475(1):11-6.
- Boonstra, M.C., Tolner, B., Schaafsma, B.E., Boogerd, L.S., Prevoo, H.A., Bhavsar, G., Kuppen, P.J., Sier, C.F., Bonsing, B.A., Frangioni, J.V., van de Velde, C.J., Chester, K.A. & Vahrmeijer, A.L. (2015). Preclinical evaluation of a novel CEA-targeting near-infrared fluorescent tracer delineating colorectal and pancreatic tumors. *International Journal of Cancer*, 137(8), 1910-20.
- Boudko, S.P., Sasaki, T., Engel, J., Lerch, T.F., Nix, J., Chapman, M. S., & Bächinger, H. P. (2009). Crystal structure of human collagen XVIII trimerization domain: A novel collagen trimerization Fold. *Journal of Molecular Biology*, 392(3), 787–802.
- Brandhorst, T.T. & Kenealy, W.R. Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. (1992). *Journal of General Microbiology*, 138(7), 1429-35.
- Brandt, E. B., Myers, J. M., Ryan, P. H., & Hershey, G. K. (2015). Air pollution and allergic diseases. Current opinion in pediatrics, 27(6), 724–735.
- Brightling, C.E., Chanez, P., Leigh, R., O'Byrne, P.M., Korn, S., She, D., May, R.D., Streicher, K., Ranade, K. & Piper, E. (2015). Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respiratory Medicine*, 3, 692-701.
- Britanova, L. & Diefenbach, A. (2017). Interplay of innate lymphoid cells and the microbiota. *Immunology Reviews*, 279, 36–51.
- Brummendorf, T. & Rathjen, F.G. (1995). Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. Protein Profile. 2:963–1108. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2, 184-90.
- Buku, A., Keselman, I., Lupyan, D., Mezei, M. & Price, J.A. (2008). Effective mast cell degranulating peptide inhibitors of the IgE/FcεRI receptor interaction. *Chemical Biology and Drug Design*, 72, 133–139.
- Burks, A.W., Calderon, M.A., Casale, T., Cox, L., Demoly, P., Jutel, M., Nelson, H. & Akdis, C.A. (2013). Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(5), 1288-1296.
- Busse, W., Corren, J., Lanier, B.Q., McAlary, M., Fowler-Taylor, A., Cioppa, G.D., van As, A. & Gupta, N. (2001). Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(2), 184-190.
- Busse, W.W., Katial, R., Gossage, D., Sari, S., Wang, B., Kolbeck, R., Coyle, A.J., Koike, M., Spitalny, G.L., Kiener, P.A., Geba, G.P. & Molfino, N.A. (2010). Safety profile, pharmacokinetics, and biologic activity of MEDI-563, an anti-IL-5 receptor alpha antibody, in a phase I study of subjects with mild asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 1237-1244.e2.
- Busse, W.W., Holgate, S., Kerwin, E., Chon, Y., Feng, J., Lin, J. & Lin, S.L. (2013) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(11), 1294-1302.
- Busse, W. (2019). Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. *Allergology International*, 68(2), 158-166.
- Byers, V.S., Pawluczyk, I.Z.A., Hooi, D.S.W., Price, M.R., Carroll, S., Embleton, M.J., Garnett, M.C., Berry, N., Robins, R.A. & Baldwin, R.W. (1991). Endocytosis of immunotoxin-791T/36-RTA by tumor cells in relation to its cytotoxic action. *Cancer Research*, 51, 1990-1995.
- Cai, W., Olafsen, T., Zhang, X., Cao, Q., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Wu, A.M. & Chen, X. (2007) PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *Journal of Nuclear Medicine*, 48(2), 304-310.

BIBLIOGRAFÍA

- Cai, T., Qiu, J., Ji, Y., Li, W., Ding, Z., Suo, C., Chang, J., Wang, J., He, R., Qian, Y., Guo, X., Zhou, L., Sheng, H., Shen, L. & Qiu, J. (2019). IL-17-producing ST2+ group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(1), 229-244.e9.
- Calderón, MA., Linneberg, A., Kleine-Tebbe, J., De Blay, F., Hernandez Fernandez de Rojas, D., Virchow, J.C. & Demoly, P. (2015). Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 38-48.
- Campana, R., Huang, H.J., Freidl, R., Linhart, B., Vrtala, S., Wekerle, T., Karaulov, A. & Valenta, R. (2017). Recombinant allergen and peptide-based approaches for allergy prevention by oral tolerance, *Seminars in Immunology*, 30, 67-80.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. & Rico, M. (1996a). ¹H and ¹⁵N nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease asaricin. *Protein Science*, 5, 969-972.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. & Rico, M. (1996b). Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease asaricin. *FEBS Letters*, 399, 163-165.
- Cao, Y., Marks, J.D., Marks, J.W., Cheung, L.H., Kim, S. & Rosenblum, M.G. (2009). Construction and characterization of novel, recombinant immunotoxins targeting the Her2/neu oncogene product: in vitro and in vivo studies. *Cancer Research*, 69, 8987-8995.
- Carpenter, G. & Cohen, S. (1990). Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14), 7709-7712.
- Carreras-Sangrà, N., Álvarez-García, E., Herrero-Galán, E., Tomé-Amat, J., Lacadena, J., Alegre-Cebollada, J., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G. and Martínez-Del-Pozo, A. (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9, 153-160.
- Carreras-Sangrà, N., Tomé-Amat, J., García-Ortega, L., Batt, C.A., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Lacadena, J. (2012) Production and characterization of colon cancer specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin α -Sarcin. *Protein Eng Des Sel*, 25:425-435.
- Castells, M. & Schwartz, L.B. (1988). Tryptase levels in nasal-lavage fluid as an indicator of the immediate allergic response. *Journal Allergy and Clinical Immunology*, 82, 348-355.
- Cayrol, C. & Girard, J.P. (2014). IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Current Opinion in Immunology*, 31, 31-37.
- Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S. & Kastelein, R.A. (2007). IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *Journal of Immunology*, 179(4), 2551-2555.
- Chames, P., Regenmortel, M.V., Weiss & E., Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for future. *British Journal of Pharmacology*, 159:220-223.
- Chan, A.C. & Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nature Reviews of Immunology*, 10: 301-316.
- Chang, T.W. & Shiung, Y.Y. (2006). Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(6), 1203-1312.
- Chen, J.B., Wu, P.C., Hung, A.F., Chu, C.Y., Tsai, T.F. & Yu, H.M. (2010). Unique epitopes on C epsilon mX in IgE-B cell receptors are potentially applicable for targeting IgE-committed B cells. *Journal of Immunology*, 184, 1748-1756.
- Cherry, W.B., Yoon, J., Bartemes, K.R., Iijima, K. & Kita, H. (2008). A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *Journal of Allergy Clinical and Immunology*, 121(6), 1484-1490.
- Chester, K.A., Begent, R.H.J., Robson, L., Keep, P.A., Pedley, R.B., Boden, J.A., Boxer, G., Green, A., Winter, G., Cochet, O. & Hawkins, R.E. (1994). Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. *Lancet*, 343, 455-456.
- Chester, K.A., Mayer, A., Bhatia, J., Robson, L., Spencer, D.I., Cooke, S.P., Flynn, A.A., Sharma, S.K., Boxer, G., Pedley, R.B. & Begent, R.H. (2000). Recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibodies for targeting cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46, Suppl:S8-12.

- Chevigné, A., Barumandzadeh, R., Gros Lambert, S., Cloes, B., Dehareng, D., Filée, P., Marx, J.C., Frère, J.M., Matagne, A., Jacquet, A. & Galleni, M. Relationship between propeptide pH unfolding and inhibitory ability during proDer p 1 activation mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 374(1), 170-85.
- Christianson, C.A., Goplen, N.P., Zafar, I., Irvin, C., Good, J.T. Jr, Rollins, D.R., Gorentla, B., Liu, W., Gorska, M.M., Chu, H., Martin, R.J & Alam, R. (2015). Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 59–68.
- Chruszcz, M., Chapman, M. D., Vailes, L. D., Stura, E. A., Saint-Remy, J. M., Minor, W., & Pomés, A. (2008). Crystal structures of mite allergens Der f 1 and Der p 1 reveal differences in surface-exposed residues that may influence antibody binding. *Journal of Molecular Biology*, 386(2), 520–530.
- Chowdhury, P.S., Chen, Y., Yang, C., Cook, K.E., Nyborg, A.C., Ettinger, R., Herbst, R., Kiener, P.A. & Wu, H. (2012). Targeting the junction of C-epsilon-mX and epsilon-miGis for the specific depletion of mIgE-expressing B cells. *Molecular Immunology*, 52, 279–288.
- Chu, D.K., Al-Garawi, A., Llop-Guevara, A., Pillai, R.A., Radford, K., Shen, P., Walker, T.D., Goncharova, S., Calhoun, W.J., Nair, P. & Jordana, M. (2015). Therapeutic potential of anti-IL-6 therapies for granulocytic airway inflammation in asthma. *Allergy Asthma and Clinical Immunology*, 11(1), 14.
- Coëffier, M., Lorentz, A., Manns, M.P. & Bischoff, S.C. (2005). Epsilon germ-line and IL-4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy. *Allergy*, 60, 822–827.
- Cohen, E.S., Scott, I.C., Majithiya, J.B., Rapley, L., Kemp, B.P., England, E., Rees D.G, Overed-Sayer, C.L., Woods, J., Bond, N.J., Veyssier, C.S., Embrey, K.J., Sims, D.A., Snaith, M.R., Vousden, K.A., Strain, M.D., Chan, D.T., Carmen, S., Huntington, C.E., Flavell, L., Xu, J., Popovic, B., Brightling, C.E., Vaughan, T.J., Butler, R., Lowe, D.C., Higazi, D.R., Corkill, D.J., May, R.D., Sleeman, M.A. & Mustelin, T. (2015). Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nature Communications*, 14, 6:8327.
- Collier R.J. (1967). Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: Inactivation of one of the transfer factors. *Journal of Molecular Biology*, 25, 83–98
- Colcher, D., Bird, R., Roselli, M., Hardman, K.D., Johnson, S., Pope, S., Dodd, S.W., Pantoliano, M.W., Milenic, D.E. & Schlom, J. (1990). In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(14), 1191-1197.
- Compte, M., Álvarez-Cienfuegos, A., Nuñez-Prado, N., Sainz-Pastor, N., Blanco-Toribio, A., & Pescador, N. *et al.* (2014). Functional comparison of single-chain and two-chain anti-CD3-based bispecific antibodies in gene immunotherapy applications. *Oncoimmunology*, 3(5), e28810.
- Conlon, K.C., Miljkovic, M.D. & Waldmann, T.A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 39(1), 6-21.
- Connor, J., Bucana, C., Fidler, I., & Schroit, A. (1989). Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 86(9), 3184-3188.
- Cooke, S., Pedley, R., Boden, R., Begent, R., & Chester, K. (2002). In Vivo Tumor Delivery of a Recombinant Single Chain Fv::Tumor Necrosis Factor- α Fusion Protein. *Bioconjugate Chemistry*, 13(2), 385-385.
- Corrigan, C., Wang, W., Meng, Q., Fang, C., Eid, G., & Caballero, M. *et al.* (2011). Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 128(1), 116-124.
- Cortez-Retamozo, V., Lauwereys, M., Hassanzadeh, G.G., Gobert, M., Conrath, K., Muyldermans, S., De Baetselier, P. & Revets, H. (2002). Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *International Journal of Cancer*, 98(3), 456–62.
- Cuesta, A.M., Sánchez-Martín, D., Sanz, L., Bonet, J., Compte, M, Kremer, L., Blanco, F., Oliva, B. & Alvarez-Vallina, L. (2009). In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen derivated sequences. *PLoS One*, 4, e5381.
- Cuesta, A.M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B. & Alvarez-Vallina, L. (2010). Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends in biotechnology*, 28, 7, 355-362.
- Curin, M., Khaitov, M., Karaulov, A., Namazova-Baranova, L., Campana, R, Garib, V. & Valenta, R. (2018). Next-Generation of Allergen-Specific Immunotherapies: Molecular Approaches. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(7), 39.
- Damasceno, L.M., Lee, F., Ritter, G., Old, L. & Batt, C. (2009). High-level expression of a phage display-derived scFv in *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology*, 562, 225-236.

BIBLIOGRAFÍA

- Dantzer, J.A. & Wood, R.A. (2018). The use of omalizumab in allergen immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy*, 48, 232–240.
- Deng, C., Xiong, J., Gu, X., Chen, X., Wu, S., Wang, Z., Wang, D., Tu, J. & Xie, J. (2017). Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency in vitro. *Oncotarget*, 8(24), 38568–38580.
- Deschildre, A., Marguet, C., Langlois, C., Pin, I., Rittié, J.L., Derelle, J., Abou Taam, R., Fayon, M., Brouard, J., Dubus, J.C., Siret, D., Weiss, L., Pouessel, G., Beghin, L. & Just, J. (2015). Real-life long-term omalizumab therapy in children with severe allergic asthma. *European Respiratory Journal*, 46(3), 856-859.
- Deyev, S.M., Waibel, R., Lebedenko, E.N., Schubiger, A.P., and Plückthun, A. (2003). Design of multivalent complexes using the barnasa-barstar module. *Nature Biotechnology*, 21, 1486–1492.
- Dhami, S., Kakourou, A., Asamoah, F., Agache, I., Lau, S., Jutel, M., Muraro, A., Roberts, G., Akdis, C.A., Bonini, M., Cavkaytar, O., Flood, B., Gajdanowicz, P., Izuhara, K., Kalayci, Ö., Mosges, R., Palomares, O., Pfaar, O., Smolinska, S., Sokolowska, M., Asaria, M., Netuveli, G., Zaman, H., Akhlaq, A. & Sheikh, A. (2017) Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 72(12), 1825-1848.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E. & Ait-Yahia, S. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 373–86.
- Doherty, T.A., Khorram, N., Chang, J.E., Kim, H.K., Rosenthal, P., Croft, M. & Broide, D.H. (2012) STAT6 regulates natural helper cell proliferation during lung inflammation initiated by *Alternaria*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(7), 577–588.
- Doherty, T.A. & Broide, D.H. (2015). Group 2 innate lymphoid cells: new players in human allergic diseases. *Journal of Investigations in Allergology and Clinical Immunology*, 25(1), 1-11.
- Donovan, C., Bourke, J.E & Vlahos, R. (2016). Targeting the IL-33/IL-13 Axis for Respiratory Viral Infections. *Trends Pharmacological Sciences*, 37, 252-261.
- Dougan, M. & Dranoff, G. (2009) . Immune therapy for cancer. *Annual Reviews in Immunology*, 27, 83-117.
- Doyle, P.J., Saeed, H., Hermans, A., Gleddie, S.C., Hussack, G., Arbabi-Ghahroudi, M., Seguin, C., Savard, M.E., Mackenzie, C.R. & Hall, J.C. (2009). Intracellular expression of a single domain antibody reduces cytotoxicity of 15-acetyldeoxyovalenol in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 35029-35039.
- Du, X., Beers, R., Fitzgerald, D.J. & Pastan, I. (2008). Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity. *Cancer Research*, 68, 6300–6305.
- Dumez, M.E., Herman, J., Campizi, V., Galleni, M., Jacquet, A. & Chevigné, A. (2014). Orchestration of an Uncommon Maturation Cascade of the House Dust Mite Protease Allergen Quartet. *Frontiers in Immunology*, 5, 138.
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K. & Frenken, L.G. (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*, 11(3), 500–515.
- Durham, S.R., Ying, S., Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderick, R.M., Mackay, I.S., Kay, A.B. & Hamid, Q.A. (1992) Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *Journal of Immunology*, 148, 2390-2394.
- Eades-Perner, A.M., van der Putten, H., Hirth, A., Thompson, J., Neumaier, M., von Kleist, S., & Zimmermann, W. (1994). Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Research*, 54, 4169–4176.
- Eckl-Dorna, J., Ellinger, A., Blatt, K., Ghanim, V., Steiner, I., Pavelka, M., Valent, P., Valenta, R. & Niederberger, V. (2012). Basophils are not the key antigen-presenting cells in allergic patients. *Allergy*, 67(5), 601-608.
- Eidelman, F.J., Fuks, A., DeMarte, L., Taheri, M., & Stanners, C. P. (1993). Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *The Journal of Cell Biology*, 123(2), 467–475.
- El Emir, E., Qureshi, U., Dearling, J.L., Boxer, G.M., Clatworthy, I., Folarin, A.A., Robson, M.P., Nagl, S., Konerding, M.A. & Pedley, R.B. (2007). Predicting response to radioimmunotherapy from the tumor microenvironment of colorectal carcinomas. *Cancer Research*, 67(24), 11896-11905.

- Emens, L.A., Ascierto, P.A., Darcy, P.K., Demaria, S., Eggermont, A.M.M., Redmond, W.L., Seliger, B. & Marincola, F.M. (2017). Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *European Journal of Cancer*, 81, 116-129.
- Endo, Y. & Wool, I.G. (1982). The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the α -sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 9054–9060.
- Endo, Y., Huber, P.W. & Wool, I.G. (1983) The ribonuclease activity of the cytotoxin α -sarcin. The characteristics of the enzymatic activity of α -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 2662–2667.
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V., & van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of Immunology*, 168(5), 2118–2126.
- Fan, C.Y., Huang, C.C., Chiu, W.C., Lai, C.C., Liou, G.G., Li, H.C. & Chou, M.Y. (2008) Production of multivalent protein binders using a self-trimerizing collagen-like peptide scaffold. *FASEB J*, 22(11), 3795-804.
- Fattakhova, G., Masilamani, M., Borrego, F., Gilfillan, A.M., Metcalfe, D.D. & Coligan, J.E. (2006). The high-affinity immunoglobulin-E receptor (Fc ϵ RI) is endocytosed by an AP-2/clathrin-independent, dynamin-dependent mechanism. *Traffic*;7(6):673-85.
- Fattori, V., Hohmann, M.S.N, Rossaneis, A.C., Manchope, M.F., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q. & Verri W.A. Jr. (2017). Targeting IL-33/ST2 signaling: regulation of immune function and analgesia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21, 1141-1152.
- Feichtner, S., Infuhr, D., Achatz-Straussberger, G., Schmid, D., Karnowski, A., Lamers, M., Rhyner, C., Cramer, R. & Achatz, G. (2008). Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo. *Journal of Immunology*, 180, 5499–5505
- Fernandes, C., Pereira, S., Luiz, M. B., Zuliani, J. P., Furtado, G. P., & Stabeli, R. G. (2017). Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. *Frontiers in immunology*, 8, 653.
- Fernandez-Puentes, C. & Carrasco, L. (1980). Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins, *Cell*, 20, 769-775.
- Ford, C.H., Tsaltas, G.C., Osborne, P.A. & Addetia, K. (1996). Novel flow cytometric analysis of the progress and route of internalization of a monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody. *Cytometry*. 23(3), 228-240.
- Foss, F.M., Saleh, M.N., Krueger, J.G., Nichols, J.C. & Murphy, J.R. (1998). Diphtheria toxin fusion proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 234, 63-61.
- Francis, R.J., Mather, S.J., Chester, K., Sharma, S.K., Bhatia, J., Pedley, R.B., Waibel, R., Green, A.J. & Begent, R.H. (2004). Radiolabelling of glycosylated MFE-23::CPG2 fusion protein (MFCEP1) with ^{99m}Tc for quantitation of tumour antibody-enzyme localisation in antibody-directed enzyme pro-drug therapy (ADEPT). *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31(8), 1090-1096.
- Frenzel, A., Kügler, J., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Hust, M., & Dübel, S. (2017). Designing Human Antibodies by Phage Display. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 44(5), 312–318.
- Fuchs, H., Bachran, C. & Flavell, D.J. (2013). Diving through Membranes: Molecular Cunning to Enforce the Endosomal Escape of Antibody-Targeted Anti-Tumor Toxins. *Antibodies*, 2, 209-235.
- Furuichi, K., Rivera, J., Buonocore, L. & Isersky, C. (1986). Recycling of receptor-bound IgE by rat basophilic leukemia cells. *Journal of Immunology*, 136(3), 1015-1022.
- Gabryelska, A., Kuna, P., Antczak, A., Białasiewicz, P., & Panek, M. (2019). IL-33 Mediated Inflammation in Chronic Respiratory Diseases-Understanding the Role of the Member of IL-1 Superfamily. *Frontiers in immunology*, 10, 692.
- Gachter, T., Werenskiold, A.K. & Klemenz, R. (1996). Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 124–9.
- Galand, C., Leyva-Castillo, J.M., Yoon, J., Han, A., Lee, M.S., McKenzie, A.N.J., Stassen, M., Oyoshi, M.K., Finkelman, F.D. & Geha, R.S. (2016). IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 1356-1366

BIBLIOGRAFÍA

- Galli, S.J. & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, 18, 693–704.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J. M., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., ... Kroemer, G. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24), 12472–12508.
- Gao, W., Tang, Z., Zhang, Y.F., Feng, M., Qian, M., Dimitrov, D.S. & Ho, M. (2015). Immunotoxin targeting glypican-3 regresses liver cancer via dual inhibition of Wnt signalling and protein synthesis. *Nature Communications*, 6, 6536.
- García-Mayoral, M.F., García-Ortega, L., Lillo, M.P., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. & Bruix, M. (2004). NMR structure of the noncytotoxic α -sarcin mutant D(7–22): the importance of the native conformation of peripheral loops for activity. *Protein Science*, 13, 1000–1011.
- García-Mayoral, M.F., Pantoja Uceda, D., Santoro, J., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G., Rico, M. & Bruix, M. (2005a). Refined NMR structure of α -sarcin by ^{15}N residual dipolar couplings. *European Biophysical Journal*, 34, 1057–1065.
- García-Mayoral, M.F., García-Ortega, L., Álvarez-García, E., Bruix, M., Gavilanes, J.G. & Martínez del Pozo, A. (2005b). Modelling the highly specific ribotoxin recognition of ribosomes. *FEBS Letters*, 579, 6859–6864.
- García-Ortega, L., Masip, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Lizarbe, M.A., García-Mayoral, M.F., Bruix, M., Martínez del Pozo, A. & Gavilanes, J.G. (2002) Deletion of the NH₂-terminal β -hairpin of the ribotoxin α -Sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 18632-1863.
- García-Ortega, L., Alvarez-García, E., Gavilanes, J.G., Martínez-del-Pozo, A. & Joseph, S. (2010). Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially affects EF-G and EF-Tu binding. *Nucleic Acids Research*, 38(12), 4108-19.
- Garrote, A., Bonet, R. (2004). Alergias y antialérgicos. Causas, tipos y tratamiento. *OFFARM*, 23(3), 82-92.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Turnay, J., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G. (1994). α -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles. *Current Topics in Peptides and Protein Research*, 1, 99-104.
- Gasset M, Mancheño JM, Laynez J, Lacadena J, Fernández-Ballester G, Martínez del Pozo A, Oñaderra M, Gavilanes JG. (1995) Thermal unfolding of the cytotoxin alpha-sarcin: phospholipid binding induces destabilization of the protein structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1252(1), 126-34.
- Gauvreau, G.M., Harris, J.M., Boulet, L.P., Scheerens, H., Fitzgerald, J.M., Putnam, W., Cockcroft, D.W., Davis, B.E., Leigh, R., Zheng, Y., Dahlén, B., Wang, Y., Maciuga, R., Mayers, I., Liao, X.C., Wu, L.C., Matthews, J.G. & O'Byrne, P.M. (2014). Targeting membrane-expressed IgE B cell receptor with an antibody to the M1 prime epitope reduces IgE production. *Science Translational Medicine*, 6(243), 243ra85.
- Gauvreau, G.M., O'Byrne, P.M., Boulet, L.P., Wang, Y., Cockcroft, D., Bigler, J., FitzGerald, J.M., Boedigheimer, M., Davis, B.E., Dias, C., Gorski, K.S., Smith, L., Bautista, E., Comeau, M.R., Leigh, R., Parnes, J.R. (2014). Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses. *New England Journal of Medicine*, 370(22), 2102-10.
- Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K. & LeibundGut-Landmann, S. (2013). Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *Journal of Immunology*, 190, 521–525.
- Glück, A. & Wool, I.G. (1996). Determination of the 28 S ribosomal RNA identity element (G4319) for α -sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site. *Journal of Molecular Biology*, 256, 838–848.
- Ghetie, V., Swindell, E., Uhr, J.W. & Vietetta, E.S. (1993). Purification and properties of immunotoxins containing one vs. two deglycosylated ricin A chains. *Journal of Immunological Methods*, 166, 117-122.
- Gold, P. & Freedman, S.O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *Journal of Experimental Medicine*, 122, 467-481.
- Gómez, E., Fernández, T.D., Doña, I., Rondon, C., Campo, P., Gomez, F., Salas, M., Gonzalez, M., Perkins, J.R., Palomares, F., Blanca, M., Torres, M.J. & Mayorga, C. (2015). Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clinical and Experimental Allergy*, 45(10), 1542-53.
- Gorlani, A., Hulsik, D.L., Adams, H., Vriend, G., Hermans, P. & Verrips, T. (2012). Antibody engineering reveals the important role of J segments in the production efficiency of llama single-domain antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Engineering, Design and Selection*, 25(1), 39-46.

- Gorski, S.A., Hahn, Y.S. & Braciale, T.J. (2013). Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. *PLoS Pathogenesis*, 9(9), e1003615.
- Gould, H.J. & Sutton, B.J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 205–217.
- Gould, H.J. & Ramadani, F. (2015). IgE responses in mouse and man and the persistence of IgE memory. *Trends in Immunology*, 36, 40-8.
- Graff, C.P., Chester, K., Begent, R. & Wittrup, K.D. (2004). Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17(4), 293-304.
- Graham, R. A., Wang, S., Catalano, P. J., & Haller, D. G. (1998). Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray, and colonoscopy. *Annals of surgery*, 228(1), 59–63.
- Greenfield, N. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890.
- Gueguen, C., Bouley, J., Moussu, H., Luce, S., Duchateau, M., Chamot-Rooke, J., Pallardy, M., Lombardi, V., Nony, E., Baron-Bodo, V., Mascarell, L. & Moingeon, P. (2016) Changes in markers associated with dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137, 545-58.
- Greer, A.M., Wu, N., Putnam, A.L., Woodruff, P.G., Wolters, P., Kinet, J.P. & Shin, J.S. (2014). Serum IgE clearance is facilitated by human FcεRI internalization. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1187-98.
- Griesenauer, B. & Paczesny, S. (2017). The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 24(8), 475.
- Halim, T.Y., Steer, C.A., Mathä, L., Gold, M.J., Martinez-Gonzalez, I., McNagny, K.M., McKenzie, A.N. & Takei, F. (2014). Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, 40(3), 425-35.
- Halim, T.Y. & Takei, F. (2014). Isolation and characterization of mouse innate lymphoid cells. *Current Protocols in Immunology*, 106, 3.25.21-23.25.13.
- Halim, T.Y.F, Krauß, R.H., Sun, A.C. & Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, 36, 451–63.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C. & Songa, E.B. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446–8.
- Hammarström, S. (1999). The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology*, 2, 67-81.
- Hams, E., Locksley, R.M., McKenzie, A.N. & Fallon, P.G. (2013). Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *Journal of Immunology*, 191, 5349-5353.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-80.
- Hanania, N.A., Alpan, O., Hamilos, D.L., Condemni, J.J., Reyes-Rivera, I., Zhu, J., Rosen, K.E., Eisner, M.D., Wong, D.A. & Busse, W. (2011). Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 154(9), 573-582.
- Hanania, N.A., Korenblat, P., Chapman, K.R., Bateman, E.D., Kopecky, P. & Paggiaro, P. (2016). Efficacy and safety of lebrikizumab in patients with uncontrolled asthma (LAVOLTA I and LAVOLTA II): replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet Respiratory Medicine*, 4, 781-96.
- Harris, J.M., Maciucia, R., Bradley, M.S., Cabanski, C.R., Scheerens, H., Lim, J., Cai, F., Kishnani, M., Liao, X.C., Samineni, D., Zhu, R., Cochran, C., Soong, W., Diaz, J.D., Perin, P., Tsukayama, M., Dimov, D., Agache, I. & Kelsen, S.G. (2016). A randomized trial of the efficacy and safety of quilizumab in adults with inadequately controlled allergic asthma. *Respiratory Research*, 17, 29.
- Harwood, S.L., Alvarez-Cienfuegos, A., Nuñez-Prado, N., Compte, M., Hernández-Pérez, S., Merino, N., Bonet, J., Navarro, R., Van Bergen, E., Henegouwen, P.M.P., Lykkemark, S., Mikkelsen, K., Mølgaard, K., Jabs, F., Sanz, L., Blanco, F.J., Roda-Navarro, P. & Alvarez-Vallina, L. (2017). ATTACK, a novel bispecific T cell-recruiting antibody with trivalent EGFR binding and monovalent CD3 binding for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 7(1), e1377874.

BIBLIOGRAFÍA

- Hassan, R., Bullock, S., Premkumar, A., Kreitman, R.J., Kindler, H., Willingham, M.C. & Pastan, I. (2007). Phase I study of SS1P, a recombinant anti-mesothelin immunotoxin given as a bolus I.V. infusion to patients with mesothelin-expressing mesothelioma, ovarian, and pancreatic cancers. *Clinical Cancer Research*, 13, 5144–5149.
- Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A. & Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26369–26380.
- He, D., Yang, H., Lin, Q. & Huang, H. (2005). Arg9-peptide facilitates the internalization of an anti-CEA immunotoxin and potentiates its specific cytotoxicity to target cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 192-205.
- Hellman, L.T., Akula, S., Thorpe, M. & Fu, Z. (2017). Tracing the Origins of IgE, Mast Cells, and Allergies by Studies of Wild Animals. *Frontiers in Immunology*, 8:1749.
- Herman, J., Thelen, N., Smargiasso, N., Mailleux, A.C., Luxen, A., Cloes, M., De Pauw, E., Chevigné, A., Galleni, M., & Dumez, M.E. (2014). Der p 1 is the primary activator of Der p 3, Der p 6 and Der p 9 the proteolytic allergens produced by the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochimical and Biophysical Acta*, 1840(3), 1117-1124.
- Herrero-Galán, E., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Boucias, D.G., Olmo, N., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (2008). The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin. *Proteins*, 72: 217–228.
- Herrero-Galán, E., Álvarez-García, E., Carrera-Sangrá, N., Lacadena, J., Alegre-Cebollada, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (2009). Fungal ribotoxins: structure, function and evolution. En *Microbial Toxins: Current research and future trends*.
- Herrero-Galán, E., García-Ortega, L., Olombrada, M., Lacadena, J., Martínez Del Pozo, Á., Gavilanes, J.G. & Oñaderra, M. (2013) Hirsutellin A: A Paradigmatic Example of the Insecticidal Function of Fungal Ribotoxins. *Insects*, 4(3), 339-356.
- Hirose, K., Iwata, A., Tamachi, T. & Nakajima, H. (2017). Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunological Reviews*, 278, 145–161.
- Hofsteenge, J. (1997). Ribonuclease inhibitor. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. & Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 621-658.
- Hong, J.Y., Bae, J.H., Lee, K.E., Kim, M., Kim, M.H., Kang, H.J., Park, E.H., Yoo, K.S., Jeong, S.K., Kim, K.W., Kim, K.E. & Sohn, M.H. (2016). Antibody to FcεR1α Suppresses Immunoglobulin E Binding to High-Affinity Receptor I in Allergic Inflammation. *Yonsei Medical Journal*, 57(6), 1412-9.
- Hong, H., Sun, J., & Cai, W. (2008). Radionuclide-Based Cancer Imaging Targeting the Carcinoembryonic Antigen. *Biomarker insights*, 3, 435–451.
- Hu, J., Chen, J., Ye, L., Cai, Z., Sun, J., & Ji, K. (2018). Anti-IgE therapy for IgE-mediated allergic diseases: from neutralizing IgE antibodies to eliminating IgE+ B cells. *Clinical and translational allergy*, 8, 27.
- Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., Williamson, P.R., Urban, J.F. Jr & Paul W.E. (2015). IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 16, 161–169.
- Huang, Y. & Paul, W. E. (2016). Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. *International Immunology*, 28, 23–28.
- Huang, Y., Mao, K., Chen, X., Sun, M.A., Kawabe, T., Li, W., Usher, N., Zhu, J., Urban, J.F. Jr, Paul, W.E. & Germain, R.N. (2018). S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science*, 359, 114–119.
- Hudson, P.J. & Souriau, C. (2003). Engineered antibodies. *Nature Medicine*, 9, 129–134.
- Huhlov, A., Graff, C., Wittrup, K., Tolner, B., Pedley, R., Verweken, W., Contreras, R., Begent, R.H.J. & Chester, K.A. (2004). HSAbodies: A new class of engineered antibody-based molecules for targeting cancer. *British Journal of Cancer*, 91, 63.
- Hull, E.A. (2014). Antibody Conjugates via Disulfide Bridging: Towards therapeutic and diagnostic applications. Doctoral Thesis, University College London, London.

- Ilantzis, C., DeMarte, L., Screatton, R. A., & Stanners, C. P. (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, 4(2), 151-163.
- Imai, Y., Yasuda, K., Sakaguchi, Y., Haneda, T., Mizutani, H. & Yoshimoto, T., (2013) Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 13921-13926.
- Inogés, S., Calvillo, M.R., Diaz de Cerio, A.L., Zabalegui, N., Ibarrola, A.S., Rocha, E. & Bendandi, M. (2004). Active immunotherapy in the treatment of haematological neoplasias. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 27, 45-62.
- Iversky, C., Rivera, J., Segal, DM. & Triche, T. (1983). The fate of IgE bound to rat basophilic leukemia cells. II. Endocytosis of IgE oligomers and effect on receptor turnover. *Journal of Immunology*, 131(1), 388-396.
- Iozzo, R.V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology*, 6(8), 646-56.
- Jacquet, A., Magi, M., Petry & H., Bollen, A. (2002). High-level expression of recombinant house dust mite allergen Der p 1 in *Pichia pastoris*. *Clinical and Experimental Allergy*, 32(7), 1048-1053.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S. & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), 522-525.
- Jones, T. D., Hearn, A. R., Holgate, R., Kozub, D., Fogg, M. H., Carr, F. J., ... Gehlsen, K. R. (2016). A deimmunised form of the ribotoxin, α -sarcin, lacking CD4+ T cell epitopes and its use as an immunotoxin warhead. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 29(11), 531–540.
- Kang, A.S., Barbas, C.F., Janda, K.D., Benkovic, S.J. & Lerner, R.A. (1991). Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 88:4363.
- Kao, R., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Cramer, R. & Davies, J. (2001). Mitogillin and related fungal ribotoxins. *Methods in Enzymology*, 341, 324-335.
- Kaplan, A.P., Joseph, K., Maykut, R.J., Geba, G.P. & Zeldin, R.K. (2008). Treatment of chronic autoimmune urticaria with omalizumab. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, 569–573.
- Kappellmann, N., Lewis, G., Dantzer, R., Jones, P.B. & Khandaker, G.M. Antidepressant activity of anti-cytokine treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials of chronic inflammatory conditions. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 335-343.
- Katial, R.K., Bensch, G.W., Busse, W.W., Chipps, B.E., Denson, J.L., Gerber, A.N., Jacobs, J.S., Kraft, M., Martin, R.J., Nair, P. & Wechsler, M.E. (2017). Changing Paradigms in the Treatment of Severe Asthma: The Role of Biologic Therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology Practices*, 5(2S), S1-S14.
- Katz, S.C., Burga, R.A., McCormack, E., Wang, L.J., Mooring, W., Point, G.R., Khare, P.D., Thorn, M., Ma, Q., Stainken, B.F., Assanah, E.O., Davies, R., Espat, N.J. & Junghans, R.P. (2015). Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases. *Clinical Cancer Research*, 21(14), 3149-3159.
- Kearley, J., Buckland, K.F., Mathie, S.A. & Lloyd, CM. (2009). Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(9), 772–781.
- Khodoun, M.V., Kucuk, Z.Y., Strait, R.T., Krishnamurthy, D., Janek, K., Lewkowich, I., Morris, S.C. & Finkelman, F.D. (2013). Rapid polyclonal desensitization with antibodies to IgE and Fc ϵ R1 α . *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(6), 1555-1564.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matousek, J. & Raines, R.T. (1995). Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 31097-31102.
- Kim, B.S., Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Noti, M., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Hepworth, M.R., Van Voorhees, A.S., Comeau, M.R. & Artis, D. (2013). TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Science Translational Medicine*, 5, 170ra16.
- Kim, Y.H., Yang, T.Y., Park, C.S., Ahn, S.H., Son, B.K., Kim, J.H., Lim, D.H. & Jang, T.Y. (2012). Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis. *Allergy*, 67, 183-190.
- Kimiz-Gebologlu, I., Gulce-Iz, S. & Biray-Avci, C. (2018). Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2935-2940.

BIBLIOGRAFÍA

- Kim, J.S., Jun, S.Y. & Kim, Y.S. (2020). Critical Issues in the Development of Immunotoxins for Anticancer Therapy. *Journal of Pharmacological Science*, 109(1), 104-115.
- Kipriyanov, S.M., Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S., & Dübel, S. (1996). Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein England*, 9, 203–211.
- Kirshenbaum, A.S., Akin, C., Wu, Y., Rottem, M., Goff, J.P., Beaven, M.A., Rao, V.K. & Metcalfe, D.D. (2003). Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcγRI. *Leukemia Research*, 27(8), 677-682.
- Klee, G.G. (2000). Human anti-mouse antibodies. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 124, 921–923.
- Klein Wolterink, R.G., Kleinjan, A., van Nimwegen, M., Bergen, I., de Bruijn, M., Levani, Y. & Hendriks, R.W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *European Journal of Immunology*, 42(5), 1106–1116.
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 296, 57–86.
- Knol, E.F., Mul, F.P., Jansen, H., Calafat, J. & Roos, D. (1991). Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88, 328-338.
- Knutson, S., Raja, E., Bomgarden, R., Nlend, M., Chen, A., Kalyanasundaram, R. & Desai, S. (2016). Development and Evaluation of a Fluorescent Antibody-Drug Conjugate for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Pancreatic Cancer. *PLoS One*, 11(6):e0157762
- Kohler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495–497.
- Kondo, T., FitzGerald, D., Chaudhary, V.K., Adhya, S. & Pastan, I. (1998). Activity of immunotoxins constructed with modified Pseudomonas exotoxin A lacking the cell recognition domain. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 9470-9475.
- Kopp, M.V. (2011) Omalizumab: Anti-IgE therapy in allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(2), 101-106.
- Kopp, M.V., Hamelmann, E., Bendiks, M., Zielen, S., Kamin, W., Bergmann, K.C., Klein, C. & Wahn, U. (2013). Transient impact of omalizumab in pollen allergic patients undergoing specific immunotherapy. *Pediatric Allergy Immunology*, 24, 427–433.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 51–55.
- Kouser, L., Kappen, J., Walton, R.P. & Shamji, M.H. (2017). Update on biomarkers to monitor clinical efficacy response during and post treatment in allergen immunotherapy. *Current Treatment Options in Allergy*, 4, 43-53.
- Kraeber-Bodéré, F., Rousseau, C., Bodet-Milin, C., Ferrer, L., Faivre-Chauvet, A., Campion, L., Vuillez, J.P., Devillers, A., Chang, C.H., Goldenberg, D.M., Chatal, J.F. & Barbet, J. (2006). Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and 131I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(2), 247-255.
- Krauss, J., Arndt, M.A.E., Dübel, S. & Rybak, S. (2008). Antibody-targeted RNase fusion protein (ImmunRNases) for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 231-234.
- Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T., Willingham, M.C., FitzGerald, D.J. & Pastan, I. (1990). The recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-Pseudomonas exotoxin 40 is cytotoxic toward peripheral blood malignant cells from patients with adult T-cell leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 8291-8295.
- Kreitman, R.J. (2006). Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS Journal*, 8 (3), E532–E551.
- Kreitman, R.J., Tallman, M.S., Robak, T., Coutre, S., Wilson, W.H., Stetler-Stevenson, M., Fitzgerald, D.J., Lechleider & R., Pastan, I. (2012). Phase I trial of anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox (CAT-8015 or HA22) in patients with hairy cell leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 1822–1828.

- Kreitman, R.J., Dearden, C., Zinzani, P.L. *et al.* (2018). Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leukemia*, 32, 1768–1777.
- Kunwar, S., Chang, S., Westphal, M., Vogelbaum, M., Sampson, J., Barnett, G., Shaffrey, M., Ram, Z., Piepmeyer, J., Prados, M., *et al.* (2010). Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 12, 871–881.
- Kuo, S.R., Alfano, R.W., Frankel, A.E. & Liu, J.S. (2009). Antibody internalization after cell surface antigen binding is critical for immunotoxin development. *Bioconjugate Chemistry*, 20(10), 1975–1982.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J. & Gavilanes, J.G. (1994). Overproduction and purification of biologically active native fungal alpha-sarcin in *Escherichia coli*. *Gene*, 142(1), 147–151.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (1998). The cytotoxin alpha-sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Letters*, 424, 46–48.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Martínez-Ruiz, A., Perez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (1999). Role of histidine-50, glutamic acid-96 and histidine 137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin α -Sarcin. *Proteins*, 37, 474–484.
- Lacadena, J., Álvarez-García, E., Carrera-Sangr a, N., Herrero-Gal an, E., Alegre-Cebollada, J., Garc a-Ortega, L., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G. & Martínez del Pozo, A. (2007) Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiological Reviews*, 31, 212–237.
- Laffleur, B., Duchez, S., Tarte, K., Denis-Lagache, N., P eron, S., Carrion, C., Denizot, Y. & Cogn e, M. (2015). Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression. *Cell Reports*, 10(6), 900–909.
- Laffleur, B., Debeaupuis, O., Dalloul, Z., & Cogn e, M. (2017). B Cell Intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory. *Frontiers in immunology*, 8, 1277.
- Lai, D., Tang, J., Chen, L., Fan, E.K., Scott, M.J., Li, Y., Billiar, T.R., Wilson, M.A., Fang, X., Shu, Q. & Fan, J. (2018). Group 2 innate lymphoid cells protect lung endothelial cells from pyroptosis in sepsis. *Cell Death & Disease*, 9(3), 369.
- Landolina, N., & Levi-Schaffer, F. (2016). Monoclonal antibodies: the new magic bullets for allergy: IUPHAR Review 17. *British journal of pharmacology*, 173(5), 793–803.
- Lao-Araya, M., Steveling, E., Scadding, G.W., Durham, S.R. & Shamji, M.H. (2014). Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134: 1193–5.e4.
- Larche, M., Akdis, C.A. & Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 761–771.
- Larsen, K. M., Minaya, M. K., Vaish, V., & Pe a, M. (2018). The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2676.
- Laske, D.W., Muraszko, K.M., Oldfield, E.H., DeVroom, H.L., Sung, C., Dedrick, R.L., Simon, T.R., Colandrea, J., Copeland, C. & Katz, D. (1997). Intraventricular immunotoxin therapy for leptomeningeal neoplasia. *Neurosurgery*, 41, 1039–1051.
- Leal, M., Sapra, P., Hurvitz, S.A., Senter, P., Wahl, A., Schutten, M., Shah, D.K., Haddish-Berhane, N. & Kabbarah, O. (2014). Antibody-drug conjugates: an emerging modality for the treatment of cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1321, 41–54
- Lee, H.Y., Rhee, C.K., Kang, J.Y., Byun, J.H., Choi, J.Y., Kim, S.J., Kim, Y.K., Kwon, S.S. & Lee, S.Y. (2014). Blockade of IL-33/ST2 ameliorates airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Experimental Lung Research*, 40, 66–76.
- Lee, M.W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M. & Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*, 160(1–2), 74–87.
- Lee, Y.C., Boehm, M.K., Chester, K.A., Begent, R.H. & Perkins, S.J. (2002). Reversible dimer formation and stability of the anti-tumour single-chain Fv antibody MFE-23 by neutron scattering, analytical ultracentrifugation, and NMR and FT-IR spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 320(1), 107–127.

BIBLIOGRAFÍA

- Lei, Y., Boinapally, V., Zoltowska, A., Adner, M., Hellman, L. & Nilsson, G. (2015). Vaccination against IL-33 Inhibits Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a House Dust Mite Model of Asthma. *PLoS One*, 10:e0133774.
- Li, C., Li, H., Jiang, Z., Zhang, T., Wang, Y., Li, Z., Wu, Y., Ji, S., Xiao, S., Ryffel, B., Radek, K.A., Xia, Z. & Lai, Y. (2014) Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. *PLoS Pathogens*, 10(2), e1003918.
- Li, H., Gu, C., Ren, Y., Dai, Y., Zhu, X., Xu, J., Li, Y., Qiu, Z., Zhu, J., Zhu, Y., Guan, X. & Feng, Z. (2011). The efficacy of NP11-4-derived immunotoxin scFv-artesunate in reducing hepatic fibrosis induced by *Schistosoma japonicum* in mice. *Journal of Biomedical Research*, 25, 148–154.
- Li, Q., Verschraegen, C.F., Mendoza, J. & Hassan, R. (2004). Cytotoxic Activity of the Recombinant Anti-mesothelin Immunotoxin, SS1(dsFv)PE38, Towards Tumor Cell Lines Established from Ascites of Patients with Peritoneal Mesotheliomas. *Anticancer Research*, 24, 1327-1335.
- Li, Z., Yu, T., Zhao, P. & Ma, J. (2005). Immunotoxins and cancer therapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 2(2), 106-112. Li, J., Zhou, C., Dong, B., Zhong, H., Chen, S., Li, Q. & Wang, Z.. (2016). Single domain antibody-based bispecific antibody induces potent specific anti-tumor activity. *Cancer Biology & Therapy*. 17(12), 1231-1239.
- Li, M., Liu, Z. S., Liu, X. L., Hui, Q., Lu, S. Y., Qu, L. L., ... Hu, P. (2017). Clinical targeting recombinant immunotoxins for cancer therapy. *OncoTargets and therapy*, 10, 3645–3665.
- Liao-Chan, S., Daine-Matsuoka, B., Heald, N., Wong, T., Lin, T., Cai, A. G. & Theunissen, J. W. (2015). Quantitative assessment of antibody internalization with novel monoclonal antibodies against Alexa fluorophores. *PLoS one*, 10(4), e0124708.
- Liew, F.Y., Girard, J.P. & Turnquist, H.R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nature Reviews in Immunology*, 16(11), 676–89.
- Lin, A., Huang, K.C., Hwu, L. & Tzean, S.S. (1995). Production of type II ribotoxins by *Aspergillus* species and related fungi in Taiwan. *Toxicon*, 33, 105–110.
- Lingel, A., Weiss, T.M., Niebuhr, M., Pan, B., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Bazan, J.F. & Fairbrother, W.J. (2009). Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure*, 17(10), 1398-1410.
- Liu, Y.Y., Woo, J.H. & Neville, D.M. (2003). Targeted introduction of a diphtheria toxin resistant mutation into the chromosomal EF-2 locus of *Pichia pastoris* and expression of immunotoxin in the EF-2 mutants. *Protein Expression and Purification*, 30, 262–274
- Liu, Y.Y., Woo, J.H. & Neville, D.M. (2005). Overexpression of an anti-CD3 immunotoxin increases expression and secretion of molecular chaperone BiP/Kar2p by *Pichia pastoris*. *Application of Environmental Microbiology*, 71, 5332–5340.
- Liu, G., He, J., Dou, S., Gupta, S., Rusckowski, M., & Hnatowich, D. J. (2005). Further investigations of morpholino pretargeting in mice--establishing quantitative relations in tumor. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 32(9), 1115–1123.
- Liu, X.F. FitzGerald, D.J. & Pastan, I. (2013). The insulin receptor negatively regulates the action of *Pseudomonas* toxin-based immunotoxins and native *Pseudomonas* toxin. *Cancer Research*, 73, 2281–2288.
- Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L. & Huang, T. (2009). Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386, 181-185.
- Liu, X., Hammel, M., He, Y., Tainer, J., Jeng, U., Zhang, L., Wang, S. & Wang. (2013). Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), 14918-14923.
- Lloyd, C.M. & Hessel, E.M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature Reviews in Immunology*, 10(12), 838–848.
- Lohning, M., Stroehmann, A., Coyle, A.J., Grogan, J.L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J.C, Levinson, D., Radbruch, A. & Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6930–6935.

- Lombardi, V., Beuraud, C., Neukirch, C., Moussu, H., Morizur, L., Horiot, S., *et al.* (2014). Circulating innate lymphoid cells are differentially regulated in allergic and nonallergic subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 305-308.
- López-Otín, C., Barber, D., Fernández-Luna, J.L., Soriano, F. & Méndez, E. (1984). The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *European Journal of Biochemistry*, 143: 621–634.
- De Lorenzo, C., Di Malta, C., Cali, G., Troise, F., Nitsch, L., D'Alessio, G. (2007). Intracellular route and mechanism of action of ERB-hRNase, a human anti-ErbB2 anticancer immunoagent. *FEBS letters*, 581, 296-300.
- De Lorenzo C. & D'Alessio G. (2008). From ImmunoToxins to ImmunoRNases. *Current Pharma Biotechnology*, 9, 210-214.
- Lu D., Jimenez X., Zhang H., Atkins A., Brennan L., Balderes P., Bohlen P., Witte L., and Zhu Z. (2003). Diabody: a novel tetravalent bispecific antibody molecule by design. *Journal of Immunology Methods*, 279, 219–232.
- Lüthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., Lavelle, E.C. & Martin, S.J. (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*, 31(1), 84-98.
- M Rheinnecker, C.H. (1996). Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *Journal of Immunology Baltimore Md.* 1950, 157, 2989–2997.
- Ma, H. & O'Kennedy, R. (2017). Recombinant antibody fragment production. *Methods*, 116:23-33
- MacGlashan, D. Jr. (2009). Therapeutic efficacy of omalizumab. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 114–115.
- MacGlashan, D.W. Jr, Bochner, B.S., Adelman, D.C., Jardieu, P.M., Togias, A., McKenzie-White, J., Sterbinsky, S.A., Hamilton, R.G., Lichtenstein, L.M. (1997). Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *Journal of Immunology*, 158, 1438–1445.
- Maes, T., Joos, G.F. & Brusselle, G.G. (2012). Targeting interleukin-4 in asthma: lost in translation? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47, 261-270.
- Maeyama, K., Hohman, R.J., Metzger, H. & Beaven, MA. (1986). Quantitative relationships between aggregation of IgE receptors, generation of intracellular signals, and histamine secretion in rat basophilic leukemia (2H3) cells. Enhanced responses with heavy water. *Journal of Biological Chemistry*, 261(6), 2583-2592.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Albar, J.P., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (1995). Membrane interaction of a bstructureforming synthetic peptide comprising the 116–139th sequence region of the cytotoxic protein sarcin. *Biophysics Journal*, 68, 2387–2395.
- Marconi, G., Albertini, E., Mari, A., Palazzo, P., Porceddu, A., Raggi, L., Bolis, L., Lancioni, H., Palomba, A., Lucentini, L., Lanfaloni, L., Marcucci, F., Falcinelli, M. & Panara, F. (2012) In planta expression of a mature Der p 1 allergen isolated from an Italian strain of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Transgenic Research*, 21(3), 523-535.
- Markham, A. (2018). Benralizumab: First Global Approval. *Drugs*, 78(4):505-511.
- Marshall, W.J., Lapsley, M., Day, A. & Ayling, R. (2014). *Clinical Biochemistry Metabolic and Clinical Aspects*, Third Edition, Elsevier.
- Martín-Fontecha, A., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2009). Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 188, 31-49.
- Martineau P., Jones P., and Winter G. (1998). Expression of an Antibody Fragment at High Levels in the Bacterial Cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, 280, 117–127.
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (1988). Conformational study of the antitumor protein alpha-sarcin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 953(3), 280-8.
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. & Gavilanes, J.G. (1989). Conformational study of the antitumor protein α-Sarcin. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 34, 416-422.
- Martínez-Gonzalez, I., Mathä, L., Steer, C.A., Ghaedi, M., Poon, G.F. & Takei, F. (2016). Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity*, 45(1), 198-208.

BIBLIOGRAFÍA

- Martínez-Moczygemba, M., Huston, D.P. & Lei, J.T. (2007). JAK kinases control IL-5 receptor ubiquitination, degradation, and internalization. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 1137–1148.
- Martínez-Ruiz, A., García-Ortega, L., Kao, R., Lacadena, J., Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Davies, J., Martínez del Pozo A. & Gavilanes, J.G. RNase U2 and α -Sarcin: a study of relationships. (2001). *Methods in Enzymology*, 341, 335-351.
- Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. & Martínez del Pozo, A. (1999b). Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon*, 37, 1549–1563.
- Martínez-Ruiz, A., Martínez-del-Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-Otín, C. & Gavilanes, J.G. (1998). Secretion of recombinant pro- and mature fungal α -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expression and Purification*, 12, 315–322.
- Martínez-Torrecuadrada, J.L., Cheung, L.H., López-Serra, P., Barderas, R., Cañamero, M., Ferreiro, S., Rosenblum, M.G. & Casal, J.I. (2008). Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in a xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. *Molecular Cancer Therapies*, 7(4), 862-73.
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A. & Gavilanes, J.G. (2001). Arginine 121 is a crucial residue for the specific cytotoxic activity of the ribotoxin α -sarcin. *European Journal of Biochemistry*, 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. & Gavilanes, J.G. (2003) Leucine 145 of the ribotoxin α -sarcin plays a key role for determining the specificity of the ribosome-inactivating activity of the protein. *Protein Science*, 12, 161-169.
- Mastrobattista, E., Koning, G.A., van Bloois, L., Filipe, A.C., Jiskoot, W. & Storm, G. (2002). Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), 27135-2743.
- Mathew, M. & Verma, R.S. (2009). Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Science*, 100, 1359-1365.
- Matsuoka, T., Shamji, M.H. & Durham, S.R. (2013). Allergen immunotherapy and tolerance. *Allergy International*, 62, 403-13
- Mattoo, A.R. & FitzGerald, D.J. (2013). Combination treatments with ABT-263 and an immunotoxin produce synergistic killing of ABT-263-resistant small cell lung cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 132, 978–987.
- Mayer, A., Tsiompanou, E., O'Malley, D., Boxer, G.M., Bhatia, J., Flynn, A.A., Chester, K.A., Davidson, B.R., Lewis, A.A., Winslet, M.C., Dhillon, A.P., Hilsen, A.J. & Begent, R.H. (2000). Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-CEA single-chain Fv antibody. *Clinical Cancer Research*, 6(5), 1711-9.
- Mayer, A., Francis, R.J., Sharma, S.K., Tolner, B., Springer, C.J., Martin, J., Boxer, G.M., Bell, J., Green, A.J., Hartley, J.A., Cruickshank, C., Wren, J., Chester, K.A. & Begent, R.H. (2006). A phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFCEP1 and a bis-iodo phenol mustard prodrug. *Clinical Cancer Research*, 12(21), 6509-6516.
- Mazor, R., Onda, M. & Pastan, I. (2016). Immunogenicity of therapeutic recombinant immunotoxins. *Immunological Reviews*, 270(1), 152-64.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552–554.
- Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480, 480-489.
- Meno, K., Thorsted, P.B., Ipsen, H., Kristensen, O., Larsen, J.N., Spangfort, M.D., Gajhede, M., Lund, K. (2005). The crystal structure of recombinant proDer p 1, a major house dust mite proteolytic allergen. *Journal of Immunology*, 175(6), 3835-3845.
- De Meyer, T., Muyldermans, S. & Depicker, A. (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 32, 263–270.
- Mjosberg, J.M., Trifari, S., Crellin, N.K., Peters, C.P., van Drunen, C.M., Piet, B., Fokkens, W.J., Cupedo, T. & Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nature Immunology*, 12(11), 1055–1062.

- Mjosberg, J. & Spits, H. (2016). Human innate lymphoid cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138, 1265-76.
- Mildner, M., Storka, A., Lichtenauer, M., Mlitz, V., Ghannadan, M. & Hoetzenecker, K. (2010). Primary sources and immunological prerequisites for sST2 secretion in humans. *Cardiovascular Research*, 87(4), 769–777.
- Min, B., Brown, M.A. & Legros, G. (2012). Understanding the roles of basophils: breaking dawn. *Immunology*, 135(3), 192-197.
- Moffatt, M.F., Gut, I.G., Demenais, F., Strachan, D.P., Bouzigon, E., Heath, S., von Mutius, E., Farrall, M., Lathrop, M., Cookson, W.O.C.M. (2010). A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *The New England Journal of Medicine*, 363(13), 1211-122.
- Mohapatra, A., Van Dyken, S.J., Schneider, C., Nussbaum, J.C., Liang, H.E., Locksley & R.M. (2015). Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. *Mucosal Immunology*, 9(1), 275-286.
- Molinari, G., Colombo, G., & Celenza, C. (2014). Respiratory allergies: a general overview of remedies, delivery systems, and the need to progress. *ISRN: Allergy*, 326980.
- Molofsky, A.B., Savage, A.K. & Locksley, R.M. (2015) Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity*, 42(6), 1005-1019.
- Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., Kubota, M., Turner, D., Diamond, J.M., Goldrath, A.W., Farber, D.L., Collman, R.G., Wherry, E.J. & Artis, D. (2011). Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nature Immunology*, 12(11):1045-54.
- Moritz, D.R., Rodewald, H.R., Gheyselinck, J. & Klemenz, R. (1998). The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *Journal of Immunology*, 161(9), 4866–4874.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H. & Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, 463(7280),540–544.
- Moussion, C., Ortega, N. & Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*, 3(10):e3331.
- Multani, P.S., O'Day, S., Nadler, L.M. & Grossbard, M.L. (1998) Phase II clinical trial of bolus infusion anti-B4 blocked ricin immunoconjugate in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research*, , 4, 2599–2604.
- Muyldermans, S., Cambillau, C. & Wyns, L. (2001). Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(4), 230–5.
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annual Reviews in Biochemistry*, 82, 775–797.
- Na, H.J., Hudson, S.A. & Bochner, B.S. (2012) IL-33 enhances Siglec-8 mediated apoptosis of human eosinophils. *Cytokine*, 57:169–174.
- Naclerio, R.M., Proud, D., Togias, A.G., Adkinson, N.F. Jr, Meyers, D.A., Kagey-Sobotka, A., Plaut, M., Norman, P.S. & Lichtenstein, L.M. (1985). Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *The New England Journal of Medicine*, 313, 65-70.
- Naran, K., Nundalall, T., Chetty, S., & Barth, S. (2018). Principles of Immunotherapy: Implications for Treatment Strategies in Cancer and Infectious Diseases. *Frontiers in microbiology*, 9, 3158.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., Jolin, H.E. & McKenzie, A.N.(2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464(7293), 1367-70.
- Nelson, A.L., Dhimolea, E. & Reichert J.M. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(10), 767–774.
- Neuberger, M.S., Williams, G.T., Mitchell, E.B., Jouhal, S.S., Flanagan, J.G., Rabbitts, T.H. (1985). A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature*, 314, 268–270.
- Nielsen, K. & Boston, R.S. (2001). Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 785–816.

BIBLIOGRAFÍA

- Nguyen, C.Q., Yin, H., Lee, B.H., Chiorini, J.A. & Peck, A.B. (2011). IL17: potential therapeutic target in Sjogren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer. *Laboratory Investigation*, 91, 54–62
- Nuñez-Prado, N., Compte, M., Harwood, S., Álvarez-Méndez, A., Lykkemark, S., Sanz, L. & Álvarez-Vallina, L. (2015). The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discovery Today*, 20 (5), 588–594.
- Nyborg, A.C., Zacco, A., Ettinger, R., Jack Borrok, M., Zhu, J., Martin, T., Woods, R., Kiefer, C., Bowen, M.A., Suzanne Cohen, E., Herbst, R., Wu, H. & Coats, S. (2015). Development of an antibody that neutralizes soluble IgE and eliminates IgE expressing B cells. *Cell and Molecular Immunology*, 13(3), 391-400.
- Oikawa, S., Nakazato, H. & Kosaki, G. (1987). Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142(2), 511-8.
- Oliphant, C.J., Hwang, Y.Y., Walker, J.A., Salimi, M., Wong, S.H., Brewer, J.M., Englezakis, A., Barlow, J.L., Hams, E., Scanlon, S.T., Ogg, G.S., Fallon, P.G., McKenzie, A.N. (2014). MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) Tcells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity*, 41(2), 283–295.
- Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., López de Silanes, I., Gavilanes, J.G. & Lizarbe, M.A. (2001). Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 268, 2113- 2123.
- Olombrada, M., Lázaro-Gorines, R., López-Rodríguez, J.C., Martínez-del-Pozo, A., Oñaderra, M., Maestro-López, M., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. & García-Ortega, L. (2017). Fungal Ribotoxins: A Review of Potential Biotechnological Applications. *Toxins*, 9 (2). pii: E71.
- Olombrada, M., Medina, P., Budia, F., Gavilanes, J.G., Martínez Del Pozo, A. & García-Ortega, L. (2017). Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. *Biological Chemistry*, 398(1), 135-142.
- Onda, M., Beers, H., Xiang, L., Nagat, S., Wang, Q.C. & Pastan, I. (2008). An immunotoxin with greatly reduced immunogenicity by identification and removal of B cell epitopes. *Procedures of the Natural Academy of Sciences*, 105, 11311-11316.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E., Maizel & J.V. Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5), 815-20.
- Oshikawa, K., Yanagisawa, K., Tominaga, S., Sugiyama, Y. (2002). Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, 32(10), 1520–1526.
- Olsen, E., Duvic, M., Frankel, A., Kim, Y., Martin, A., Vonderheid, E., Jegasothy, B., Wood, G., Gordon, M., Heald, P., *et al.* (2001). Pivotal phase III trial of two dose levels of denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 19, 376–388.
- Olson, B.H. & Goerner, G.L. Alpha sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. (1965). *Applied Microbiology*, 13, 314-21.
- Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Junek, A.J. & Schuurmans, D.M. (1965). α -Sarcin, a new antitumour agent. II. Fermentation and antitumour spectrum. *Applied Microbiology*, 13, 322-326.
- Ong, Y. T., Kirby, K. A., Hachiya, A., Chiang, L. A., Marchand, B., Yoshimura, K., Murakami, T., Singh, K., Matsushita & Sarafianos, S.G. (2012). Preparation of biologically active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 V3 loop. *Cellular and molecular biology*, 58(1), 71–79.
- Ordóñez, C., Screatón, R. A., Ilantzis, C., & Stanners, C. P. (2000). Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Research*, 60(13), 3419–3424.
- O'Toole, J.E., Esseltine, D., Lynch, T.J., Lambert, J.M. & Grossbard, M.L. (1998). Clinical trials with blocked ricin immunotoxins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 234, 35-56.
- Ott, A., Hodi, F.S., Kaufman, H.L., Wigginton, J.M. & Wolchok, J.D. (2017) Combination immunotherapy: a road map. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 5, 16.
- Palomares, O., Akdis, M., Martín-Fontecha, M. & Akdis, C.A. (2017). Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunology Reviews*, 278, 219-236.
- Pavlopoulou A, & Scorilas A. (2014). A comprehensive phylogenetic and structural analysis of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family. *Genome biology and evolution*, 6(6): 1314-26.

- Peng, X., Wang, J., Li, X., Lin, L., Xie, G., Cui, Z., Li, J., Wang, Y. & Li, L. (2015). Targeting mast cells and basophils with anti-FcεR1α Fab-conjugated celastrol-loaded micelles suppresses allergic inflammation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11, 2286–2299.
- Popkov, M., Jendreyko, N., McGavern, D.B., Rader, C. & Barbas, C.F. (2005). Targeting Tumor Angiogenesis with Adenovirus-Delivered Anti-Tie-2 Intrabody. *Cancer Research*, 65, 972–981
- Posey, J.A., Khazaeli, M.B., Bookman, M.A., Nowrouzi, A., Grizzle, W.E., Thornton, J., Carey, D.E., Lorenz, J.M., Sing, A.P., Siegall, C.B., LoBuglio, A.F., Saleh, M.N. (2002). A phase I trial of the single-chain immunotoxin SGN-10 (BR96 sFv-PE40) in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 8(10), 3092–3099.
- Passante, E. & Frankish, N. (2009). The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflammatory Responses*, 58(11), 737–745.
- Pastan, I., Willingham, M.C. & FitzGerald, D.J. (1986) Immunotoxins. *Cell*, 47, 641–648.
- Pastan, I. & FitzGerald, D. (1991). Recombinant toxins for cancer treatment. *Science*, 254, 1173–1177.
- Pastan, I., Hassan, R., Fitzgerald, D.J., Kreitman, R.J. (2007). Immunotoxin treatment of cancer. *Annual Review of Medicine*, 58, 221–37.
- Paul, W.E. & Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews in Immunology*, 10(4), 225–35.
- Pawankar, R., Holgate, S.T., Canonica, G.W., Lockey, R.F. & Blaiss, M.S. (2013). *White Book on Allergy*, World Allergy Organization.
- Pei, C., Barbour, M., Fairlie-Clarke, K.J., Allan, D., Mu, R. & Jiang, H.R. (2014). Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology*, 141, 9–17.
- Pelaia, G., Gallelli, L., Renda, T., Romeo, P., Busceti, M.T., Grembiale, R.D., Maselli, R., Marsico, S.A. & Vatrella, A. (2011). Update on optimal use of omalizumab in management of asthma. *Journal of Asthma and Allergy*, 4, 49–59.
- Pelaia, G., Canonica, G.W., Matucci, A., Paolini, R., Triggiani, M. & Paggiaro, P. (2017). Targeted therapy in severe asthma today: focus on immunoglobulin E. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 1979–1987.
- Peng, Z., Liu, Q., Wang, Q., Rector, E., Ma, Y., Warrington, R. (2007). Novel IgE peptide-based vaccine prevents the increase of IgE and down-regulates elevated IgE in rodents. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(7), 1040–8.
- Peng, X., Wang, J., Li, X., Lin, L., Xie, G., Cui, Z., Li, J., Wang, Y., Li, L. (2015). Targeting Mast Cells and Basophils with Anti-FcεR1α Fab-Conjugated Celastrol-Loaded Micelles Suppresses Allergic Inflammation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(12), 2286–2299.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Santoro, J., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. & Bruix, M. (2000). The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease α-Sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. *Journal of Molecular Biology*, 299, 1061–1073.
- Peumans, W.J., Hao, Q. & Van Damme, E.J. (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal*, 15, 1493–1506.
- Perez-Witzke, D., Miranda-Garcia, M.A., Suarez, N., Becerra, R., Duque, K., Porras, V., Fuenmayor, J. & Montano, R.F. (2016). CTLA4Fepsilon, a novel soluble fusion protein that binds B7 molecules and the IgE receptors, and reduces human in vitro soluble CD23 production and lymphocyte proliferation. *Immunology*, 148, 40–55.
- Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrançais, E., Dujardin, A., Ortega, N., Girard, J.P. (2012). Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *Journal of Immunology*, 188(7), 3488–3495.
- Pinto, S.M., Nirujogi, R.S., Rojas, P.L., Patil, A.H., Manda, S.S., Subbannayya, Y., Roa, J.C., Chatterjee, A., Prasad, T.S. & Pandey, A. (2015). Quantitative phosphoproteomic analysis of IL-33-mediated signalling. *Proteomics*, 15(2-3), 532–44.
- Powell, D.J., Jr., Felipe-Silva, A., Merino, M.J., Ahmadzadeh, M., Allen, T., Levy, C., White, D.E., Mavroukakis, S., Kreitman, R.J., Rosenberg, S.A. & Pastan, I. (2007). Administration of a CD25-directed

BIBLIOGRAFÍA

- immunotoxin, LMB-2, to patients with metastatic melanoma induces a selective partial reduction in regulatory T cells in vivo. *Journal of Immunology*, 179, 4919–4928.
- Powell, D.J., Jr, Attia, P., Ghetie, V., Schindler, J., Vitetta, E.S. & Rosenberg, S.A. (2008). Partial reduction of human FOXP3+ CD4 T cells in vivo after CD25-directed recombinant immunotoxin administration. *Journal of Immunotherapy*, 31, 189–198.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T. and Wagener, C. (1996). CD66a, and adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *Journal of Histochemistry*, 44, 35–41.
- Price, A. E., Liang, H. E., Sullivan, B. M., Reinhardt, R. L., Eisle, C. J., Erle, D. J., & Locksley, R. M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11489–11494.
- Prussin, C., Griffith, D.T., Boesel, K.M., Lin, H., Foster, B. & Casale, T.B. (2003). Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcεRI expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 1147–1154.
- Qu, Z., Griffiths, G.L., Wegener, W.A., Chang, C.H., Govindan, S.V., Horak, I.D., Hansen, H.J. & Goldenberg, D.M. (2005). Development of humanized antibodies as cancer therapeutics. *Methods*, 36, 84–95
- Ra, C., Furuichi, K., Rivera, J., Mullins, J.M., Isersky, C. & White KN. (1989). Internalization of IgE receptors on rat basophilic leukemic cells by phorbol ester. Comparison with endocytosis induced by receptor aggregation. *European Journal of Immunology*, 19(10), 1771–1777.
- Rafi, A., Do, L.T., Katz, R., Sheinkopf, L.E., Simons, C.W. & Klaustermeyer, W.A. (2010). Effects of omalizumab in patients with food allergy. *Allergy and Asthma Proceedings*, 31, 76–83.
- Rahbarizadeh, F., Rasaei, M.J., Forouzandeh, M. & Allameh, A.A. (2006). Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular Immunology*, 43(5), 426–35.
- Ramaprakash, H., Shibata, T., Duffy, K.E., Ismailoglu, U.B., Bredernitz, R.M., Moreira, A.P., Coelho, A.L., Das, A.M., Fursov, N., Chupp, G.L. & Hogaboam, C.M. (2011). Targeting ST2L potentiates CpG-mediated therapeutic effects in a chronic fungal asthma model. *American Journal of Pathology*, 179, 104–115.
- Rauber, S., Luber, M., Weber, S., Maul, L., Soare, A., Wohlfahrt, T., Lin, N.Y., Dietel, K., Bozec, A., Herrmann, M., Kaplan, M.H., Weigmann, B., Zaiss, M.M., Fearon, U., Veale, D., Cañete, J.D., Distler, O., Rivelles, F., Pitzalis, C., Neurath, M.F., McKenzie, A.N.J., Wirtz, S., Schett, G., Distler, J.H.W. & Ramming, A. (2017). Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. *Nature Medicine*, 23(8), 938–944.
- Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B. & Dewitz, M.C. (2005). Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnology*, 23, 1073–1078.
- Renert-Yuval, Y. & Guttman-Yassky, E. (2018). Monoclonal antibodies for the treatment of atopic dermatitis. *Current Opinions in Allergy and Clinical Immunology*, 18(4):356–364.
- Rios, X., Compte, M., Gómez-Vallejo, V., Cossío, U., Baz, Z., Morcillo, M.Á., Ramos-Cabrer, P., Alvarez-Vallina, L. & Llop, J. (2019). Immuno-PET Imaging and Pharmacokinetics of an Anti-CEA scFv-based Trimerbody and Its Monomeric Counterpart in Human Gastric Carcinoma-Bearing Mice. *Molecular Pharmacology*, 16(3), 1025–1035.
- Ritter, G., Cohen, L.S., Williams, C. Jr, Richards, E.C., Old, L.J. & 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 Research*, 61, 6851–6859.
- Rodríguez, R., López-Otín, Barber, D., Fernández-Luna, J.L., González, G. y Méndez, E. (1982). Amino acid sequence homologies in α-sarcin, restrictocin and mitogillin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108, 315–321.
- Roga, V., Hedeman, L.P. & Olson, B.H. (1971). Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms. *Cancer Chemotherapy Reports*, 55(2), 101–113.
- Ross, W.C., Thorpe, P.E., Cumber, A.J., Edwards, D.C., Hinson, C.A. & Davies, A.J. (1980). Increased toxicity of diphtheria toxin for human lymphoblastoid cells following covalent linkage to anti-(human lymphocyte) globulin or its F(ab)2 fragment. *European Journal of Biochemistry*, 104(2), 381–90.

- Ruiz-de-la-Herrán, J., Tomé-Amat, J., Lázaro-Gorines, R., Gavilanes, J.G. & Lacadena, J. (2019). Inclusion of a Furin Cleavage Site Enhances Antitumor Efficacy against Colorectal Cancer Cells of Ribotoxin α -Sarcin or RNase T1-Based Immunotoxins. *Toxins* (Basel), 11(10).
- Russell, R.B. & Barton, G.J. (1992). Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins*, 14, 309–323.
- Sacco, G., Drickamer, K. & Wool, I.G. (1983). The primary structure of the cytotoxin α -sarcin. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 5811-5818.
- Saeland, E., Belo, A. I., Mongera, S., van Die, I., Meijer, G. A., & van Kooyk, Y. (2012). Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. *International Journal of Cancer*, 131(1), 117–128.
- Sánchez-Arévalo Lobo, V.J., Cuesta, A.M., Sanz, L., Compte, M., García, P., Prieto, J., Blanco, F.J., and Alvarez-Vallina, L. (2006). Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events. *International Journal of Cancer*, 119, 455–462.
- Sánchez-Martín, D., Sanz, L. & Álvarez-Vallina, L. (2011). Engineering human cells for in vivo secretion of antibody and non-antibody therapeutic proteins. *Current Opinions in Biotechnology*, 22(6), 924-30.
- Sancho-Serra, M.del C., Simarro, M. & Castells M. (2011). Rapid IgE desensitization is antigen specific and impairs early and late mast cell responses targeting Fc ϵ RI internalization. *European Journal of Immunology*, 41(4), 1004-13.
- Sanz, L., Blanco, B. & Alvarez-Vallina, L. (2004). Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends in Immunology*, 25, 85–91.
- Savage, P., Rowlinson-Busza, G., Verhoeyen, M., Spooner, R.A., So, A., Windust, J., Davis, P.J. & Epenetos, A.A. (1993). Construction, characterisation and kinetics of a single chain antibody recognising the tumour associated antigen placental alkaline phosphatase. *British Journal of Cancer*, 68, 738–742.
- Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J.P., Eberl, G. (2011). ROR γ t⁺ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature Immunology*, 12(4):320-6.
- Schatz, M. & Rosenwasser, L. (2004). The allergic asthma phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(6), 645-8.
- Sheinkopf, L.E., Rafi, A.W., Do, L.T., Katz, R.M. & Klaustermeyer, W.B. (2008). Efficacy of omalizumab in the treatment of atopic dermatitis: a pilot study. *Allergy and Asthma Proceedings*, 29, 530–537.
- Schmidt, M.M., Thurber, G.M. & Wittrup, K.D. (2008). Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 57(12), 1879-90.
- Schmitt, E., Klein, M. & Bopp, T. (2014). Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends in Immunology*, 35(2), 61–8.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D.M., Bazan, J.F. & Kastelein, R.A. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5), 479–90.
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Frohlich, A., Adelman, K., Wohlfert, E.A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A.N., Harrison, O.J., Owens, B.M.J., Löhning, M., Belkaid, Y., Fallon, P.G., Powrie, F. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*, 513(7519), 564–568.
- Schindler, D. G., & Davies, J. E. (1977). Specific cleavage of ribosomal RNA caused by alpha sarcin. *Nucleic Acids Research*, 4, 1097-1110.
- Schindler, J., Gajavelli, S., Ravandi, F., Shen, Y., Parekh, S., Braunchweig, I., Barta, S., Ghetie, V., Vitetta, E., Verma, A. (2011). A phase I study of a combination of anti-CD19 and anti-CD22 immunotoxins (Combotox) in adult patients with refractory B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 154, 471–476.
- Schmohl, J. U., Todhunter, D., Oh, S., & Vallera, D. A. (2015). Mutagenic Deimmunization of Diphtheria Toxin for Use in Biologic Drug Development. *Toxins*, 7(10), 4067–4082.

BIBLIOGRAFÍA

- Schulman, E.S. (2001). Development of a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(8 Pt 2), S6-11.
- Schultz, A., & Martin, A. C. (2013). Outpatient management of asthma in children. *Clinical medicine insights. Pediatrics*, 7, 13–24.
- Scott, A. M., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer immunity*, 12, 14.
- Scott, I. C., Houslay, K. F. & Cohen, E. S. (2016). Prospects to translate the biology of IL-33 and ST2 during organ transplantation into therapeutics to treat graft-versushost disease. *Annals in Translational Medicine*, 4, 500.
- Scott, A.M., Lee, F.T., Jones, R., Hopkins, W., MacGregor, D., Cebon, J.S., Hannah, A., Chong, G., U.P., Papenfuss, A., Rigopoulos, A., Sturrock, S., Murphy, R., Wirth, V., Murone, C., Smyth, F.E., Knight, S., Welt, S., Ritter, G., Richards, E., Nice, E.C., Burgess, A.W. & Old, L.J. (2005). A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. *Clinical Cancer Research*, 11, 4810-4817.
- Shahied, L.S., Tang, Y., Alpaugh, R.K., Somer, R., Greenspon, D., and Weiner, L.M. (2004). Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 53907–53914.
- Shamji, M.H., Layhadi, J.A., Scadding, G.W., Cheung, D.K., Calderon, M.A., Turka, L.A., Phippard, D. & Durham, S.R.. (2015). Basophil expression of diamine oxidase: a novel biomarker of allergen immunotherapy response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135, 913-21.e9.
- Shamji, M.H. & Durham, S. R. (2017). Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140 (6), 1485–1498
- Shan, L., Liu, Y., Wang, P. (2013). Recombinant Immunotoxin Therapy of Solid Tumors: Challenges and Strategies. *Journal of Basic and Clinical Medicine*, 2(2), 1-6.
- Shapira, A., & Benhar, I. (2010). Toxin-based therapeutic approaches. *Toxins*, 2(11), 2519–2583.
- Sharma, M., Hegde, P., Amanianda, V., Beau, R., Maddur, M.S., Sénéchal, H., Poncet, P., Latgé, J.P., Kaveri, S.V. & Bayry, J. (2013). Circulating human basophils lack the features of professional antigen presenting cells. *Scientific Reports*, 3, 1188.
- Sharma, S.K., Pedley, R.B., Bhatia, J., Boxer, G.M., El-Emir, E., Qureshi, U., Tolner, B., Lowe, H., Michael, N.P., Minton, N., Begent, R.H. & Chester, K.A. (2005). Sustained tumor regression of human colorectal cancer xenografts using a multifunctional mannosylated fusion protein in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Clinical Cancer Research*, 11(2 Pt 1), 814-25.
- Sheen, A.J., Sherlock, D.J., Irlam, J., Hawkins, R.E. & Gilham, D.E. (2003). T lymphocytes isolated from patients with advanced colorectal cancer are suitable for gene immunotherapy approaches. *British Journal of Cancer*, 88(7), 1119-27.
- Shin, H.W., Kim, D.K., Park, M.H., Eun, K.M., Lee, M., So, D., Kong, I.G., Mo, J.H., Yang, M.S., Jin, H.R., Park, J.W. & Kim, D.W. (2015). IL-25 as a novel therapeutic target in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(6), 1476-85.e7.
- Scheurer, S., Toda, M. & Vieths, S. (2015). What makes an allergen? *Clinical and Experimental Allergy*, 45(7):1150-61.
- Schrewe, H., Thompson, J., Bona, M., Hefta, L.J., Maruya, A., Hassauer, M., Shively, J.E., von Kleist, S. & Zimmermann, W. (1990). Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and Cellular Biology*, 10(6), 2738-2748.
- Schmidt, M.M., & Wittrup, K.D. (2009). A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Molecular Cancer Therapy*, 8, 2861–2871.
- Schmidt, M.M., Thurber, G.M. & Wittrup, K.D. (2008) Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 57(12), 1879-1890.
- Sedhom, M.A., Pichery, M., Murdoch, J.R., Foligne, B., Ortega, N., Normand, S., Mertz, K., Sanmugalingam, D., Brault, L., Grandjean, T., Lefrancais, E., Fallon, P.G., Quesniaux, V., Peyrin-Biroulet, L., Cathomas, G.,

- Junt, T., Chamaillard, M., Girard, J.P. & Ryffel, B. (2013). Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut*, 62, 1714-1723.
- Sehra, S., Yao, W., Nguyen, E.T., Glosson-Byers, N.L., Akhtar, N., Zhou, B. & Kaplan, M.H. (2015). TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136, 433-40.e1.
- Shi, X., Khade, P.K., Sanbonmatsu, K.Y. & Joseph, S. (2012). Functional role of the sarcin-ricin loop of the 23S rRNA in the elongation cycle of protein synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 419(3-4), 125-138.
- Siemer, A., Masip, M., Carreras, N., García-Ortega, L., Oñaderra, M., Bruix, M., Del Pozo, A.M. & Gavilanes, J.G. (2004). Conserved asparagine residue 54 of alpha-sarcin plays a role in protein stability and enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry*, 385(12), 1165-70.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-1317.
- Smith, S.G., Chen, R., Kjarsgaard, M., Huang, C., Oliveria, J.P., O'Byrne, P.M., Gauvreau, G.M., Boulet, L.P., Lemiere, C., Martin, J., Nair, P. & Sehmi, R. (2016). Increased numbers of activated group 2 innate lymphoid cells in the airways of patients with severe asthma and persistent airway eosinophilia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(1), 75-86.e8.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., Kaufman, D., Armitage, R. & Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International Immunology*, 20(8), 1019-30.
- Singh, S., Kumar, N.K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P. & Chugh V.K. (2018). Monoclonal Antibodies: A Review. *Current Clinical Pharmacology*, 13(2):85-99.
- Spieß, K., Jakobsen, M.H., Kledal, T.N. & Rosenkilde, M.M. (2016). The future of antiviral immunotoxins. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(6), 911-925.
- Sokolova, E., Guryev, E., Yudinsev, A., Vodeneev, V., Deyev, S., & Balalaeva, I. (2017). HER2-specific recombinant immunotoxin 4D5scFv-PE40 passes through retrograde trafficking route and forces cells to enter apoptosis. *Oncotarget*, 8(13), 22048-22058.
- Song, H. N., Jang, J. H., Kim, Y. W., Kim, D. H., Park, S. G., Lee, M. K. & Woo, E. J. (2014). Refolded scFv antibody fragment against myoglobin shows rapid reaction kinetics. *International journal of molecular sciences*, 15(12), 23658-23671.
- Soyer O.U., Akdis, M., Ring, J., Behrendt, H., Cramer, R., Lauener, R. & Akdis, C.A. (2013). Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy*, 68(2), 161-70.
- Solèr, M., Matz, J., Townley, R., Buhl, R., O'Brien, J., Fox, H., Thirlwell, J., Gupta, N. & Della Cioppa, G. (2001.) The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *European Respiratory Journal*, 18(2), 254-61.
- Spits, H. & Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annual Reviews in Immunology*, 30, 647-75.
- Spooner, C.J., Lesch, J., Yan, D., Khan, A.A., Abbas, A., Ramirez-Carrozzi, V., Zhou, M., Soriano, R., Eastham-Anderson, J., Diehl, L., Lee, W.P., Modrusan, Z., Pappu, R., Xu, M., DeVoss, J. & Singh, H. (2013). Specification of type 2 innate lymphocytes by the transcriptional determinant Gfi1. *Nature Immunology*, 14(12), 1229-36.
- Stadhouders, R., Li, B.W.S., de Bruijn, M.J.W., Gomez, A., Rao, T.N., Fehling, H.J., van IJcken, W.F.J., Lim, A.I., Di Santo, J.P., Graf, T. & Hendriks, R.W. (2018). Epigenome analysis links gene regulatory elements in group 2 innate lymphocytes to asthma susceptibility. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(6), 1793-1807.
- Starkey, M.R., McKenzie, A.N., Belz, G.T. & Hansbro, P.M. (2019). Pulmonary group 2 innate lymphoid cells: surprises and challenges. *Mucosal Immunology*, 12(2), 299-311.
- Stein, R., Juweid, M., Mattes, M.J. & Goldenberg, D.M. (1999). Carcinoembryonic antigen as a target for radioimmunotherapy of human medullary thyroid carcinoma: antibody processing, targeting, and experimental therapy with ¹³¹I and ⁹⁰Y labeled MAbs. *Cancer Biotherapy and Radiopharmacology*, 14(1), 37-47.

BIBLIOGRAFÍA

- Stirpe, F., Olsnes, S. & Pihl, A. (1980). Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 6947–6953.
- Stone, K. D., Prussin, C. & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S73–S80.
- Stong, R.C., Uckun, F., Youle, R.J., Kersey, J.H. & Vallera, D.A. (1985). Use of multiple T cell-directed intact ricin immunotoxins for autologous bone marrow transplantation. *Blood*, 66, 627–635.
- Strom, T.B., Anderson, P.L., Rubin-Kelley, V.E., Williams, D.P., Kiyokawa, T., Murphy, J.R. (1990). Immunotoxins and cytokine toxin fusion proteins. *Seminars in Immunology*, 2(6):467-79.
- Strunk, R.C. & Bloomberg, G.R. (2006). Omalizumab for asthma. *New England Journal of Medicine*, 354, 2689-2695.
- Suzukawa, M., Iikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K. & Yamaguchi, M. (2008). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *Journal of Immunology*, 181(9), 5981–5989.
- Suzuki, M., Kato, C., & Kato, A. (2015). Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. *Journal of toxicologic pathology*, 28(3), 133–139.
- Takai, T., Mineki, R., Nakazawa, T., Takaoka, M., Yasueda, H., Murayama, K., Okumura, K. & Ogawa, H. (2002). Maturation of the activities of recombinant mite allergens Der p 1 and Der f 1, and its implication in the blockade of proteolytic activity. *FEBS Letters*, 531, 265-272.
- Takami, N., Misumi, Y., Kuroki, M., Matsuoka, Y. & Ikehara, Y. (1988). Evidence for carboxyl-terminal processing and glycolipid-anchoring of human carcinoembryonic antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 263(25), 12716-12720.
- Takatori, H., Makita, S., Ito, T., Matsuki, A., & Nakajima, H. (2018). Regulatory Mechanisms of IL-33-ST2-Mediated Allergic Inflammation. *Frontiers in immunology*, 9, 2004.
- Takatsu, K. & Nakajima, H. (2008). IL-5 and eosinophilia. *Current Opinions in Immunology*, 20(3), 288–294.
- Theoharides, T.C., Petra, A.I., Taracanova, A., Panagiotidou, S. & Conti, P. (2015). Targeting IL-33 in autoimmunity and inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354, 24-31.
- Thirunavukarasu, P., Sukumar, S., Sathaiyah, M., Mahan, M., Pragatheeshwar, K. D., Pingpank, J. F., Zeh, H., 3rd, Bartels, C. J., Lee, K. K., & Bartlett, D. L. (2011). C-stage in colon cancer: Implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(8), 689–697.
- Tiernan, J. P., Perry, S. L., Verghese, E. T., West, N. P., Yeluri, S., Jayne, D. G., & Hughes, T. A. (2013). Carcinoembryonic antigen is the preferred biomarker for in vivo colorectal cancer targeting. *British Journal of Cancer*, 108(3), 662–667.
- Thomas, P., Toth, C.A., Saini, K.S., Jessup, J.M. & Steele, G. (1990). The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1032, 177–189.
- Thompson, C., Davies, R. & Choy, E. (2016). Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis. *Cytokine*, 86:92-99.
- Thompson, J.A., Grunert, F., & Zimmermann, W. (1991). Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 5, 344–366.
- Thomas, P., Forse, R. A., & Bajenova, O. (2011). Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNPM are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clinical & Experimental Metastasis*, 28(8), 923–932.
- Thompson, J.; Hu, H.; Scharff, J.; Neville, D.M., Jr. (1995). An anti-CD3 single-chain immunotoxin with a truncated diphtheria toxin avoids inhibition by pre-existing antibodies in human blood. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 28037–28041.
- Thompson, J. A., Eades-Perner, A. M., Ditter, M., Muller, W. J., & Zimmermann, W. (1997). Expression of transgenic carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor-prone mice: An animal model for CEA-directed tumor immunotherapy. *International Journal of Cancer*, 72(1), 197–202.

- Thorpe, P.E., Ross, W.C., Cumber, A.J., Hinson, C.A., Edwards, D.C. & Davies, A.J. (1978). Toxicity of diphtheria toxin for lymphoblastoid cells is increased by conjugation to antilymphocytic globulin. *Nature*, 271, 752–755.
- Thrush, G.R., Lark, L.R., Clinchy, B.C. & Vitetta, E.S. (1996). Immunotoxins: An Update. *Annual Reviews in Immunology*, 14, 49-71.
- Togias, A. (2003). Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 1171–1184.
- Tomé-Amat, J., Olombrada, M., Ruiz-de-la-Herrán, J., Pérez-Gómez, E., Andradas, C., Sánchez, C., Martínez, L., Martínez-Del-Pozo, Á., Gavilanes, J. G., Lacadena, J. (2015). Efficient in vivo antitumor effect of an immunotoxin based on ribotoxin α -sarcin in nude mice bearing human colorectal cancer xenografts. *SpringerPlus*, 4, 168.
- Tomé-Amat, J., Herrero-Galán, E., Oñaderra, M., Martínez-Del-Pozo, Á., Gavilanes, J.G. & Lacadena, J. (2015). Preparation of an engineered safer immunotoxin against colon carcinoma based on the ribotoxin hirsutellin A. *FEBS Journal*, 282(11), 2131-41.
- Tomé-Amat, J., Ruiz-de-la-Herrán, J., Martínez-del-Pozo, Á., Gavilanes, J.G. & Lacadena, J. (2015). α -sarcin and RNase T1 based immunoconjugates: the role of intracellular trafficking in cytotoxic efficiency. *FEBS Journal*, 282(4), 673-84.
- Tortorella, L.L., Pipalia, N.H., Mukherjee, S., Pastan, I., Fitzgerald, D. & Maxfield, F.R. (2012). Efficiency of immunotoxin cytotoxicity is modulated by the intracellular itinerary. *PLoS One*, 7(10), e47320.
- Tsaltas, G., Ford, C.H. & Gallant, M. (1992). Demonstration of monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody internalization by electron microscopy, western blotting and radioimmunoassay. *Anticancer Research*, 12(6B), 2133-2142.
- Tsetsos, N., Goudakos, J.K., Daskalakis, D., Konstantinidis, I. & Markou, K. (2018). Monoclonal antibodies for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: a systematic review. *Rhinology*, 56(1), 11-21.
- Tsumoto, K., Isozaki, Y., Yagami, H. & Tomita, M. (2019) Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy*, 11(2):119-127.
- Tu, X., Nie, S., Liao, Y., Zhang, H., Fan, Q., Xu, C., Bai, Y., Wang, F., Ren, X., Tang, T., Xia, N., Li, S., Huang, Y., Liu, J., Yang, Q., Zhao, Y., Lv, Q., Li, Q., Li, Y., Xia, Y., Qian, J., Li, B., Wu, G., Wu, Y., Yang, Y., Wang, Q.K. & Cheng, X. (2013). The IL-33-ST2L pathway is associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *American Journal of Human Genetics*, 93(4), 652-60.
- Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, A., Lizarbe, M.A. & Gavilanes, J.G. (1993). Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*, on tumor cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Molecular and Cellular Biochemical*, 122, 39-47.
- Turner, H. & Kinet, J.P. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature*, 402, B24–30.
- Turriziani, M., Fantini, M., Benvenuto, M., Izzi, V., Masuelli, L., Sacchetti, P., Modesti, A. & Bei, R. (2012). Carcinoembryonic antigen (CEA)-based cancer vaccines: recent patents and antitumor effects from experimental models to clinical trials. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 7(3), 265-296.
- Turturro, F. (2007). Denileukin diftitox: a biotherapeutic paradigm shift in the treatment of lymphoid-derived disorders. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 7(1), 11-17.
- Uckun, F.M., Kersey, J.H., Vallera, D.A., Ledbetter, J.A., Weisdorf, D., Myers, D.E., Haake, R. & Ramsay, N.K. (1990). Autologous bone marrow transplantation in high-risk remission T-lineage acute lymphoblastic leukemia using immunotoxins plus 4-hydroperoxycyclophosphamide for marrow purging. *Blood*, 76, 1723–1733.
- Valenta, R., Karaulov, A., Niederberger, V., Zhernov, Y., Elisyutina, O., Campana, R., Focke-Tejkl, M., Curin, M., Namazova-Baranova, L., Wang, J.Y., Pawankar, R., Khaitov, M. (2018). Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *Journal of Allergy and Clinical Immunology Practice*, 6(6), 1845-1855.e2.
- Vallera, D.A., Burns, L.J., Frankel, A.E., Sicheneder, A.R., Gunther, R., Gajl-Peczalska, K., Pennell, C.A. & Kersey, J.H. (1996). Laboratory preparation of a deglycosylated ricin toxin A chain containing immunotoxin directed against a CD7 T lineage differentiation antigen for phase I human clinical studies involving T cell malignancies. *Journal of Immunology Methods*, 197, 69–83.

BIBLIOGRAFÍA

- Vannella, K.M., Ramalingam, T.R., Borthwick, L.A., Barron, L., Hart, K.M., Thompson, R.W., Kindrachuk, K.N., Cheever, A.W., White, S., Budelsky, A.L., Comeau, M.R., Smith, D.E. &
- Varga, J., & Samson, R. A. (2008). Ribotoxin genes in isolates of *Aspergillus* section *Clavati*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(3), 481–485.
- Vey, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Klenk, H.D. & Garten, W. (1994). Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *Journal of Cellular Biology*, 127(6 Pt 2), 1829-1842.
- Vitetta, E.S., Krolick, K.A., Miyama-Inaba, M., Cushley, W. & Uhr, J.W. (1983). Immunotoxins: A new approach to cancer therapy. *Science*, 219, 644–650.
- Vitetta, E.S. & Uhr, J.W. (1985). Immunotoxins: Redirecting nature's poisons. *Cell*, 41, 653–654.
- Vogel, L., Lüttkopf, D., Hatahet, L., Hausteiner, D., Vieths, S. (2005). Development of a functional in vitro assay as a novel tool for the standardization of allergen extracts in the human system. *Allergy*, 60(8), 1021-1028.
- Walsh, M.J., Dodd, J.E. & Hautbergue, G.M. (2013). Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools. *Virulence*, 4, 774–784.
- Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Tovey, E.R., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Stewart, G.A., Taylor, G.W., Garrod, D.R., Cannell, M.B. & Robinson, C. (1991). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *Journal of Clinical Investigation*, 104(1), 123-33.
- Wan, L., Zeng, L., Chen, L., Huang, Q., Li, S., Lu, Y., Li, Y., Cheng, J. & Lu, X. (2006). Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin. *Protein Expression and Purification*, 48(2), 307–313.
- Wargalla, U.C. & Reisfeld, R.A. (1989). Rate of Internalization of an Immunotoxin Correlates with Cytotoxic Activity against Human Tumor Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(13), 5146-5150.
- Waern, I., Lundquist, A., Pejler, G. & Wernersson, S. (2013). Mast cell chymase modulates IL-33 levels and controls allergic sensitization in dust-mite induced airway inflammation. *Mucosal Immunology*, 6(5), 911–920.
- Wang, Z., Zheng, Q., Zhang, H., Bronson, R.T., Madsen, J.C., Sachs, D.H., Huang, C.A. & Wang, Z. (2017). Ontak-like human IL-2 fusion toxin. *Journal of Immunological Methods*, 448, 51-58.
- Wawrzynczak, E.J., Cumber, A.J., Henry, R.V., May, J., Newell, D.R., Parnell, G.D., Worrell, N.R. & Forrester, J.A. (1990). Pharmacokinetics in the rat of a panel of immunotoxins made with abrin A chain, ricin A chain, gelonin, and momordin. *Cancer Research*, 50(23), 7519-7526.
- Wawrzynczak, E.J., Henry, R.V., Cumber, A.J., Parnell, G.D., Derbyshire, E.J. & Ulbrich, N. (1991). 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*. *European Journal Biochemistry*, 196(1), 203-209.
- Weber, F., Asher, A., Bucholz, R., Berger, M., Prados, M., Chang, S., Bruce, J., Hall, W., Rainov, N.G., Westphal, M., Warnick, R.E., Rand, R.W., Floeth, F., Rommel, F., Pan, H., Hingorani, V.N. & Puri, R.K. (2003). Safety, tolerability, and tumor response of IL4- *Pseudomonas* exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Neurooncology*, 64: 125–137.
- Weetall, M., Digan, M.E., Hugo, R., Mathew, S., Hopf, C., Tart-Risher, N., Zhang, J., Shi, V., Fu, F., Hammond-McKibben, D., West, S., Brack, R., Brinkmann, V., Bergman, R., Neville, D. Jr & Lake, P. (2002). T-cell depletion and graft survival induced by anti-human CD3 immunotoxins in human CD3 epsilon transgenic mice. *Transplantation*, 73, 1658–1666.
- Wei, H., Xiang, L., Wayne, A.S., Chertov, O., FitzGerald, D.J., Bera, T.K. & Pastan, I. (2012). Immunotoxin resistance via reversible methylation of the DPH4 promoter is a unique survival strategy. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6898–6903.
- Weinberg, E.O., Shimpo, M., De Keulenaer, G.W., MacGillivray, C., Tominaga, S., Solomon, S.D., Rouleau, J.L. & Lee, R.T. (2002). Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*, 106(23), 2961–2966.
- Weiner, L. M., Dhodapkar, M. V., & Ferrone, S. (2009). Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet* (London, England), 373(9668), 1033–1040.

- Wegener, W.A., Petrelli, N., Serafini, A. & Goldenberg, D.M. (2000). Safety and efficacy of arcitumomab imaging in colorectal cancer after repeated administration. *Journal of Nuclear Medicine*, 41(6), 1016-1020.
- Weldon, J.E. & Pastan, I. (2011). A guide to taming a toxin—recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS Journal*, 278, 4683–4700.
- Wenzel, S., Castro, M., Corren, J., Maspero, J., Wang, L., Zhang, B., Pirozzi, G., Sutherland, E.R., Evans, R.R., Joish, V.N., Eckert, L., Graham, N.M., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., Louis-Tisserand, M. & Teper, A. (2016). Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting β_2 agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. *Lancet*, 388(10039), 31-44.
- Wershil, B.K., Wang, Z.S., Gordon, J.R. & Galli, S.J. (1991). Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor- α . *Journal of Clinical Investigations*, 87, 446–453.
- Wilhelm, C., Kharabi Masouleh, S., & Kazakov, A. (2017). Metabolic Regulation of Innate Lymphoid Cell-Mediated Tissue Protection-Linking the Nutritional State to Barrier Immunity. *Frontiers in Immunology*, 8, 1742.
- Wills-Karp, M. (2004). Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunological Reviews*, 202, 175–190.
- Wirth, J., Martínez del Pozo, Á., Mancheño, J.M., MartínezRuiz, A., Lacadena, J., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G. (1997). Sequence determination and molecular characterization of gigantín, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 343, 188–193.
- Winter, G. & Harris, W.J. (1993). Humanized antibodies. *Immunology Today*, 14, 243–246.
- Woodfolk, J.A. (2007). T-cell responses to allergens. *Journal of Allergy Clinical and Immunological*, 119(2), 280-294.
- Wool, I.G. (1997). Structure and mechanism of action of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin. En Ribonucleases: structures and functions. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. *Academic Press*, 131-162.
- Wraith D. C. (2017). The Future of Immunotherapy: A 20-Year Perspective. *Frontiers in immunology*, 8, 1668.
- Wynn, T.A. (2016). Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Science Translational Medicine*, 8(337), 337ra65.
- Xi, H., Katschke, K.J., Jr., Li, Y., Truong, T., Lee, W.P., Diehl, L., Rangell, L., Tao, J., Arceo, R., Eastham-Anderson, J., Hackney, J.A., Iglesias, A., Cote-Sierra, J., Elstrott, J., Weimer, RM. & van Lookeren Campagne, M. (2016). IL-33 amplifies an innate immune response in the degenerating retina. *Journal of Experimental Medicine*, 213, 189-207.
- Xu, L.L., Warren, M.K., Rose, W.L., Gong, W. & Wang, J.M. (1996). Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *Journal of Leukocytes Biology*, 60(3), 365-71.
- Yagi, R., Zhong, C., Northrup, D.L., Yu, F., Bouladoux, N., Spencer, S., Hu, G., Barron, L., Sharma, S., Nakayama, T., Belkaid, Y., Zhao, K. & Zhu, J. (2014). The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7 α -expressing innate lymphoid cells. *Immunity*, 40(3), 378–388.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. & Okada, Y. (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 15, 245–250.
- Yazdi, P.T., Wenning, L.A. & Murphy, R.M. (1995). Influence of cellular trafficking on protein synthesis inhibition of immunotoxins directed against the transferrin receptor. *Cancer Research*, 55, 3763–3771.
- Yoshida, H. (2001). The ribonuclease T1 family. *Methods in Enzymology*, 341, 28-41.
- Zhang, C., Wang, Z., Yang, Z., Wang, M., Li, S., Li, Y., Zhang, R., Xiong, Z., Wei, Z., Shen, J., Luo, Y., Zhang, Q., Liu, L., Qin, H., Liu, W., Wu, F., Chen, W., Pan, F., Zhang, X., Bie, P., Liang, H., Pecher, G. & Qian, C. (2017). Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA+ Metastatic Colorectal Cancers. *Molecular Therapy*, 25(5), 1248-1258.
- Zhang, J., Saint-Remy, J.M., Garrod, D.R. & Robinson, C. (2009). Comparative enzymology of native and recombinant house dust mite allergen Der p 1. *Allergy*, 64(3), 469-477.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, K., Liu, J., Truong, T., Zukin, E., Chen, W. & Saxon, A. (2017). Blocking Allergic Reaction through Targeting Surface-Bound IgE with Low-Affinity Anti-IgE Antibodies. *Journal of Immunology*, 198(10), 3823-3834.
- Zhao, J., Wei, J., Mialki, R.K., Mallampalli, D.F., Chen, B.B., Coon, T., Zou, C., Mallampalli, R.K. & Zhao, Y. (2012). F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation. *Nature Immunology*, 13(7), 651–658.
- Zhang, J., Tanha, J., Hirama, T., Khieu, N.H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J.R., & MacKenzie, C.R. (2004). Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *Journal of Molecular Biology*, 335, 49–56.
- Zhang, Y., Hansen, J.K., Xiang, L., Kawa, S., Onda, M., Ho, M., Hassan, R. & Pastan, I. (2010). A flow cytometry method to quantitate internalized immunotoxins shows that taxol synergistically increases cellular immunotoxins uptake. *Cancer Research*, 70, 1082–1089.
- Zhou, J., Fan, X., Chen, N., Zhou, F., Dong, J., Nie, Y., & Fan, D. (2015). Identification of CEACAM5 as a Biomarker for Prewarning and Prognosis in Gastric Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(12), 922-930.
- Zhu, D., Kepley, C.L., Zhang, M., Zhang, K. & Saxon, A. (2002). A novel human immunoglobulin Fcγ-Fcε bifunctional fusion protein inhibits FcεRI-mediated degranulation. *Nature Medicine*, 8, 518–521.
- Zimmer, A., Bouley, J., Le Mignon, M., Pliquet, E., Horiot, S., Turfkruyer, M., Baron-Bodo, V., Horak, F., Nony, E., Louise, A., Moussu, H., Mascarell, L. & Moingeon, P. (2012). A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129, 1020-1030.
- Zuidscherwoude, M., & van Spriel, A. B. (2012). The origin of IgE memory and plasma cells. *Cellular and Molecular immunology*, 9(5), 373–374.