

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevos diseños nanobiotecnológicos frente a cáncer basados  
en inmunotoxinas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Javier Narbona Corral**

**Director**

**Javier Lacadena García-Gallo**

**Madrid**

**© Javier Narbona Corral, 2021**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**TESIS DOCTORAL**

**NUEVOS DISEÑOS NANBIOTECNOLÓGICOS FRENTE A  
CÁNCER BASADOS EN INMUNOTOXINAS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

JAVIER NARBONA CORRAL

DIRECTOR

JAVIER LACADENA GARCÍA-GALLO





Ahora representate el estado de la naturaleza humana,  
con relación a la sabiduría y a la ignorancia, según el cuadro que te voy a trazar:  
imagina un antro subterráneo, y en esta caverna hombres encadenados desde la infancia...  
...Mira ahora lo que debe ocurrir, si se les libra de sus cadenas y se les cura de su error.

**Platón**, La República.



## Agradecimientos.

Desde la primera vez que vi una tesis doctoral, me llamó la atención el apartado de agradecimientos. Además de la ingente cantidad de trabajo que imaginaba que supondría la realización y escritura de la tesis y que vi siempre como algo extremadamente lejano, el apartado de agradecimientos siempre me ha parecido lo más cercano a una apertura al interior de quien lo escribe, en medio de la fría presentación de trabajo científico que una tesis supone. Y hoy me toca a mí.

En primer lugar, agradecer a Javier Lacadena el haberme aceptado en su grupo de investigación hace 6 años y haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su dirección. No solo por sus aportaciones académico-científicas, sino también por haberme guiado y ayudado en los momentos en que me embargaba la desesperación, tratándome siempre con muchísimo cariño. Sobre todo por esto último, gracias otra vez.

También agradecer a todos los profesores que me han enseñado y ayudado en este proceso. A Álvaro, a Javier Turnay, a María Antonia, a Maite, a Nieves, a Julián, a Belén y a todos los profesores con los que he compartido las prácticas y que han convertido la docencia de prácticas en algo extremadamente agradable, a Olga, a Marisé y a todos cuyos nombres no me da para escribir.

Gracias enormemente a mis compañeros de laboratorio. A Espe, por haberme dado tantísimo y haberme enseñado tantísimo en todo este proceso, espero que nuestras vidas se vuelvan a encontrar y entrelazar. A Rodrigo, por haber sido compañero en esta peculiar cruzada; a Rorri, por haberme enseñado en mis primeros pasos con infinita paciencia y cariño; a Michel, por haberme acompañado en mis primeros pasos, por haberme dado muchísima confianza y haber estado siempre dispuesto a escucharme; a Laura C, por haber sido luz cuando los días parecían grises; a Rubén, porque aunque yo te enseñé muchas cosas, puede que tú me hayas enseñado más aún a mí; a Julián, por haber sido movimiento cuando todo parecía enfermamente estático; a Natalia, por haberme ayudado tantísimo con las nanopartículas de oro. Y a todos aquellos que se me pasará nombrar, pero que guardo en mi memoria: Cris Bueno, Laura M, Sara, Sarita...

En otro plano, pero en absoluto independiente del proceso que me ha llevado hasta aquí, tengo que dar las gracias a todas las personas de fuera de la universidad que me habéis acompañado en este camino. Algunos seguís estando en mi vida, otros ya no; pero en cualquier caso habéis sido apoyos y fuentes de ánimo y movimiento para seguir adelante. A Santi, amigo de la infancia y acérrimo determinista, por haber estado siempre ahí, y demostrarme lo firme que puede llegar a ser una amistad, estando siempre dispuesto a escucharme y a reírnos hasta reventar; a los del Máster; al primer Guille porque en la desesperación de mis primeros pasos, ahí apareciste para llenar mi vida de contenido y luces; a Paule; a Miguel, gracias por haberme acompañado en estos años desde que empecé este proceso, gracias por haberme dado la experiencia de caminar esta vida en

sincronía con tus pasos, gracias por sacarme de mis momentos de desesperación, podría seguir diciéndote gracias por tantas cosas, pero no queda bien que los agradecimientos superen los resultados, así que tendremos que seguir caminando juntos para que lo sepas. Gracias también a Chus, por tanto que me has dado, tantas risas y conversaciones, tantos marujeos, cervezas, angustias vitales y análisis socioeconómicos; a Raúl; gracias al segundo Guille, has sido un apoyo cuando el suelo desapareció, y antes de caer ya estabas riéndote y sufriendo conmigo; gracias a la gente que a día de hoy estáis, al tercer Guille, a Manuel.... No sé si seguiréis o no en mi vida, pero a día de hoy gracias por acompañarme en estos últimos momentos de mi vida como doctorando. Gracias a todos los estímulos, ideas, personas, que me habéis ayudado a ver que siempre hay más allá de lo que inmediatamente percibo, y haberme ayudado a interpretar, y moverme mejor en este marco curioso que se llama realidad.

Por último, gracias a mi familia, y de manera particular a mis padres por haber estado siempre apoyándome y haber estado ayudándome incondicionalmente. Se dice que somos nuestros padres, y yo me considero alguien fantástico, por lo que vosotros siendo así, me habéis hecho a vuestra imagen. A mi madre, por haber estado siempre apoyándome, riendo y peleando conmigo, luchando para que todo me fuese bien en la vida y por aguantarme cuando me ponía difícil. A mi padre, por haberme enseñado tantísimas cosas de la vida, por haber estado siempre más que dispuesto a ayudarme con cualquier problema que tuviese, y por haberme enseñado prudentemente a evitar cualquier tipo de peligro antes de que ocurriese. Espero devolveros todo lo que habéis hecho y hacéis a día de hoy por mí. Muchas gracias.





# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>17</b>
<b>Abstract</b>	<b>23</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>29</b>
<b>Introducción</b>	<b>35</b>
0. La enfermedad del cáncer	37
1. Cáncer colorrectal	39
1.1. Diagnóstico de cáncer colorrectal	41
1.2. Terapia actual de cáncer colorrectal	43
1.3. Termoterapia aplicada al cáncer colorrectal	45
1.4. Marcadores proteicos de cáncer colorrectal	48
2. Inmunoterapia	50
2.1. Anticuerpos monoclonales	51
2.2. Ingeniería de anticuerpos	54
2.2.1. Fragmento variable de cadena única (scFv)	54
2.2.2. <i>Nanobodies</i> (VHH)	55
2.2.3. Formatos multiméricos	56
3. Inmunotoxinas	59
3.1. Evolución de las inmunotoxinas	60
3.2. Optimización de inmunotoxinas	62
3.3. Inmunogenicidad de las inmunotoxinas	63
3.4. Inmunotoxinas en la actualidad	66
4. RNAsas fúngicas-ribotoxinas	67
5. Inmunotoxinas desarrolladas en nuestro grupo	73
<b>Objetivos</b>	<b>77</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>81</b>
<b>Materiales</b>	<b>83</b>
1. Tipos celulares y organismos	83
1.1. <i>Escherichia coli</i>	83
1.2. <i>Pichia pastoris</i>	83

# Índice

1.3 Líneas celulares de mamíferos	83
1.4. Células obtenidas de humanos	84
1.5. Organismos	84
2. Vectores de secuenciación y expresión heteróloga	85
3. Secuencias de cDNA.	85
4. Medios de cultivo.	86
4.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	86
4.2. Medios de cultivo para <i>P. pastoris</i>	87
4.3. Medios de cultivo para líneas celulares	87
5. Disoluciones y tampones	87
5.1. Electroforesis de ácidos nucleicos	87
5.2. Electroforesis de proteínas	88
5.3. Inmunodetección ( <i>Western Blot</i> )	88
5.4. Ensayos de actividad RNasa	88
5.5. ELISA	89
6. Columnas de cromatografía utilizadas	89
7. Anticuerpos utilizados	89
8. Oligonucleótidos utilizados	90
<b>Metodología</b>	<b>91</b>
1. Técnicas de purificación y caracterización de ácidos nucleicos	91
1.1. Amplificación de DNA por PCR	91
1.2. Digestión de DNA mediante enzimas de restricción	91
1.3. Purificación de fragmentos de DNA	91
1.4. Ligación de fragmentos de DNA	91
1.5. Electroforesis en geles de agarosa	92
1.6. Purificación de plásmidos de DNA-miniprep	92
1.7. Purificación de plásmidos de DNA-maxiprep	92
1.8. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	92
1.9 Transformación de células de <i>E. coli</i>	93
1.10. Electroporación de células de <i>P. pastoris</i>	93
2. Técnicas de producción y purificación de proteínas	94
2.1. Producción y purificación de $\alpha$ SDI	94

2.2. Producción y purificación de inmunotoxinas	94
2.3. Liofilización de proteínas	95
2.4. Caracterización de proteínas mediante electroforesis	95
2.5. Inmunodetección ( <i>Western Blot</i> )	96
3. Caracterización estructural de proteínas	96
3.1. Cálculo del coeficiente de extinción	96
3.2. Espectroscopía de dicroísmo circular	96
3.3. Espectroscopía de emisión de fluorescencia	97
4. Caracterización de la actividad ribonucleolítica	97
4.1 Zimograma	97
4.2. Actividad frente a SRL	97
4.3. Ensayo frente a ribosomas (ensayo de reticulocitos)	98
5. Ensayos de agregación de lípidos	98
6. Caracterización de la interacción antígeno-anticuerpo	99
6.1 Ensayo de unión mediante ELISA	99
6.2. Ensayo de unión mediante citometría de flujo	99
7. Caracterización de la actividad enzimática de la enzima furina	100
8. Caracterización de la estabilidad de proteínas	100
9. Caracterización de la eficacia citotóxica <i>in vitro</i>	100
9.1. Ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas	100
9.2. Ensayo de viabilidad celular por MTT	101
10. Caracterización inmunológica	101
10.1. Ensayo de estimulación de la división celular. Recuento de PBMCs	101
10.2. Ensayo de proliferación de linfocitos mediante CFSE	102
10.3. Ensayo de activación de THP-1-xBlue	102
10.4. Ensayo de cuantificación de citoquinas mediante ELISA	103
11. Caracterización de la eficacia antitumoral <i>in vivo</i>	104
12. Métodos asociados al estudio con nanopartículas de oro	105
12.1. Síntesis y caracterización de AuNS	105
12.2. Caracterización de la unión AuNS-proteína	106
12.3. Caracterización del complejo AuNS-proteína	107
12.3.1. Caracterización morfológica y espectroscópica	

# Índice

del complejo AuNS-proteína	107
12.3.2. Caracterización de la funcionalidad de la proteína en el complejo AuNS-proteína	108
12.3.3. Caracterización de la internación del complejo AuNS-proteína	108
12.3.4. Caracterización del potencial terapéutico del complejo AuNS-proteína	110
<b>Resultados</b>	<b>111</b>
<b>Bloque A. Producción y caracterización de inmunotoxinas no inmunogénicas basadas en una variante no inmunogénica de la <math>\alpha</math>-sarcina</b>	<b>113</b>
1. Diseño, producción y caracterización de $\alpha$ SDI	114
1.1. Obtención del vector de expresión pINPG $\alpha$ SDI	114
1.2. Producción y purificación de $\alpha$ SDI	114
1.3. Caracterización estructural de $\alpha$ SDI	116
1.4. Caracterización funcional de $\alpha$ SDI	117
1.4.1. Caracterización de la actividad ribonucleolítica	117
1.4.2. Caracterización de la interacción con lípidos	119
2. Diseño, purificación y caracterización de IMTXA33 $\alpha$ SDI	121
2.1. Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI	121
2.2. Producción y purificación de IMTXA33 $\alpha$ SDI	121
2.3. Caracterización estructural de IMTXA33 $\alpha$ SDI	123
2.4. Caracterización funcional de IMTXA33 $\alpha$ SDI	124
2.4.1. Caracterización del dominio tóxico de IMTXA33 $\alpha$ SDI.	124
2.4.2. Caracterización del dominio marcador de IMTXA33 $\alpha$ SDI	124
2.4.3. Caracterización de la actividad citotóxica de IMTXA33 $\alpha$ SDI	125
2.4.4. Caracterización de la estabilidad de IMTXA33 $\alpha$ SDI	126
2.4.5. Caracterización inmunológica de IMTXA33 $\alpha$ SDI	128
2.4.6. Caracterización del efecto antitumoral <i>in vivo</i> de IMTXA33 $\alpha$ SDI	130
3. Diseño, purificación y caracterización de IMTXA33furaSDI	132
3.1. Obtención del vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33furaSDI	132
3.2. Producción y purificación de IMTXA33furaSDI	132
3.3. Caracterización estructural de IMTXA33furaSDI	133
3.4. Caracterización funcional de IMTXA33furaSDI	134

3.4.1. Caracterización del dominio tóxico de IMTXA33furaSDI	134
3.4.2. Caracterización del dominio marcador de IMTXA33furaSDI	135
3.4.3. Caracterización del sitio de corte de furina de IMTXA33furaSDI	135
3.4.4. Caracterización de la actividad citotóxica de IMTXA33furaSDI	137
3.4.5. Caracterización de la estabilidad de IMTXA33furaSDI	138
3.4.6. Caracterización inmunológica de IMTXA33furaSDI	140
3.4.7. Caracterización del efecto antitumoral <i>in vivo</i> de IMTXA33furaSDI	144
<b>Bloque B. Producción y caracterización de nanoimmunotoxinas basadas en un <i>nanobody</i> (VHH) frente a EGFR</b>	<b>147</b>
1. Diseño, purificación y caracterización de VHHEGFR $\alpha$ S	148
1.1. Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ AVHHEGFR $\alpha$ S	148
1.2. Producción y purificación de VHHEGFR $\alpha$ S	148
1.3. Caracterización estructural de VHHEGFR $\alpha$ S	150
1.4. Caracterización funcional de VHHEGFR $\alpha$ S	150
1.4.1. Caracterización del dominio tóxico de VHHEGFR $\alpha$ S	151
1.4.2. Caracterización del dominio marcador de VHHEGFR $\alpha$ S	151
1.4.3. Caracterización de la capacidad citotóxica de VHHEGFR $\alpha$ S	153
1.4.4. Caracterización de la estabilidad de VHHEGFR $\alpha$ S	154
1.4.5. Caracterización del efecto antitumoral <i>in vivo</i> de VHHEGFR $\alpha$ S	156
2. Diseño, purificación y caracterización de TriVHHEGFR $\alpha$ S	157
2.1. Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ ATriVHHEGFR $\alpha$ S	157
2.2. Producción y purificación de TriVHHEGFR $\alpha$ S.	158
2.3. Caracterización estructural de TriVHHEGFR $\alpha$ S	159
2.4. Caracterización funcional de TriVHHEGFR $\alpha$ S	160
2.4.1. Caracterización del dominio tóxico de TriVHHEGFR $\alpha$ S	161
2.4.2. Caracterización del dominio marcador de TriVHHEGFR $\alpha$ S	161
2.4.3. Caracterización de la eficacia citotóxica de TriVHHEGFR $\alpha$ S	163
3. Diseño, purificación y caracterización de Biesp- $\alpha$ SDI	164
3.1. Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ ABiesp- $\alpha$ SDI	164
3.2. Producción y purificación de Biesp- $\alpha$ SDI	165
3.3. Caracterización estructural de Biesp- $\alpha$ SDI	166
3.4. Caracterización funcional de Biesp- $\alpha$ SDI	166

## Índice

3.4.1. Caracterización del dominio tóxico de Biesp- $\alpha$ SDI	167
3.4.2. Caracterización del dominio marcador de Biesp- $\alpha$ SDI	167
3.4.3. Caracterización de la actividad citotóxica de Biesp- $\alpha$ SDI	169
<b>Bloque C. Vehiculización de inmunotoxinas mediante nanopartículas de oro</b>	<b>171</b>
1. Síntesis de AuNS	172
2. Formación del complejo AuNS-Proteína	172
3. Caracterización del complejo AuNS-Proteína	176
4. Caracterización de la internación del complejo AuNS-Proteína	178
5. Potencial antitumoral del complejo AuNS-Proteína	181
<b>Discusión</b>	<b>185</b>
D1. Producción y caracterización de toxinas e inmunotoxinas no inmunogénicas	187
D2. Producción y caracterización de nanoimmunotoxinas basadas en un <i>nanobody</i> (VHH) frente a EGFR	195
D3. Vehiculización de inmunotoxinas mediante nanopartículas de oro	201
<b>Conclusiones</b>	<b>207</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>213</b>

**RESUMEN**

## Resumen y Abstract

En la actualidad, y pese al desarrollo de tecnologías biomédicas avanzadas y de nuevos métodos diagnósticos, la incidencia y mortalidad del cáncer constituyen uno de los principales riesgos para la salud y la esperanza de vida. Dentro de los tipos de cáncer, el cáncer colorrectal ocupa la tercera posición en incidencia y la segunda posición en mortalidad para la población global. La terapia suele consistir en cirugía, acompañada de quimioterapia y radioterapia como terapia adyuvante. No obstante, estos tratamientos no son específicos, ocasionando toxicidades inespecíficas y comprometiendo directamente la calidad de vida de los pacientes. Por ello, la inmunoterapia y el uso de anticuerpos monoclonales ha constituido un avance primordial en el tratamiento de esta enfermedad, al tratarse de terapias dirigidas de gran especificidad, presentando resultados clínicos prometedores.

Dentro de la inmunoterapia pasiva basada en anticuerpos monoclonales destacan las inmunotoxinas. Las inmunotoxinas son proteínas quiméricas que presentan un dominio marcador (normalmente un anticuerpo o derivado suyo) que dirige específicamente la acción de un dominio tóxico (formado por una toxina de naturaleza proteica) hacia la célula diana o tumoral, provocando la muerte de la misma. Desde los diseños iniciales, las inmunotoxinas han experimentado una evolución, tanto en su dominio marcador, mediante la incorporación de dominios de menor tamaño, como los formatos scFv (fragmento variable de cadena única) o VHH (*nanobody*), o con formatos triméricos (*trimerbody*); como en su dominio tóxico, mediante la utilización de toxinas de diferente origen o con variantes menos inmunogénicas. En este sentido, es destacable la utilización de ribotoxinas fúngicas como dominio tóxico de inmunotoxinas, y en particular de su miembro mejor caracterizado, la  $\alpha$ -sarcina, debido a su elevada estabilidad térmica, a su pequeño tamaño, a su baja inmunogenicidad y a su elevada eficacia catalítica.

Así, la presente tesis doctoral se ha centrado en el diseño de variantes de inmunotoxinas optimizadas, con una menor inmunogenicidad, una mayor eficiencia citotóxica, así como con una mayor penetración tumoral y un mayor tiempo de vida medio en sangre. Por otro lado, se ha iniciado una nueva estrategia mediante la combinación del potencial terapéutico de las inmunotoxinas con las propiedades de las nanopartículas de oro, destacando su elevada *ratio* superficie/volumen, su elevada reactividad química o la posibilidad de transformar energía lumínica en energía térmica mediante el efecto fototérmico (PTE) constituyendo una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer.

En primer lugar, se ha caracterizado una variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina, mediante la mutación de los epítomos de linfocitos T, mostrando que la nueva  $\alpha$ -sarcina deimmunizada ( $\alpha$ SDI) mantenía las mismas características estructurales y de interacción

## Resumen y Abstract

con lípidos de membrana, así como una actividad ribonucleolítica ligeramente mayor que la  $\alpha$ -sarcina *wild type* ( $\alpha$ SWT).  $\alpha$ SDI ha sido utilizada como dominio tóxico, en el diseño de una inmunotoxina no inmunogénica (IMTXA33 $\alpha$ SDI) dirigida frente al antígeno tumoral GPA33 gracias a su dominio marcador de formato scFv, concluyéndose que IMTXA33 $\alpha$ SDI mantenía las mismas características funcionales de actividad ribonucleolítica, de unión a células tumorales GPA33+, de actividad citotóxica específica y de actividad antitumoral *in vivo* que la variante original, IMTXA33 $\alpha$ S. Además, se ha diseñado otra variante de inmunotoxina no inmunogénica, IMTXA33fura $\alpha$ SDI, que incorpora un sitio de reconocimiento y corte proteolítico por la enzima furina presente en los endosomas entre el dominio marcador y el dominio tóxico. Esta nueva inmunotoxina mostró una mayor eficacia citotóxica *in vitro*, así como una mayor inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, a consecuencia de un procesamiento intracelular y una liberación del dominio tóxico al citosol más eficaz que la variante sin furina. Por último, la caracterización inmunológica mostró que en general, tanto la inmunotoxina original (IMTXA33 $\alpha$ S) como las variantes no inmunogénicas (IMTXA33 $\alpha$ SDI y IMTXA33fura $\alpha$ SDI) no provocaban respuesta inmunológica, observándose mínimas diferencias entre variantes inmunogénicas y no inmunogénicas.

Por otro lado, se han diseñado diferentes nanoimmunotoxinas que incluyen como dominio marcador un VHH frente al antígeno EGFR, sobreexpresado en numerosos tumores epiteliales, y cuyo dominio tóxico es la  $\alpha$ -sarcina, diferenciándose en su formato monomérico (VHHEGFR $\alpha$ S) o trimérico (TriVHHEGFR $\alpha$ S) en disolución, o en la incorporación de biespecificidad (Biesp- $\alpha$ SDI). Las dos primeras nanoimmunotoxinas mantuvieron la capacidad ribonucleolítica propia de la  $\alpha$ -sarcina, presentaron capacidad de unión específica a células EGFR+, así como actividad citotóxica *in vitro*. La variante monomérica, además, mostró actividad antitumoral *in vivo*. En el caso de la nanoimmunotoxina trimérica (TriVHHEGFR $\alpha$ S), que incorpora un dominio de trimerización del colágeno XVIII entre el dominio marcador y el dominio tóxico, presenta una mayor capacidad de unión y mayor eficacia citotóxica que su variante monomérica (VHHEGFR $\alpha$ S). Por último, Biesp- $\alpha$ SDI, que incluye los dos dominios marcadores mencionados previamente: VHH frente a EGFR y scFv frente a GPA33, y la  $\alpha$ SDI como dominio tóxico, exhibió capacidad de unión y citotoxicidad específica frente a líneas tumorales GPA33+ o EGFR+.

Finalmente, se han sintetizado nanoestrellas de oro (AuNS), que se han conjugado bien con la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S o con su dominio marcador exclusivamente (scFvA33) formando el complejo AuNS-A33 $\alpha$ S o el complejo AuNS-scFvA33 respectivamente. La caracterización de ambos complejos mostró que las AuNS mantenían sus propiedades

## Resumen y Abstract

físico-estructurales, al igual que se mantenían las características funcionales de IMTXA33 $\alpha$ S o scFvA33. Mediante ensayos de microscopía de fluorescencia, se observó que el complejo AuNS-scFvA33 permitía una mayor administración intracelular de scFvA33, que la llevada a cabo por la internación mediada por receptor de scFvA33 aislado, demostrando el papel de las AuNS como plataformas biomédicas de administración de fármacos. Los ensayos de toxicidad llevados a cabo con los distintos complejos mostraron de manera preliminar un efecto fototérmico ligeramente mayor del complejo AuNS-scFvA33 respecto a las AuNS, debido posiblemente a la capacidad del dominio marcador de dirigir todo el complejo hacia células GPA33+.

Por tanto, nuestros resultados suponen no sólo un avance en la optimización de inmunotoxinas, con nuevos diseños más eficientes, sino que apoyan el desarrollo de nuevas estrategias basadas en la combinación de inmunotoxinas con nanopartículas de oro, con el objetivo de trasladar esta aproximación al tratamiento terapéutico del cáncer colorrectal.

## Resumen y Abstract

**ABSTRACT**

## Resumen y Abstract

Nowadays, the incidence and mortality of cancer remain one of the main risks to human health and lifespan, in spite of the development of biomedical technology and new diagnostic methods. Among the cancer classification, colorectal cancer remains in third place considering incidence, and second place considering mortality for global population. Current therapy consists of surgery, followed by chemotherapy or radiotherapy as adjuvant treatment. However, these are non-specific therapies, leading to systemic toxicity and affecting directly the quality of life of patients. That is why immunotherapy and the advent of monoclonal antibodies have arisen as a breakthrough in the treatment of this disease, as they are target therapies with great specificity and promising clinical results.

Regarding passive immunotherapy based on monoclonal antibodies, immunotoxins are a type of immunoconjugates. Immunotoxins are chimeric molecules, with a target domain (usually an antibody or a derived from it) that targets specifically the action of a toxic domain (a toxic protein) towards the cancerous cell, leading to its death. Since immunotoxins were first conceived, they have undergone an evolution in its designs, with the use of smaller target domains, such as scFv (single chain fragment variable), VHH (nanobody) or trimeric formats (trimerbody) or using toxins from different sources, being less immunogenic. Regarding the latter, the use of fungal ribotoxins, being  $\alpha$ -sarcin the most characterized member of fungal ribotoxins, has earned quite interest because of its high thermal stability, small size, low immunogenicity and high catalytic efficiency.

So, the present doctoral thesis has focused on the design of improved immunotoxins, characterized by being less immunogenicity, a higher cytotoxic efficiency, a better tumor penetration and longer bloodstream half-life. Besides, a new biomedical approach has been carried out, combining the potential of immunotoxins with the properties of gold nanoparticles, such as their high surface/volume ratio, their enhanced surface reactivity or the possibility of turning light into thermal energy due to the photothermal effect (PTE) could lead to a new therapeutic tool for cancer treatment.

First, a deimmunised variant of  $\alpha$ -sarcin, by mutation of T-cell epitopes, has been characterized, showing that the new deimmunized  $\alpha$ -sarcin ( $\alpha$ SDI) kept the same structural and membrane lipids interaction features as the wild type  $\alpha$ -sarcin ( $\alpha$ SWT), with a slightly higher ribonucleolytic activity. This  $\alpha$ SDI has been used as the toxic domain for the design of a non-immunogenic immunotoxin (IMTXA33 $\alpha$ SDI), against the tumoral antigen GPA33 thanks to its target domain in a scFv format, concluding that IMTXA33 $\alpha$ SDI kept the same ribonucleolytic activity, binding to tumoral GPA33+ cells, specific cytotoxic activity against these cells and antitumoral activity in vivo than the original immunotoxin (IMTXA33 $\alpha$ S). Besides a new non immunogenic with a furin site variant has been designed

## Resumen y Abstract

(IMTXA33fura $\alpha$ SDI) introducing a recognition and cleavage site by the enzyme furin, located in the endosomes, between the target domain and the toxic domain. This new immunotoxin showed an improved cytotoxic activity in vitro, and better antitumor activity in vivo compared to the variant without the furin site, due to a more efficient intracellular processing, and a faster release of the toxic domain to the cytosol. Last, the immunological characterization concluded that, both the original immunotoxin (IMTXA33 $\alpha$ S) and the non-immunogenic variants (IMTXA33 $\alpha$ SDI and IMTXA33fura $\alpha$ SDI), didn't trigger any immunological response, with minimal differences between immunogenic and non-immunogenic immunotoxins.

Besides, different nanoimmunotoxins have been designed with the target domain consisting of a VHH against EGFR, an overexpressed antigen in several epithelial tumors, and  $\alpha$ -sarcin as the toxic domain, with a monomeric (VHHEGFR $\alpha$ S) or a trimeric format (TriVHHEGFR $\alpha$ S) or showing bispecificity (Biesp- $\alpha$ SDI). Both VHHEGFR $\alpha$ S and TriVHHEGFR $\alpha$ S exhibited the ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin, specific binding to EGFR+ cells and cytotoxic activity in vitro. On top of this, the monomeric variant showed antitumoral efficacy in vivo. As for the trimeric nanoimmunotoxin (TriVHEGFR $\alpha$ S), it included the collagen XVIII derived trimerization domain between the target and the toxic domain, exhibiting enhanced binding properties and cytotoxic activity compared with its monomeric counterpart (VHHEGFR $\alpha$ S). Last, the bispecific immunotoxin (Biesp- $\alpha$ SDI), with the 2 target domains previously mentioned: VHH against EGFR and scFv against GPA33 and including  $\alpha$ SDI as the toxic domain showed specific binding and cytotoxicity against both EGFR+ and GPA33+ tumoral cells.

Finally, gold nanostars (AuNS) have been synthesized and biochemically conjugated to the immunotoxin (IMTXA33 $\alpha$ S) or just its target domain (scFvA33) forming the AuNS-A33 $\alpha$ S or the AuNS-scFvA33 complex respectively. The characterization of both complexes showed that both AuNS kept their physical and structural properties, and the protein moieties kept the same functional features than before the conjugation. Using fluorescence microscopy, it was shown that the complex AuNS-scFvA33 allowed a higher intracellular uptake of scFvA33 than observed for scFvA33 isolated, indicating the potential role of gold nanoparticles as biomedical platforms for drug delivery. Preliminary cytotoxic assays showed a slightly higher photothermal effect of the AuNS-scFvA33 complex, compared to AuNS isolated, possibly due to the targeting effect of scFvA33 towards GPA33+ cells.

## **Resumen y Abstract**

In summary, these results are not only an advance in the improvement of immunotoxins, with more efficient designs, but also support the development of new strategies combining immunotoxins with gold nanoparticles, with the final aim of using these therapies for the colorectal cancer treatment.

## Resumen y Abstract

**ABREVIATURAS**

## Abreviaturas

**$\alpha$ SWT:**  $\alpha$ -sarcina *wild type*.

**$\alpha$ SDI:**  $\alpha$ -sarcina deimmunizada.

**ADAs:** anticuerpos anti-droga (*anti-drug antibody*).

**ADCC:** citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*).

**ANTACo<sup>II</sup>:** complejo amida nitrilotriacético-Co<sup>II</sup>.

**AuNP:** nanopartículas de oro.

**AuNS:** nanoestrellas de oro.

**BSA:** albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*).

**CD:** dicroísmo circular (*circular dichroism*).

**CDC:** citotoxicidad celular dependiente del complemento (*complement-dependent cytotoxicity*).

**CDR:** región determinante de la complementariedad (*complementary determinant region*).

**CEA:** antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*).

**CFSE:** carboxifluoresceína succinimidil éster.

**CRC:** cáncer colorrectal (*colorectal cancer*).

**DAB:** diaminobencidina.

**DMPG:** 1,2-dimiristoil, 3-fosfatidil glicerol.

**DNA:** ácido desoxirribonucleico.

**DOL:** grado de marcaje (*degree of labelling*).

**ECL:** electroquimioluminiscencia.

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**EGF:** factor del crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*).

**EGFR:** receptor de factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*).

**FBS:** suero fetal bovino (*fetal bovine serum*).

## Abreviaturas

**Fc:** fragmento constante.

**FDA:** *Food and Drug Administration* de los EEUU.

**FPLC:** cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (*fast protein liquid chromatography*).

**Fv:** fragmento variable.

**GPA33:** glicoproteína A33.

**Ig:** Inmunoglobulina.

**IMTX:** inmunotoxina.

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

**LPS:** lipopolisacárido.

**LSPR:** resonancia localizada de plasmón de superficie (*localized surface plasmon resonance*).

**mAb:** anticuerpo monoclonal.

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-difenil-tetrazolio.

**NIR:** radiación del infrarrojo cercano (*near infrared radiation*).

**O/N:** *overnight*.

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

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

**PBS:** tampón fosfato salino.

**PEG:** polietilenglicol.

**PTA:** agente de transducción fototérmica (*photothermal transduction agent*).

**PTE:** efecto fototérmico (*photothermal effect*).

**RNA:** ácido ribonucleico.

**RT:** temperatura ambiente (*room temperature*).

**scFv:** fragmento variable de cadena única.

**SDS:** dodecilsulfato sódico.

## Abreviaturas

**SRL:** lazo sarcina-ricina (*sarcin-ricin loop*).

**TAA:** antígeno asociado a tumor (*tumor associated antigen*).

**TEM:** microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*).

**TLR:** *Toll Like Receptor*.

**T<sub>m</sub>:** Temperatura media de desnaturalización.

**VHH:** *nanobody* o anticuerpo de dominio único.

**VLS:** síndrome de fragilidad vascular (*vascular leak syndrome*).

## Abreviaturas

# INTRODUCCIÓN

## Introducción

### 0. La enfermedad del cáncer

*Gilgamesh, ¿por qué vagas de un lado para otro?*

*La vida que persigues no la encontrarás jamás.*

*Cuando los dioses crearon la humanidad*

*Asignaron la muerte para la humanidad,*

*Pero ellos guardaron entre sus manos la Vida.*

(Andrew, 2017)

El Poema de Gilgamesh constituye la primera expresión literaria de lamento, desconcierto y rechazo ante la muerte. Comienza desde entonces el recorrido del ser humano que se sabe mortal y perecedero, y de este saberse mortal surgen las grandes construcciones culturales de la humanidad: la organización social inter e intrafamiliar para defenderse de ataques externos e internos, doctrinas religiosas que aventuran el más allá, y una intensa labor técnica destinada al mantenimiento de la vida y el cese de la enfermedad.

Todas las culturas se han enfrentado y teorizado con la enfermedad, siendo tan antigua como la misma civilización. Así, ya en Mesopotamia, surgió la creencia de que la enfermedad era originada por una entidad demoníaca que había tomado posesión de una parte del cuerpo del enfermo, por lo que además de remedios naturales, era necesarios rituales mágicos por parte del médico para su completa eliminación (Román, 2008).

El primer texto donde se documenta la primera aparición de la enfermedad del cáncer es el papiro egipcio de Edwin Smith (3000 a.C), en el que se describe el crecimiento descontrolado, y la imposibilidad de tratamiento de un cáncer de mama. Por aquel entonces, el tratamiento de los tumores y cánceres se llevaba a cabo mediante cirugía con cuchillos, o con hierbas medicinales.

Con los griegos, el paso del *mythos* al *logos*, y la búsqueda de causas racionales se aplicó también a la medicina. Hipócrates (460-375 a.C) postuló que el cáncer era debido a causas naturales, y no a supersticiones o elementos sobrenaturales. De los 4 fluidos que componen el cuerpo humano, y determinan el carácter de cada individuo (sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra), el exceso de bilis negra era el responsable del desarrollo del cáncer. El crecimiento descontrolado del cáncer, similar al movimiento de un cangrejo, llevó a Hipócrates a denominar y distinguir entre cáncer (tumor maligno) y carcinoma (tumor maligno ulceroso). Además, caracterizó pólipos colorrectales con ayuda de un espéculo (Steven *et al.*, 2011).

## Introducción

A medida que transcurría el tiempo, la ciencia médica se enriqueció con los datos aportados por autopsias (siendo el primero en llevarlas a cabo Giovanni Morgani de Padua, en 1761), y los descubrimientos de los sistemas fisiológicos humanos. Se adquirió un conocimiento mucho más preciso de las condiciones patológicas de la enfermedad del cáncer, y a lo largo de los s. XVIII, XIX y XX se fueron esclareciendo sus posibles causas.

Así, el zoólogo alemán Theodor Boveri (1862-1915), estudiando los embriones de erizos de mar, concluyó que los cromosomas debían tener la información para el desarrollo normal del organismo, y que la alteración de esta información podría estar asociada con la transformación neoplásica. Por otro lado, en 1911, Peyton Rous demostró que el cáncer podía ser causado por un virus, como el virus del sarcoma de Rous. Por su parte, en 1863 Rudolf Virchow propuso que las células cancerosas podían haber surgido a partir de otras células, que habían sido alteradas por el estroma en estado de inflamación (Pasqualini, 2012). Con ello, queda patente la heterogeneidad en las causas que conducen a la aparición de un cáncer, heterogeneidad que queda enormemente ramificada por la azarosa progresión del cáncer, y que es responsable en última instancia de la dificultad de su tratamiento terapéutico.

Un elemento clave en el desarrollo histórico de la terapia frente a la enfermedad del cáncer fue el descubrimiento en 1890 de los anticuerpos, realizado por el fisiólogo Emil von Behring y el microbiólogo Shibasaburo Kitasato, como antitoxinas protectoras frente a la toxina diftérica o tetánica en la sangre de animales (Behring & Kitasato, 1890), y su aplicación en lo que hoy se conoce como inmunoterapia (Smyth *et al.*, 2001; Trapani & Darcy, 2017; Johdi & Sukor, 2020).

Estas nuevas moléculas, los anticuerpos, se enriquecieron con el concepto de especificidad, propuesto por Paul Ehrlich, como un rasgo propio de sus drogas (utilizando por primera vez el concepto de quimioterapia), a las que denominó balas mágicas, capaces de matar y dirigidas exclusiva y específicamente contra un tipo celular (Ehrlich, 1911), lo cual se demostró más sencillo en el caso de organismos patógenos, que frente a células cancerosas.

No obstante, esta especificidad propia de los anticuerpos se refería normalmente a poblaciones más que a anticuerpos individualizados. Esta situación cambió en 1975 con el descubrimiento y síntesis por parte de Köhler y Milstein de los anticuerpos monoclonales, anticuerpos que homogéneamente reconocían un solo epítipo (Rajewsky, 2019).

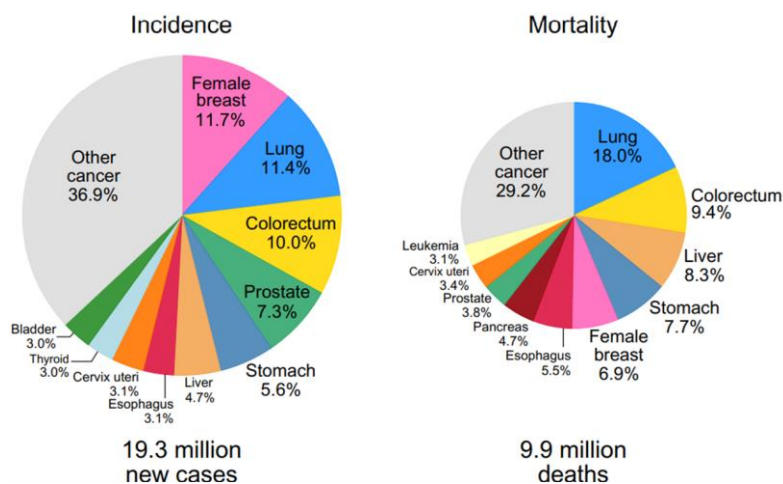
Es destacable el largo proceso histórico que ha tenido esta enfermedad, y el no menos largo recorrido de los intentos por erradicarla. A día de hoy, el Instituto Nacional del Cáncer define el cáncer como “todas aquellas enfermedades en las que hay células anormales que

se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Las células de cáncer también se pueden diseminar a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático” (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1. Cáncer Colorrectal

Actualmente, las enfermedades no infecciosas son responsables de la mayor parte de muertes globales, y se estima que el cáncer se convertirá en la primera causa de muerte y la principal barrera al aumento de la esperanza de vida en el siglo XXI debido al progresivo crecimiento y envejecimiento de la población, así como a la prevalencia y distribución de sus principales factores de riesgo.

De los diversos tipos de cáncer, clasificados en función del órgano o sistema al que afectan, el cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia (1,9 millones de casos nuevos anuales) y el segundo de mayor mortalidad (935.000 muertes anuales) en el mundo (**Figura 1**). Presenta una mayor prevalencia geográfica en Europa, América del Norte y el este asiático, relacionándose con niveles elevados de desarrollo socioeconómico (Bray *et al.*, 2018; Sung *et al.*, 2021).



**Figura 1. Gráficos de incidencia y mortalidad** para ambos sexos de los distintos tipos de cáncer en el mundo en 2020. El cáncer colorrectal aparece representado de color amarillo. Adaptado de Sung *et al.*, 2021.

*et al.*, 2018; Sung *et al.*, 2021).

La edad, los factores genéticos/epigenéticos y medioambientales son los principales factores de desarrollo del cáncer colorrectal. Así, el cáncer colorrectal hereditario incluiría el Síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario no polipósico), la poliposis

adenomatosa familiar (FAP) y la poliposis asociada a MUTYH. No obstante, los casos de cáncer colorrectal hereditario sólo representan el 5% de todos los casos de cáncer colorrectal, siendo el 95% restante esporádicos o ambientales (Dekker *et al.*, 2019).

Los principales factores del riesgo para desarrollar cáncer colorrectal esporádico son la obesidad, estilo de vida sedentario, factores dietéticos (consumo de carnes rojas y

## Introducción

procesadas, alcohol), el tabaco, enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa principalmente), diabetes *mellitus*, así como infección por determinadas especies de bacterias, como *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides fragilis* (Kwong *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ha encontrado evidencia estadística de ciertos factores protectores respecto al cáncer colorrectal, como la actividad física y ciertos factores dietéticos (consumo de frutas y verduras, de fibra, de ácido fólico, calcio, vitamina B6, magnesio, ajo...) (Thanikachalam & Khan, 2019).

La mayoría de los cánceres colorrectales surgen de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en las células madre localizadas en la base de las criptas intestinales o criptas de Lieberkühn. (Nassar & Blancpain, 2016). A medida que estas alteraciones genéticas se acumulan, se inhiben genes supresores de tumores y se activan oncogenes, dando lugar a la formación de un pólipo. El desarrollo aberrante del pólipo terminará por dar lugar al cáncer colorrectal en un plazo aproximado de 10-15 años. Este progreso o extensión tumoral permite su clasificación en función del tamaño tumoral, del grado de afección ganglionar y de la presencia/ausencia de metástasis (sistema de clasificación TNM) (Eguino *et al.*, 2002; Sagaert *et al.*, 2018). Así, se describen distintas etapas de la enfermedad (**Figura 2**), según el criterio TNM:

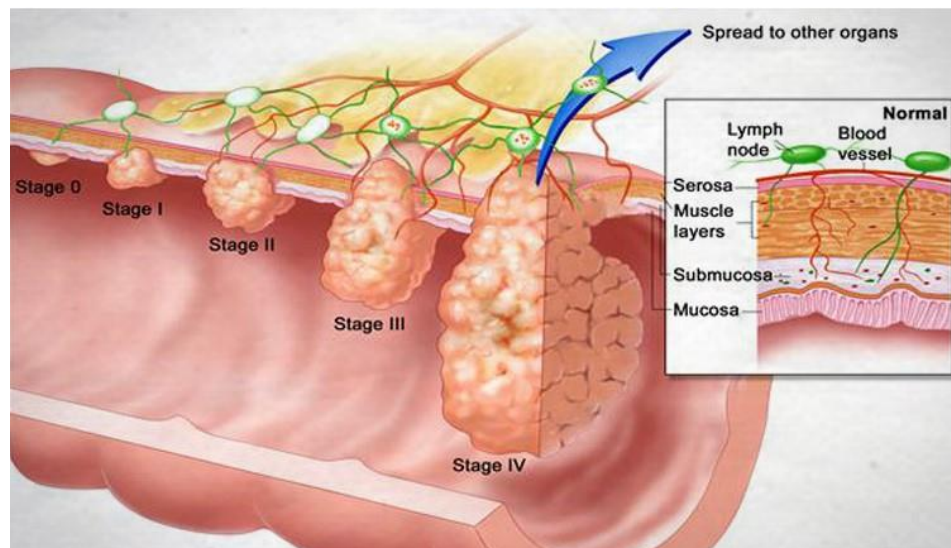
Estadío 0 o carcinoma *in situ*. Se trata de la fase más precoz de la enfermedad, en la que las células tumorales no han traspasado la capa más superficial del colon o el recto (mucosa).

Estadío I. El tumor ha continuado proliferando, y penetrando en las distintas capas de tejido de la mucosa, sin llegar a la capa muscular. No se ha producido afección de los ganglios.

Estadío II. El tumor ha penetrado todas las capas que constituyen la pared del colon, incluida la capa muscular. No se ha producido afección de los ganglios.

Estadío III. Existen ganglios afectados, independientemente de la profundidad de la penetración del tumor.

Estadío IV. Se ha producido metástasis, y el tumor se ha diseminado a otros órganos y tejidos a distancia.



**Figura 2. Esquema de la progresión del cáncer colorrectal**, según la clasificación TNM. Se indican los distintos estadios de desarrollo del cáncer colorrectal, desde el estadio 0 hasta el IV, así como un esquema del corte histológico de la mucosa intestinal. Fuente: medicine/health.

### 1.1 Diagnóstico de cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es una enfermedad tratable y prevenible debido a su lento desarrollo. Además, la supervivencia de los pacientes depende enormemente del estadio tumoral en el momento en que este es diagnosticado. Por tanto, una detección y diagnóstico precoz es la primera línea de actuación para reducir su incidencia y mortalidad.

En la actualidad, en la práctica clínica rutinaria se llevan a cabo principalmente dos tipos de técnicas diagnósticas (Soudabeh *et al.*, 2017):

- Técnicas que detectan la presencia de sangre en las heces, cuyo origen puede ser un pólipo canceroso. Estas técnicas son: el test de sangre oculta en heces, basada en guayacol (gFOBT) que detecta la actividad peroxidasa de la hemoglobina, y el test de sangre oculta fecal inmunoquímico (FIT), que detecta el componente globínico de la hemoglobina. No obstante, estas pruebas no son específicas, pues no solo reconocen la hemoglobina humana, presentan baja sensibilidad clínica y un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de una neoplasia colorrectal.
- Diagnósticos físicos o exámenes endoscópicos, entre los que se encuentran la sigmoidoscopia flexible, la rectoscopia, la tomografía computerizada y la colonoscopia. Aunque la colonoscopia sea la práctica diagnóstica estándar del cáncer colorrectal presenta algunas limitaciones, pues es una técnica invasiva e

## Introducción

incómoda para el paciente, cara y que requiere de experiencia y un equipo técnico adecuado.

Por tanto, la investigación actualmente se dirige al desarrollo de test y técnicas no invasivas que detecten biomarcadores específicos de cáncer colorrectal. Los biomarcadores serían todas aquellas moléculas biológicas (DNA, RNA, miRNA, proteínas, alteraciones epigenéticas o metabolitos) que se pueden detectar en fluidos o tejidos corporales mediante técnicas Ómicas, y tienen valor diagnóstico, pronóstico y de supervivencia.

Entre los biomarcadores, el antígeno carcinoembrionario (CEA, de *Carcinoembryonic Antigen*) es uno de los más utilizados. CEA es una glicoproteína, que puede encontrarse como proteína de membrana o secretada al torrente sanguíneo, con valor diagnóstico preoperatorio y pronóstico. Así, elevados niveles de CEA al comienzo de la detección se relacionaban con un peor pronóstico (Duffy *et al.*, 2013). No obstante, debido a la baja sensibilidad de CEA como biomarcador único, suele utilizarse junto con la detección de otros biomarcadores como el antígeno carbohidrato 19-9 o la *ratio* neutrófilo-linfocito (NLR) (Cai *et al.*, 2019).

Debido a que los principales mecanismos involucrados en la acumulación de alteraciones tumorales son de naturaleza genética, como la inestabilidad cromosómica (CIN), inestabilidad de microsátélites (MSI), alteraciones epigenéticas como metilación del DNA, y mutaciones y defectos en el sistema de reparación del DNA (MMR o *Mismatch Repair System*); la detección y discernimiento de estas alteraciones genéticas se han convertido en biomarcadores con valor pronóstico, pues el perfil genético es el responsable de la respuesta o resistencia al tratamiento (Turano *et al.*, 2019). Así, determinadas mutaciones en K-RAS confieren resistencia a la inmunoterapia frente a EGFR, mientras que otras, como p.G13D confieren buen pronóstico (Osumi *et al.*, 2015), o mutaciones en B-RAF son indicativas de mal pronóstico en pacientes MSI-L (baja inestabilidad cromosómica) (Tran *et al.*, 2011).

Otros biomarcadores con potencial valor diagnóstico y pronóstico son los microRNAs (miRs), debido a su sencilla extracción a partir de fluidos biológicos (como sangre o suero) o a partir de exosomas y a su elevada estabilidad y vida media. Los miRs pueden regular negativamente la expresión de los genes supresores de tumores (denominándose oncomiRs) o de oncogenes (denominándose anti-oncomiRs). Así, en el CRC, se produce un aumento de la actividad de oncomiRs (como miR-92<sup>a</sup>, miR-21, miR143, miR-135b o miR-155, entre otros), y una disminución de la intensidad de los anti-oncomiRs (mir-378), respecto a los perfiles control de individuos sanos (Gherman *et al.*, 2020).

Toda esta batería de biomarcadores ha permitido una mejor aproximación al diagnóstico de la enfermedad, una mayor adecuación de los tratamientos terapéuticos posibles, una reducción de tratamientos innecesarios y una disminución en los costes. Todo ello encuadrado en el contexto de una medicina cada vez más personalizada.

### 1.2 Terapia actual de cáncer colorrectal.

En la actualidad, existen diferentes aproximaciones terapéuticas para tratar el cáncer colorrectal, que varían en función del tipo, avance y perfil genético del tumor, determinados por las técnicas diagnósticas y los marcadores; de los posibles efectos secundarios, y de las circunstancias socioeconómicas de la región que se trate.

Así, el principal tratamiento para pacientes con cáncer colorrectal en estadio 0 o I es el tratamiento endoscópico o la **cirugía**, sin necesidad de ninguna terapia adyuvante (Dekker *et al.*, 2019).

En los casos más avanzados, se suele utilizar **quimioterapia**. La quimioterapia estándar para el cáncer colorrectal se basa en fluoropirimidinas (como el 5-Fluorouracilo, 5-FU; o capecitabina), Oxaliplatino, Irinotecan o trifluoridina/tipiracilo (este último utilizándose sólo en caso de recurrencia de la enfermedad). El 5-FU actúa inhibiendo la enzima timidilato sintasa, una enzima crucial para la síntesis de DNA. El Irinotecan lleva a cabo su acción citotóxica inhibiendo la enzima topoisomerasa de tipo 1 (TOPO 1). El oxaliplatino (L-OHP), por su parte es un agente alquilante que interactuando con el DNA y formando puentes intra e intercatenarios interrumpen su síntesis, llevando a cabo una acción sinérgica con las fluoropirimidinas.

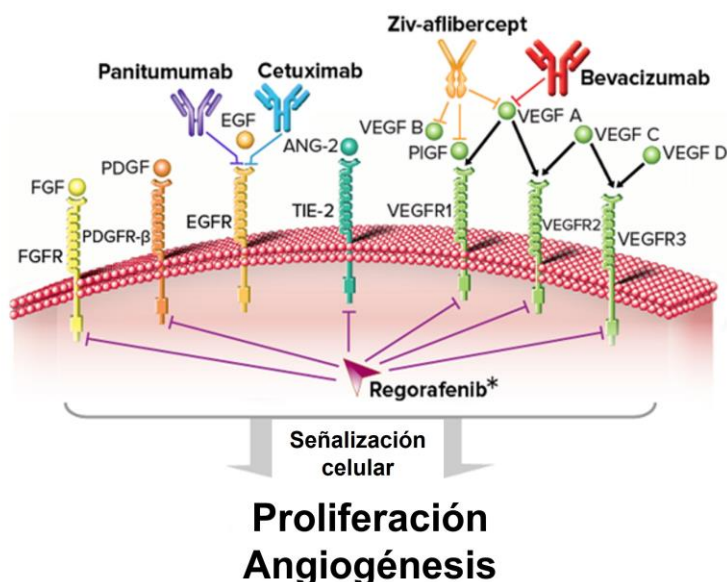
Los regímenes de quimioterapia que se suelen aplicar consisten en la administración de 5-FU+ Irinotecan (FOLFIRI) seguido por 5-FU + Oxaliplatino (FOLFOX), dando lugar a una supervivencia media de 21 meses. Además, junto a la quimioterapia, en ocasiones se utiliza **radioterapia** preoperativa para reducir el riesgo de recurrencia local, con una dosis de 45-50 gray en 25-28 fracciones, utilizándose una fluoropirimidina como un sensor de radiación (Glynne-Jones *et al.*, 2018).

Dependiendo del tipo de tumor y de las características del paciente, en ocasiones, y junto a la quimioterapia clásica, también se suelen administrar terapias dirigidas (Kuipers *et al.*, 2016). Este tipo de terapias dirigidas se basan fundamentalmente en la **inmunoterapia**, como una terapia alternativa más específica que la quimioterapia convencional, que utiliza células y moléculas del sistema inmune para la erradicación del cáncer, y que se expondrá más exhaustivamente en el siguiente apartado. En la práctica clínica del cáncer colorrectal,

## Introducción

la terapia dirigida consiste en: anticuerpos monoclonales frente al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), como cetuximab y panitumumab; o inhibiendo la señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR-A), como bevacizumab; o mediante moléculas pequeñas inhibidoras de actividad tirosina quinasa (como regorafenib) (**Figura 3**).

La señalización por EGFR puede ser bloqueada mediante anticuerpos monoclonales específicos del dominio extracelular del receptor, mediante moléculas que bloqueen el ligando soluble, o mediante moléculas pequeñas que inhiban la actividad quinasa, bloqueando el dominio citoplasmático de unión al ATP. Así, cetuximab es un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico que se une al dominio extracelular de EGFR, provocando su internación y degradación, mientras que panitumumab es un anticuerpo completamente humanizado, específico de EGFR (Jonker *et al.*, 2007; Douillard *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2020). No obstante, estas terapias dirigidas, que aumentan la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, son eficaces solamente si no existen mutaciones activantes *downstream* de la señalización por EGFR, como para el caso de KRAS y NRAS (Douillard *et al.*, 2013). En general, los cánceres colorrectales del lado derecho no se benefician de la terapia anti EGFR, debido a que presentan un origen embriológico distinto a los tumores del lado izquierdo, así como un mayor número de mutaciones para KRAS (Dekker *et al.*, 2019).



**Figura 3. Esquema de las terapias dirigidas aprobadas frente a cáncer de colon.** Se indican los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a EGFR (cetuximab o panitumumab), inhibiendo a VEGFR (bevacizumab o aflibercept) y moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa (regorafenib). Fuente: [www.scienceofcrc.org/treat](http://www.scienceofcrc.org/treat).

Además, los tumores establecen una red vascular de crecimiento aberrante una vez que han alcanzado cierto crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011). Este desarrollo angiogénico es producido por la glicoproteína secretada por células tumorales y estromales, VEGF-A (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial), que se une a sus receptores tirosina quinasa en células

endoteliales de vasos sanguíneos y células no endoteliales: VEGFR-1 y VEGFR-2, aumentando la proliferación y migración de células endoteliales, constituyendo nuevos vasos sanguíneos y aumentando la permeabilidad vascular (Lopez *et al.*, 2019). Así, bevacizumab es un anticuerpo monoclonal IgG humanizado dirigido frente a VEGF, que inhibe el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos tumorales, y aumenta la supervivencia total de los pacientes cuando es administrado junto a quimioterapia convencional (Hurwitz *et al.*, 2004). Hasta ahora, bevacizumab constituye el único anticuerpo dirigido frente a VEGF aprobado por la FDA para el cáncer colorrectal, aunque se están desarrollando nuevos agentes antiangiogénicos, como aflibercept, una proteína recombinante que consiste en la fusión de los dominios de unión de VEGFR-1 y VEGFR-2 a VEGF con el fragmento Fc de IgG1 humana (Tang *et al.*, 2012).

Con el descubrimiento de los puntos de control inmunitarios (*checkpoints*), PD-1/PD-L1 y CTLA-4, se ha comenzado a investigar en inhibidores de estos *checkpoints* para tratar el cáncer colorrectal. No obstante, esta inmunoterapia sólo ha probado ser eficaz en pacientes que presentan tumores del perfil genético dMMR (*Mismatch Repair-deficient*) y MSI-H (*High levels of MicroSatellite-Instability*), debido a la amplia tasa de mutaciones, y a la elevada infiltración de linfocitos T expresando estos *checkpoints* (Overman *et al.*, 2017). Así, se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente a PD-1 (pembrolizumab o nivolumab), PD-L1 (durvalumab) y CTLA-4 (ipilimumab) (Tintinot *et al.*, 2019).

Otras terapias que se están investigando serían el efecto abscopal, que mediante la radiación de tumores inmunogénicos provoca la regresión de otros tumores distantes debido a la activación de células inmunes efectoras; la utilización de agonistas de TLR (*Toll Like Receptor*), con el fin de estimular la maduración de células dendríticas, y la consecuente secreción de citoquinas proinflamatorias; la utilización de virus oncolíticos, que lisen las células tumorales y estimulen la respuesta inmune; o la termoterapia frente a cáncer colorrectal.

### 1.3 Termoterapia aplicada al cáncer colorrectal.

Recientemente, la **terapia fototérmica** ha cobrado interés biomédico por su potencial terapéutico, que se basa en el efecto fototérmico, por el cual determinados agentes de transducción fototérmica pueden convertir la energía de la luz en calor, y así, si han sido previamente dirigidas al tumor, aumentar la temperatura del ambiente circundante causando la muerte de las células cancerosas. La terapia fototérmica constituiría una terapia altamente específica, con una menor invasividad y un menor daño a tejidos sanos que las técnicas convencionales (Chen *et al.*, 2020). No obstante, esta terapia también presenta algunos inconvenientes: la limitada penetración de la luz en el tejido, permitiendo

## Introducción

el mantenimiento y recurrencia de las células tumorales fuera del área iluminada; una baja retención del agente fototérmico, con la consiguiente inespecificidad o resistencias a esta terapia por parte de algunos tumores, al sobreexpresar proteínas de choque térmico (Abadeer & Murphy, 2016).

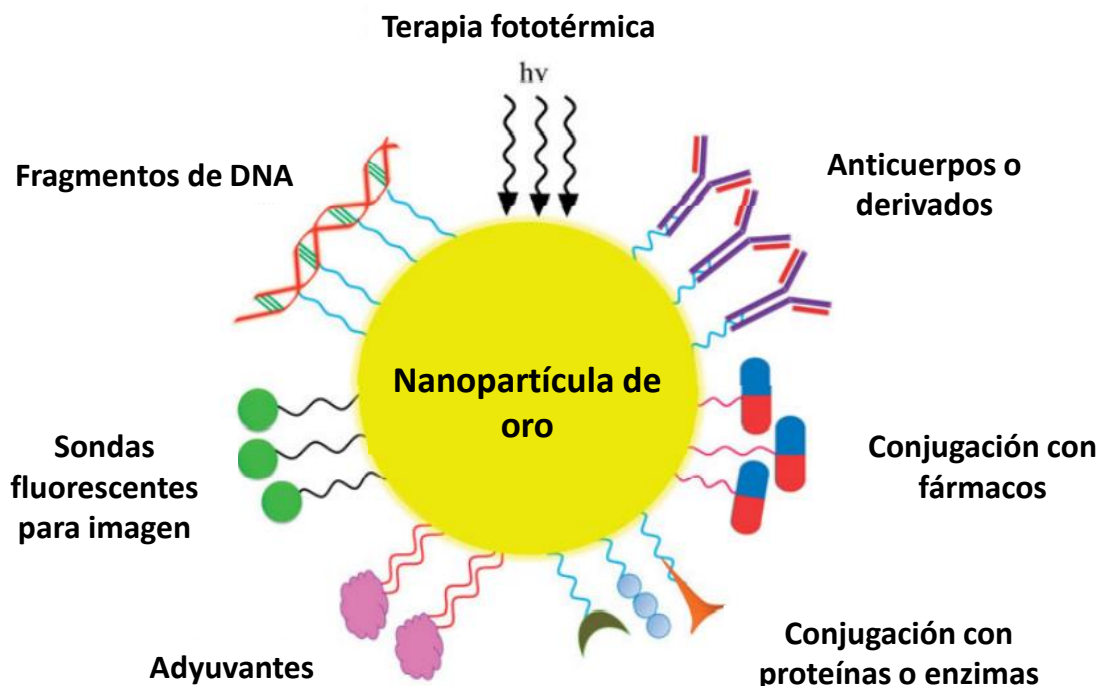
El **agente de transducción fototérmica** (PTA, de sus siglas en inglés) ideal debería tener una alta eficiencia de conversión fototérmica, una absorción que no solape con el fondo del tumor, y una elevada permeabilidad y acumulación en tumores.

Con el fin de superar el obstáculo de la escasa penetración de la luz en los tejidos, se han diseñado diferentes agentes fototérmicos que absorben luz en longitudes de onda transparentes para los tejidos, como la región infrarroja de longitudes de onda comprendidas entre 650-1350 nm (*Near Infrared Radiation*, NIR), pues de esta manera la radiación puede penetrar en la piel con menores riesgos de dañar los tejidos sanos. (Kirui *et al.*, 2010). Así, debido a la elevada transmitancia de la hemoglobina y el agua para la luz NIR, esta puede penetrar 10 cm en tejido submucoso y 4 cm en tejido nervioso o muscular (Melancon *et al.*, 2009).

Los agentes fototérmicos pueden estar constituidos por materiales inorgánicos, como materiales metálicos de oro, plata, platino (Dreaden *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2018), o nanomateriales basados en carbón como nanotubos de carbón o grafeno (Chen *et al.*, 2016). También pueden estar constituidos por materiales orgánicos (Li *et al.*, 2018), que si bien resultan más aptos en términos de biocompatibilidad y biodegradación, no resultan tan estables ni térmicamente eficientes como los materiales inorgánicos (Jung *et al.*, 2018).





De entre los diferentes agentes fototérmicos, las **nanopartículas de oro (AuNP)** son las más estudiadas debido a los avances en su síntesis y de la modificación de su superficie, así como de su alta estabilidad en condiciones biológicas. En la superficie de estas AuNP, los electrones pueden ser excitados si la absorción óptica de la nanopartícula es resonante con la longitud de onda de la luz incidente, lo que se denomina resonancia localizada de plasmón de superficie (LSPR) (Abadeer & Murphy, 2016; Liu *et al.*, 2019), siendo esta LSPR dependiente de la estructura (nanoesfera, *nanorods*, nanoestrellas) y tamaño de la AuNP (Chen *et al.*, 2013).

Estas propiedades, junto con la posibilidad de conjugar diversos compuestos, como anticuerpos para dirigir específicamente las AuNP hacia las células diana, enzimas, sondas fluorescentes o materiales supermagnéticos para detectar y rastrear las AuNP por fluorescencia o resonancia magnética respectivamente han convertido a las AuNP en potenciales agentes teragnósticos (diagnósticos y terapéuticos) (Bagheri *et al.*, 2018) (**Figura 4**).



**Figura 4. Esquema de las múltiples aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de oro (AuNP).** En función de la naturaleza del componente que se conjugue a estas AuNP, se obtendrán distintas aplicaciones biomédicas, tales como dirigir específicamente estas AuNP mediante anticuerpos hacia antígenos tumorales, conjugar moléculas tóxicas, o compuestos fluorescentes o magnéticos para monitorizar aspectos patológicos por imagen o resonancia magnética respectivamente. Adaptado de Bagheri *et al.*, 2018.

Las distintas posibilidades de bioconjugación, el LSPR y por tanto la longitud de onda óptima para el efecto fototérmico así como la distinta estrategia terapéutica a utilizar dependen enormemente de la estructura de la nanopartícula de oro sintetizada. Así, la elevada *ratio* superficie/volumen de las nanoestrellas hace que sean especialmente adecuadas para bioconjugación, mientras que otras estructuras, como nanocages, permiten almacenar compuestos terapéuticos en su interior, y ser liberados controladamente (Bagheri *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020) (**Figura 5**).

<b>AuNP</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Aplicación terapéutica</b>
 Nanocages	40×60nm	Compartimentación y liberación de agentes terapéuticos
 Nanoshell	50nm	Compartimentación de agentes terapéuticos y técnicas de imagen
 Nanostars	45-120 nm	Conjugación con anticuerpos y moléculas biológicas
 Nanorods	10×40 nm	Bioconjugación y difusión de partículas

**Figura 5. Esquema de distintas estructuras de nanopartículas de oro (AuNP)** en función de las distintas condiciones de producción, sus tamaños medios de síntesis y sus aplicaciones óptimas. Fuente: Bagheri *et al.*, 2018

## Introducción

Además de la estructura, el tamaño también interviene en la tasa de acumulación de las AuNP en los tumores, pues un tamaño elevado presenta una menor penetración en los tumores, pero un tamaño muy pequeño podría no ser eficaz, debido a la elevada tasa de aclaramiento tumoral y renal.

Además del ya descrito efecto fototérmico de las AuNP, estas presentan otras aplicaciones biomédicas, como una mayor eficacia de la radioterapia, debido al elevado número de electrones por átomo (Hainfeld *et al.*, 2008) o su utilización para obtener imágenes biomédicas con valor diagnóstico (Siddique *et al.*, 2020) gracias a la conjugación de sondas fluorescentes, materiales supermagnéticos, radionúclidos detectables para tomografía de emisión de positrones (PET) o mediante la obtención de la imagen fotoacústica (PAI), basada en que los tejidos producen ondas de sonido detectables al ser irradiados, a causa del calentamiento local y de la expansión. Así la irradiación de las AuNP produciría un doble efecto terapéutico y diagnóstico, fototerapia e imagen fotoacústica (Zhang *et al.*, 2016).

La aplicación terapéutica de la fototerapia para el cáncer colorrectal aún se encuentra en fase experimental. Así, se han funcionalizado nanopartículas mediante la unión de diversas moléculas marcadoras de antígenos tumorales epiteliales, como *nanobodies* frente a EGFR (El Hallal *et al.*, 2021) o scFv frente al antígeno tumoral GPA33 provocando una acumulación específica de nanopartículas en tumores colorrectales xenoinjertados en ratones, una disminución de su volumen y una necrosis del tejido tumoral tras su irradiación con NIR (Kirui *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2020).

### 1.4 Marcadores proteicos de cáncer colorrectal.

Los marcadores proteicos presentan varias ventajas sobre los marcadores genéticos a la hora de llevar a cabo el diagnóstico y el tratamiento frente al cáncer colorrectal. En primer lugar, el proteoma es mucho más dinámico que el genoma, constituyendo un reflejo más preciso del estado real del tumor. Además, los marcadores proteicos que son secretados al torrente sanguíneo pueden ser fácilmente detectados por métodos no invasivos y basados en anticuerpos, por lo que no generan dificultades en los pacientes (Veenstra *et al.*, 2005). Además, los marcadores proteicos que permanecen anclados a la membrana celular constituyen antígenos asociados a tumor (TAAs, de las siglas en inglés *Tumor Associated Antigens*), y pueden ser utilizados para el desarrollo de inmunoterapia (Kavousipour *et al.*, 2017).

Como se ha indicado anteriormente, **CEA**, también conocido como CEACAM5, pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y constituye un biomarcador ampliamente utilizado

para el diagnóstico del cáncer colorectal (Labianca *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2019), así como para el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos (Ibáñez-Pérez *et al.*, 2019; Lázaro-Gorines *et al.*, 2019). Descrito originalmente como una oncoproteína fetal, presenta una baja expresión en tejidos sanos de tipo epitelial, como el colon, estómago, próstata, (Prall *et al.*, 1996) y en todos casos su expresión está limitada a la superficie apical, anclada a la membrana celular por glicofosfatidil inositol (GPI). No obstante, en las células tumorales, la expresión de CEA aparece deslocalizada por toda la membrana, contribuyendo a su secreción al torrente sanguíneo (Kinugasa *et al.*, 1994; Sørensen *et al.*, 2016), y permitiendo su detección como valor diagnóstico. Pese a ello, CEA representa un antígeno adecuado para el diseño de agentes inmunoterapéuticos, debido a su rápida tasa de internación tras unirse a su anticuerpo, así como a su elevada vida media, de entre 10 y 16 horas (Schmidt *et al.*, 2008) (**Figura 6**).

**GPA33** es un antígeno de membrana sobreexpresado en el 95% de casos de cáncer colorrectal primario y metastásico, mientras que está prácticamente ausente en otros tipos de cáncer y en tejidos normales (Catimel *et al.*, 1996; Heath *et al.*, 1997). Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas relacionadas con las proteínas de uniones estrechas (JAM) que están involucradas en la proliferación celular (Goetsch *et al.*, 2013), por lo que se cree que GPA33 podría estar implicado en el desarrollo y mantenimiento de la mucosa del intestino delgado durante el desarrollo embrionario (Pereira-Fantini *et al.*, 2010).

Además, a diferencia de otros antígenos de cáncer colorrectal, como CEA, que son secretados al medio extracelular, GPA33 permanece de manera constitutiva en la membrana celular, siendo rápidamente internado tras la unión del anticuerpo correspondiente y la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Ackerman *et al.*, 2008).

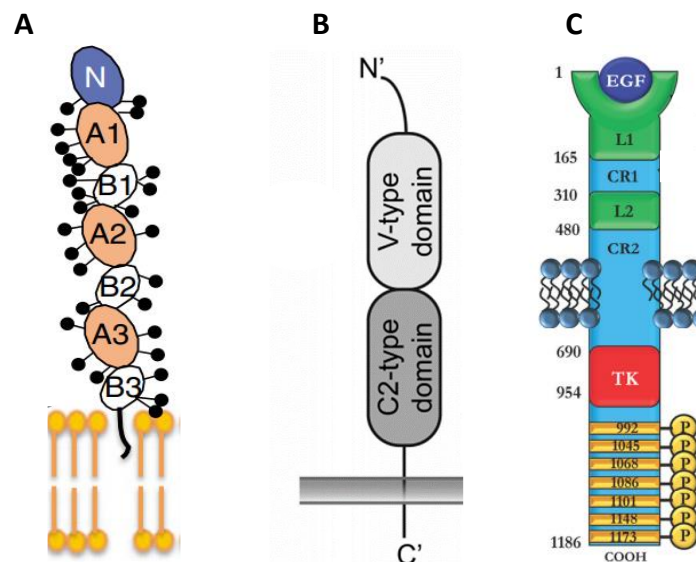
Por ello, GPA33 se postula como un candidato perfecto para el diseño de anticuerpos e inmunotoxinas dirigidas frente a él. Así, se ha diseñado un anticuerpo completamente humanizado frente a este antígeno (Ritter *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005), que se está utilizando conjugado con distintos isótopos radiactivos (Almqvist *et al.*, 2006; Panjideh *et al.*, 2008) así como su correspondiente scFv (scFvA33), para permitir una mayor penetración en el tumor a causa de su menor tamaño (Damasceno *et al.*, 2009) (**Figura 6**).

**EGFR**, también denominado ErbB1, es un receptor tirosina kinasa perteneciente a una familia de 4 receptores: ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Son glicoproteínas transmembrana que solo pueden ser activadas mediante homo o heterodimerización tras la unión de su ligando, EGF o TGF- $\alpha$  (Simon & FitzGerald, 2016). Su estructura típica consiste en un dominio de unión al ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con distintos residuos de tirosina que se fosforilan

## Introducción

tras la activación, activando a su vez las vías de señalización RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT y JAK/STAT3 cumpliendo un papel importante en la regulación del crecimiento, supervivencia y diferenciación de un gran número de diferentes tipos celulares (Vecchione *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2020).

A causa de este papel destacado en la proliferación, supervivencia y angiogénesis, la sobreexpresión de EGFR confiere una gran ventaja a las células tumorales. Concretamente, EGFR se encuentra sobreexpresado en gran cantidad de tumores de origen epitelial, como en el 15-30% de cánceres de mama, el 60% de cánceres de pulmón y en el 25-77% de cánceres colorrectales (Roskoski, 2014). Aproximadamente, el 80% de los cánceres colorrectales sobreexpresa EGFR, mayoritariamente aquellos que se desarrollan en el lado izquierdo del colon, sobreexpresión que se relaciona con una menor supervivencia y un mayor riesgo de metástasis (Figura 6).



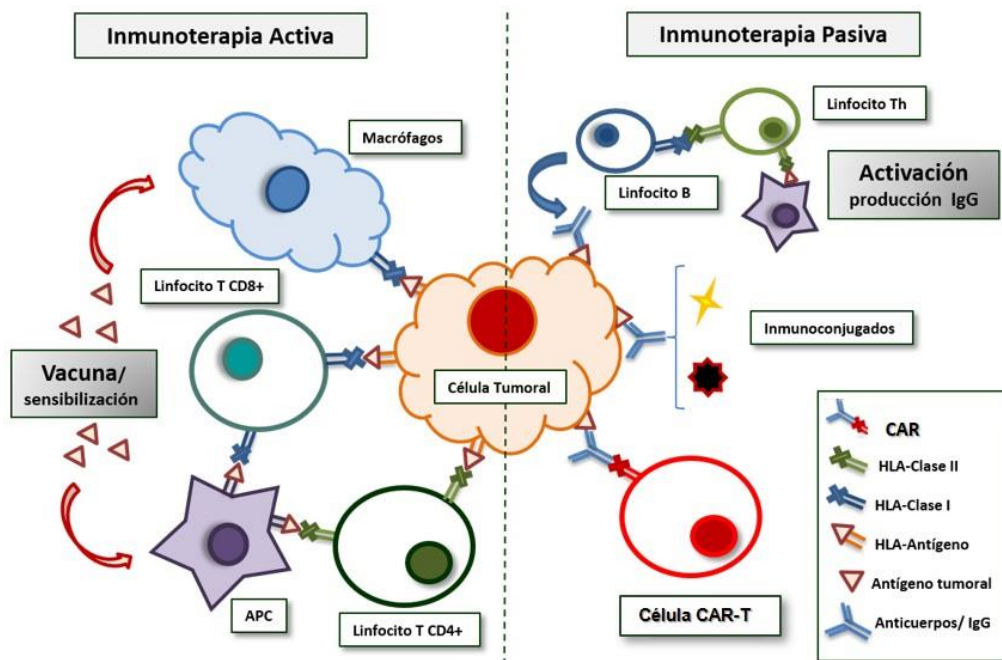
**Figura 6. Esquemas de las estructuras proteicas de CEA (A), GPA33 (B) y EGFR (C).** En A, se muestran los 7 dominios tipo inmunoglobulina (N es un dominio variable tipo inmunoglobulina, y el resto son dominios constantes tipo inmunoglobulina) que conforman CEA, así como el GPI que lo mantiene anclado a la membrana celular externa. Adaptado de Beauchemin & Arabzadeh, 2013. En B se muestra el dominio variable y el dominio constante tipo inmunoglobulina que constituye GPA33. Adaptado de Murer *et al.*, 2020. En C se muestran los sitios de unión al ligando (L1 y L2) así como el dominio tirosina kinasa (TK) de EGFR. Adaptado de Simon & FitzGerald, 2016.

## 2. Inmunoterapia.

En la actualidad, la terapia frente al cáncer basada en métodos no específicos, como quimioterapia, radioterapia o cirugía se va sustituyendo por tratamientos específicos, basados en la inmunoterapia, debido a que estos actúan específicamente en el tumor y en

el ambiente tumoral, sin dañar las células sanas, reduciendo la toxicidad y los potenciales efectos secundarios (Kimiz-Gebologlu *et al.*, 2018).

La inmunoterapia es el conjunto de técnicas y aplicaciones terapéuticas basadas en la utilización y activación general del sistema inmune del propio paciente o en el empleo de alguno de sus componentes, específicamente dirigidos frente a antígenos. La inmunoterapia puede clasificarse en inmunoterapia pasiva, si se basa en la transferencia de moléculas o células inmunitarias generadas *in vitro*, o inmunoterapia activa, si busca la activación *in vivo* del sistema inmune del paciente. La inmunoterapia pasiva comprende anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos tumorales o terapia de células adoptivas, entre otros; mientras que la inmunoterapia activa consistiría en anticuerpos inmunomoduladores, activadores de la respuesta inmune o vacunas frente al cáncer, entre otros (Johdi & Sukor, 2020) (**Figura 7**).



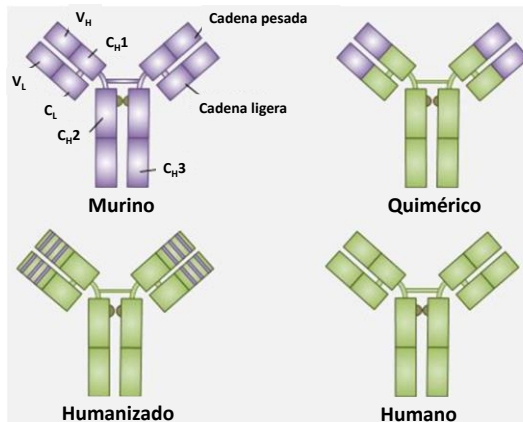
**Figura 7. Esquema de los distintos tipos de inmunoterapia** utilizados actualmente, clasificándolos en inmunoterapia activa o pasiva. Adaptado de Ruiz-de-la-Herrán, 2021.

## 2.1. Anticuerpos monoclonales

Dentro de la inmunoterapia pasiva específica destaca la utilización de anticuerpos monoclonales (Suzuki *et al.*, 2015; Tsumoto *et al.*, 2019) dirigidos frente a dianas específicas de las células tumorales, como los antígenos asociados o específicos de tumor (TAA o TSA), permitiendo su detección y eliminación por el sistema inmune, o bien

## Introducción

bloqueando la función biológica de su diana molecular, normalmente asociada al desarrollo, invasión o metástasis tumoral.



**Figura 8. Esquema de los distintos tipos de anticuerpos monoclonales (mAbs) en función de su procedencia.** En morado aparecen los componentes de origen murino, y en verde aparecen los elementos de origen humano. Adaptado de Jin *et al.*, 2021.

La utilización de los anticuerpos monoclonales alcanzó un gran desarrollo gracias a la tecnología del hibridoma, avance fundamental en el campo de la biomedicina, que permitió la generación de grandes cantidades de anticuerpos recombinantes específicos producidos por un único clon celular derivado de un único linfocito B, específicos de un epítipo individual (Kohler & Milstein, 1975), permitiendo el desarrollo de las terapias basadas en anticuerpos gracias a la optimización en su producción (Hoogenboom, 2005).

Sin embargo, la aplicación clínica de esta primera generación de anticuerpos monoclonales presentó importantes limitaciones, en parte por su origen murino. Así, los primeros mAbs desarrollados como agentes terapéuticos presentaban una elevada inmunogenicidad, por lo que los pacientes desarrollaban anticuerpos humanos anti-ratón, disminuyendo su vida media en suero y su eficacia terapéutica (Klee, 2000).

El desarrollo de nuevas aproximaciones experimentales basadas en la tecnología del DNA recombinante y la ingeniería genética, ha permitido solventar en gran medida los problemas de inmunogenicidad, reemplazando los anticuerpos monoclonales murinos por otros quiméricos, humanizados o directamente de origen humano (Levene *et al.*, 2005; Chames *et al.*, 2009; Mellman *et al.*, 2011; Simpson & Caballero, 2014) (**Figura 8**).

La eficacia terapéutica de los mAbs se basa en 3 mecanismos principales:

1. Inhibición de los receptores tras la unión de los mAbs, con el consiguiente bloqueo de las vías de señalización utilizadas por las células tumorales para su división y angiogénesis.
2. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), que se pone en marcha tras la unión de los mAbs a los antígenos tumorales, y las interacciones entre la región Fc y receptores Fcγ presentes en células NK, macrófagos y otras células inmunes. El entrecruzamiento de

estos receptores Fc $\gamma$  provoca la liberación de agentes citotóxicos, como perforinas y granzimas por parte de las células inmunes a las células tumorales.

3. La citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC), desencadenada por la interacción entre Fc y C1q, el primer componente en la vía del complemento, provoca mecanismos de citotoxicidad, tanto celulares como no celulares.

Nº	Nombre comercial	Nombre genérico	Diana	Año de aprobación por la FDA	Cáncer
1	Bavencio	Avelumab	PD-L1	2017	Carcinoma de células de Merkel metastásico
2	Imfinzi	Durvalumab	PD-L1	2017	Carcinoma urotelial metastásico
3	Lartruvo	Olaratumab	PDGFR- $\alpha$	2016	Sarcoma
4	Darzalex	Daratumumab	CD38	2015	Mieloma múltiple
5	Empliciti	Elotuzumab	SLAMF7	2015	Mieloma múltiple
6	Portrazza	Necitumumab	EGFR	2015	Cáncer de pulmón NSC
7	Tecentriq	Atezolizumab	PD-L1	2016	Cáncer de pulmón NSC
8	Opdivo	Nivolumab	PD-1	2015	Cáncer de pulmón NSC, Enfermedad de Hodgkin, melanoma
9	Unituxin	Dinutuximab	GD2	2015	Neuroblastoma
10	Blincyto	Blinatumomab	CD19	2015	Linfoma

**Tabla 1. Los 10 mAbs principales aprobados por la FDA** para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Se indican los nombre comerciales y genéricos, el antígeno específico al que están dirigido, cuándo fueron aprobados por la FDA y frente al tipo de cáncer que son eficaces. Adaptado de Johdi & Sukor 2020.

Es de destacar que estas funciones efectoras deberían ser atenuadas cuando los mAbs están dirigidos a las propias células inmune, para bloquear los *checkpoints*, mientras que deberían ser mejoradas cuando la diana de los mAbs son células tumorales o patológicas. Desde el primer mAb aprobado por la FDA para inmunoterapia del cáncer, Rituximab, dirigido al antígeno CD20 para el tratamiento de linfoma de células B no-Hodgkin, en la actualidad existe una amplia gama de mAbs dirigidos frente a distintos antígenos tumorales (**Tabla 1**).

No obstante, el diseño y optimización de mAbs terapéuticos frente al cáncer todavía plantea numerosos desafíos: la principal característica a optimizar en los mAbs son la especificidad y la afinidad de unión al antígeno, la mayor estabilidad conformacional (plegamiento) y coloidal (solubilidad) de los mismos, así como desarrollar anticuerpos multiespecíficos, que reconozcan distintos antígenos tumorales o distintos epítomos del mismo antígeno o diseñar inmunoconjugados, como las inmunotoxinas (Tiller & Tessier, 2015). Por todo ello,

## Introducción

surgió un nuevo campo de investigación dirigido a la ingeniería de anticuerpos, con el fin de diseñar y producir una nueva generación de anticuerpos monoclonales o variantes optimizadas de los mismos, no sólo para solventar los problemas de los primeros, sino para incorporar nuevas propiedades de interés para el diagnóstico o el tratamiento.

### 2.2 Ingeniería de anticuerpos.

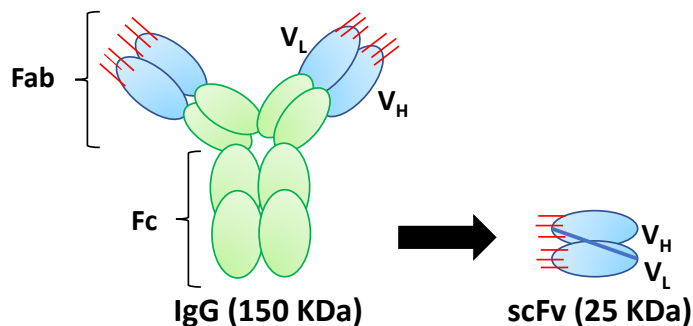
El conocimiento adquirido sobre la estructura y función de los mAbs y los avances realizados en las técnicas de ingeniería genética han permitido el desarrollo de una segunda generación de anticuerpos monoclonales, en la que se incluyen fragmentos de anticuerpo, anticuerpos quiméricos y humanizados, y anticuerpos de formato multivalente. Estos nuevos diseños de anticuerpo presentan numerosas ventajas clínicas, como una mayor penetración tumoral, una eliminación de la sangre más rápida, una menor retención inespecífica en tejidos sanos, y una menor inmunogenicidad (Biteghe *et al.*, 2020; Elshiaty *et al.*, 2021).

#### 2.2.1. Fragmento variable de cadena única (scFv).

El fragmento variable (Fv) es la unidad más pequeña de la molécula de inmunoglobulina con capacidad de unión específica al antígeno. Un anticuerpo con formato scFv consiste en las regiones variables de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) unidos por un *linker* peptídico flexible (Ahmad *et al.*, 2012). (Figura 9).

La longitud y composición de aminoácidos del *linker* peptídico es fundamental para el correcto plegamiento del scFv. Así, se ha estimado que la longitud óptima del *linker* debería ser de 35 Å, y su composición incluir aminoácidos hidrofílicos, fundamentalmente repeticiones de Gly y Ser para permitir el correcto plegamiento y flexibilidad de los dominios

marcadores (Huston *et al.*, 1991).



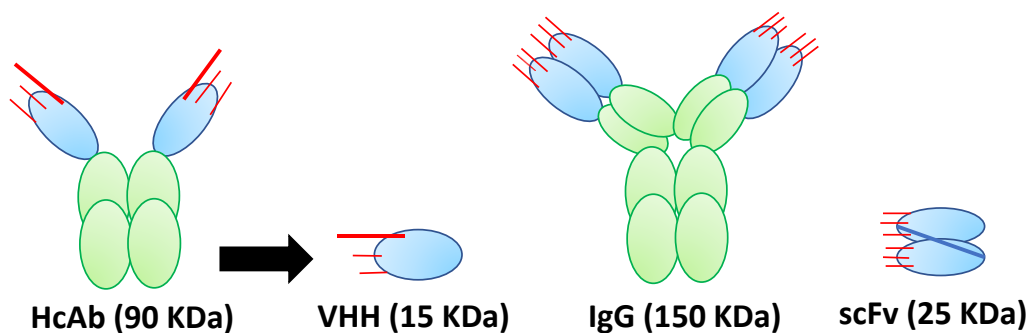
**Figura 9. Esquema comparativo entre un mAb completo, de 150 kDa, y un scFv, de 25 kDa.** En azul se representan los dominios variables, en verde los dominios constantes, y en rojo los CDR. El scFv presenta la misma especificidad que el mAb debido al mantenimiento de los 6 CDR, 3 de  $V_L$  y 3 de  $V_H$ .

En la actualidad se han diseñado numerosos scFv frente a antígenos tumorales (Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019) y virus (Ahangarzadeh *et al.*, 2020), lo que indica que

este formato de scFv tiene potencial como terapia médica y aplicaciones diagnósticas.

### 2.2.2. Nanobodies (VHH).

El descubrimiento de la existencia de anticuerpos constituidos únicamente por dos cadenas pesadas (HcAbs) en camélidos (Hamers-Casterman *et al.*, 1993) y peces cartilaginosos (Greenberg *et al.*, 1995) dio lugar a una nueva generación de anticuerpos terapéuticos basados en estos anticuerpos de dominio único, denominados VHH o *nanobody*, constituyéndose como las unidades de menor tamaño que mantienen la capacidad de unión específica y reconocimiento antigénico. La especificidad de un *nanobody* está determinada por 3 CDR, presentando el CDR3 una mayor longitud comparado con los dominios V<sub>H</sub> de humanos, permitiendo a los *nanobodies* interactuar con epítopos de otra manera inaccesibles en los antígenos (Yang & Shah, 2020). (Figura 10).



**Figura 10. Esquema de los distintos tipos de anticuerpos y derivados.** De izquierda a derecha se representa: HcAb (anticuerpos de camélidos de cadena pesada), VHH (*nanobody*), IgG (anticuerpo completo de origen humano) y scFv (fragmento variable de cadena única). Se representan los dominios variables (azul), los dominios constantes (verde) y los CDR (rojo). En la parte inferior se indican sus respectivos tamaños moleculares.

Entre las principales ventajas de los *nanobodies* destaca su menor tamaño (15 KDa), lo que les permitiría una mayor penetración en tumores sólidos, permitiendo en algunos casos el paso a través de la barrera hematoencefálica (Muruganandam *et al.*, 2002). Su menor tamaño también les permitiría la eliminación renal del torrente sanguíneo, pues están por debajo del umbral de filtración glomerular (60 KDa). Esto implica una menor vida media circulando en el torrente sanguíneo (< 2 horas), lo cual sería una ventaja en el caso de *nanobodies* conjugados con agentes tóxicos, o *nanobodies* marcados para diagnóstico por imágenes pues se reduciría su acumulación en tejidos así como toxicidades inespecíficas. No obstante, sería una desventaja para su aplicación en enfermedades inflamatorias o procesos tumorales, que podría ser solventado mediante regímenes de administración más continuados (Moradi *et al.*, 2020).

Los *nanobodies* también presentan una elevada termoestabilidad, manteniendo su funcionalidad a 90°C (Van der Linden *et al.*, 1999), tolerando elevadas presiones (500-700

## Introducción

MPa), elevadas concentraciones de agentes desnaturizantes (cloruro de guanidinio 2-3M, urea 6-8M) (de Vos *et al.*, 2013) y pH extremos, lo que les permitiría su administración terapéutica por vía oral (Harmsen & Haard, 2007). Esta estabilidad es explicada porque la renaturalización del *nanobody* sólo implica el plegamiento del dominio variable, mientras que los anticuerpos convencionales requieren además la asociación de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>.

Además, la administración terapéutica de los *nanobodies* no produce rechazo inmunológico, ni generación de anticuerpos anti-VHH, ni proliferación de células T, ni liberación de citoquinas, debido

Nombre de VHH	Diana celular
Anti-EGFR Nb	EGFR
CONAN-1	EGFR
EGa1-PEG-NPs	EGFR
A-PTX-SF-NPs	EGFR
Nb-Modified DOX-PM	EGFR
Anti-EGFR armed liposomes	EGFR; IGF-1R
Biespecific anti-EGFR-anti-TCR VHH	EGFR; V9V2-Tcell
Nb 139; Nb3	P53
ZFR5	VEGF
VA12	VEGF-A
3VGR19	VEGFR2
NTV1; NTV2	VEGFR2
Anti-VEGFR2-PE38	VEGFR2

**Tabla 2. Resumen de la inmunoterapia actual basada en *nanobodies* frente a cáncer colorrectal**, incluyendo *nanobodies* asociados a nanopartículas, *nanobodies* biespecíficos e inmunotoxinas basadas en *nanobodies*. Adaptado de Moradi *et al.*, 2020.

posiblemente a la ausencia de regiones Fc, a la elevada homología de secuencia con los dominios V<sub>H</sub> humanos, y a la ausencia de agregación a causa de su elevada estabilidad (Coppitiers *et al.*, 2006).

La tecnología del DNA recombinante, y el pequeño tamaño de las secuencias de los *nanobodies* ha permitido su optimización, en algunos casos mediante la fusión de un dominio Fc humano para desencadenar la ADCC y la CDC tras

la unión al antígeno (de Buck *et al.*, 2013) o diseñando formatos diméricos o triméricos que presentan una mayor avidéz por el antígeno (Moradi *et al.*, 2020).

Desde la primera implementación terapéutica de un *nanobody* frente al EGFR, inhibiendo el crecimiento tumoral *in vivo* (Roovers *et al.*, 2007), las propiedades únicas de los *nanobodies*, así como la posibilidad de optimizarlos han permitido el diseño numerosos formatos de inmunoterapia frente a cáncer colorrectal. (**Tabla 2**).

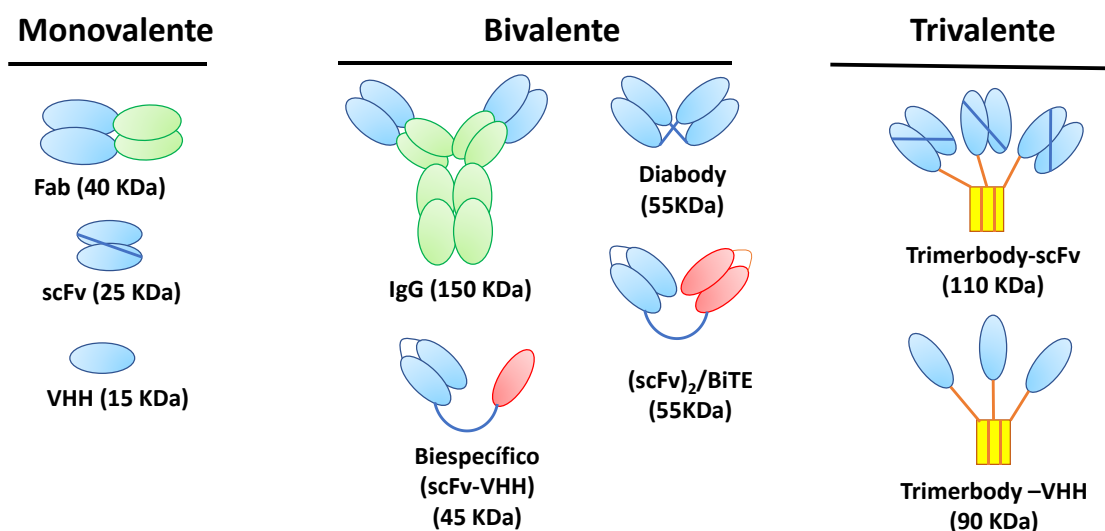
### 2.2.3 Formatos multiméricos.

En general, los fragmentos scFv muestran un rápido aclaramiento del torrente sanguíneo, así como poca capacidad de retención en tumores a causa de su pequeño tamaño, y de

sus capacidades de unión monovalentes. Además, la presencia de múltiples factores y distintos mecanismos de señalización implicados en la patogénesis de las enfermedades, así como la resistencia a monoterapias disminuye la eficacia terapéutica de los mAb (El-Sayes *et al.*, 2021).

Para evitar este problema, se han desarrollado técnicas de multimerización para constituir anticuerpos multiméricos, aumentando su valencia (sitios de unión al antígeno) como su especificidad (epítomos distintos que son capaces de reconocer un anticuerpo) permitiendo una mayor vida media en el torrente sanguíneo al aumentar su peso molecular, una mayor retención en los tumores a causa de su multivalencia y del aumento de su afinidad funcional o avidéz y una mayor versatilidad, al poder combinar distintos fragmentos de anticuerpos con distintas especificidades (Cuesta *et al.*, 2010) (**Figura 11**).

Así, se han desarrollado anticuerpos biespecíficos, que son capaces de reconocer dos antígenos diferentes en dos tipos celulares distintos, dos antígenos diferentes sobre la misma célula o dos epítomos distintos sobre un mismo antígeno, permitiendo una mayor versatilidad en la unión y en el bloqueo de distintas vías de señalización patológicas. Además, los costes de producción de un anticuerpo biespecífico son menores que los de sus correspondientes mAbs utilizados como un tratamiento combinado (Ahamadi-Fesharaki *et al.*, 2019).



**Figura 11. Esquema de distintos formatos de anticuerpos multiméricos** clasificados según sus distintas valencias y especificidad. Se indica en azul o en rojo las distintas especificidades de las regiones variables de los anticuerpos, en verde los dominios constantes, y en amarillo el dominio de trimerización del colágeno XVIII (TIE<sup>XVIII</sup>).

Un tipo de anticuerpo biespecífico es el *bispecific T cell engager* (BiTE), que consiste en dos scFv unidos por un *linker* peptídico, uno de los cuales se une a CD3 en las células T,

## Introducción

y el otro se une a un antígeno patológico o tumoral. La unión simultánea de BiTE a la célula T y a la célula tumoral provoca la activación de la célula T, la liberación de citoquinas, con sus consiguientes efectos sobre otras células inmunes y la secreción de perforina y granzima B, ocasionando la apoptosis de la célula tumoral (Zhou *et al.*, 2021).

Otro tipo de anticuerpo biespecífico sería el *diabody*, constituido por dos cadenas polipeptídicas, una de las cuales contiene el V<sub>H</sub> del anticuerpo A junto con el V<sub>L</sub> del anticuerpo B, mientras que la otra cadena presenta el V<sub>H</sub> del anticuerpo B conectado con el V<sub>L</sub> del anticuerpo A (Ahamadi-Fesharaki *et al.*, 2019).

En la actualidad, se están utilizando los anticuerpos biespecíficos para tratar un elevado número de patologías: infecciones víricas, mediante el empleo de anticuerpos biespecíficos dirigido a los antígenos del VIH gp41 y gp120 (Pham & Mesplède, 2018); infecciones bacterianas, mediante anticuerpos biespecíficos dirigidos frente a distintos factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (DiGiandomenico *et al.*, 2018), o diversos tipos de cáncer, como el cáncer colorrectal, desarrollando BiTEs específico frente a CEA (Pishvaian *et al.*, 2016) o cánceres hematológicos, mediante el empleo de un BiTE específico frente a CD19 para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda (Kantarjian *et al.*, 2017).

En ocasiones no se utilizan *linkers* peptídicos para unir los distintos fragmentos de anticuerpos entre sí, sino dominios de oligomerización de otras proteínas. Así, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), fusionado al extremo C-terminal de un scFv forma una estructura homotrimérica que mantiene tanto las funciones efectoras de TNF $\alpha$  como el reconocimiento antigénico de scFv (Halin *et al.*, 2003). También se ha utilizado la fusión de fragmentos scFv con el dominio de multimerización de la proteína supresora de tumores p53, constituyendo anticuerpos tetraméricos (Deyeb & Lebedenko, 2008).

Además, se ha utilizado el dominio de trimerización (TIE<sup>XVIII</sup>) N-terminal del dominio no colagenoso (NC1) del colágeno XVIII para, tras la fusión al extremo C-terminal de un scFv, constituir un anticuerpo trimérico, o *trimerbody* (110 KDa) (Blanco-Toribio *et al.*, 2014; Mikkelsen *et al.*, 2019; Rios *et al.*, 2019). Este dominio de trimerización presenta una elevada estabilidad tanto en el microambiente tumoral rico en proteasas, como tras su incubación en suero en ensayos de estabilidad, lo que facilitaría su aplicación terapéutica.

El modelo de *trimerbody* presentaría en condiciones nativas una estructura en forma de trípode, con los dominios scFv localizados en los extremos del brazo, requiriendo para su funcionalidad que los dominios scFv mantengan una flexibilidad suficiente para permitir la adopción de distintas conformaciones que favorezcan la unión al antígeno. En este sentido se ha demostrado que un *linker* peptídico de 21 residuos, que supone una longitud de 80 Å, permite dicha flexibilidad (Cuesta *et al.*, 2010).

En estudios *in vivo* utilizando un *trimerbody* frente al antígeno tumoral de cáncer colorrectal, CEA, se observó una mayor retención y una mayor vida media en el torrente sanguíneo que las de su correspondiente monómero, un scFv frente a CEA, mostrando que la mayor masa molecular (superior al umbral de filtración glomerular) y una mayor avidéz a consecuencia de su trivalencia son importantes para una mayor retención tumoral, y un menor aclaramiento del torrente sanguíneo (Rios *et al.*, 2019).

### 3. Inmunotoxinas

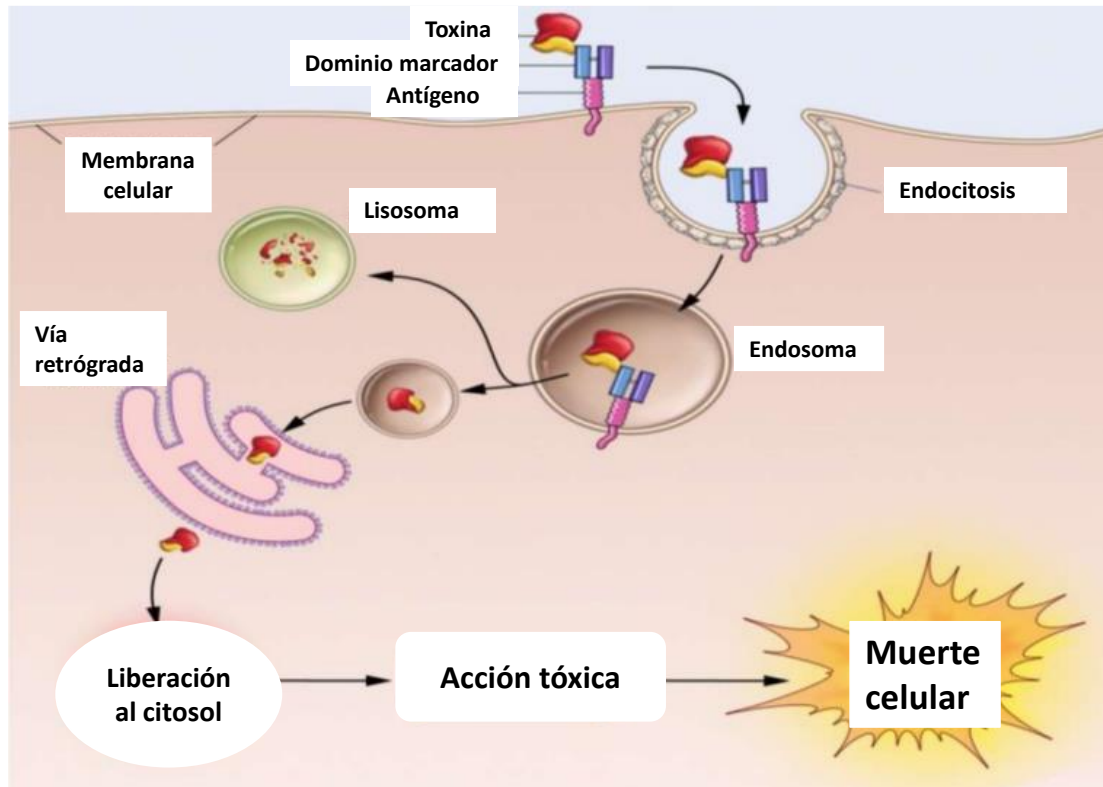
Desde el concepto de “bala mágica”, propuesto por Paul Ehrlich en 1970, en términos de una molécula tóxica capaz de dirigirse específicamente a determinados receptores para el tratamiento de enfermedades parasitarias, pasando por la propuesta del término “inmunotoxina” de Thorpe al desarrollar un anticuerpo antilinfocito conjugado con la toxina diftérica para la eliminación de células tumorales linfoblastoides, el concepto de inmunoconjugado ha supuesto un enorme éxito a la hora de dirigir específicamente agentes quimioterapéuticos o radiactivos frente a distintas enfermedades, tanto tumorales como infectocontagiosas (Fercher *et al.*, 2018).

Así, las inmunotoxinas son una clase de inmunoconjugados, constituidas por un dominio marcador, que dirige específicamente al dominio tóxico, normalmente una toxina de naturaleza proteica a la célula tumoral diana, ocasionando la muerte de esta.

El dominio marcador, diseñado para la unión específica a un antígeno expresado selectiva o mayoritariamente en las células tumorales, consiste principalmente en un anticuerpo o derivado de él, aunque también se usan otros ligandos específicos de receptor, como citoquinas (IL-2) o factores de crecimiento (TGF $\alpha$ ) (Chaudhary *et al.*, 1987; Pastan *et al.*, 2007; Fleming & Ho, 2020).

En cuanto al dominio tóxico, inicialmente incluía proteínas tóxicas procedentes de bacterias, como la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) o la toxina diftérica (DT) o derivadas de plantas, como la ricina, la saporina o la gelonina (Polito *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2021). Posteriormente se incluyeron toxinas de diferentes orígenes, como las ribotoxinas fúngicas (Goyal & Batra, 2000; Carreras-Sangrá *et al.*, 2012; Lázaro-Gorines *et al.*, 2019) o de origen humano como las RNasas humanas (Jordaan *et al.*, 2018).

## Introducción



**Figura 12. Esquema del mecanismo de actuación de las inmunotoxinas.** Tras la unión del dominio marcador al antígeno de superficie, se produciría la endocitosis de la inmunotoxina en los endosomas tempranos. Posteriormente puede ser degradada por los lisosomas, o continuar por la vía retrógrada a través del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático hasta que finalmente el dominio tóxico sea traslocado al citosol. Por último, el dominio tóxico en el citosol llevará a cabo su acción tóxica provocando la muerte de la célula diana.

El mecanismo de acción de las inmunotoxinas implica tres etapas: 1) La unión al receptor diana gracias al dominio marcador, y la consiguiente internación de la inmunotoxina en la célula diana mediante un proceso de endocitosis mediado por receptor. 2) La liberación del dominio tóxico de los endosomas tempranos tras la internación, y su acceso al citosol celular; y 3) la muerte de la célula diana como consecuencia de la actividad enzimática del dominio tóxico (Kim *et al.*, 2020) (**Figura 12**).

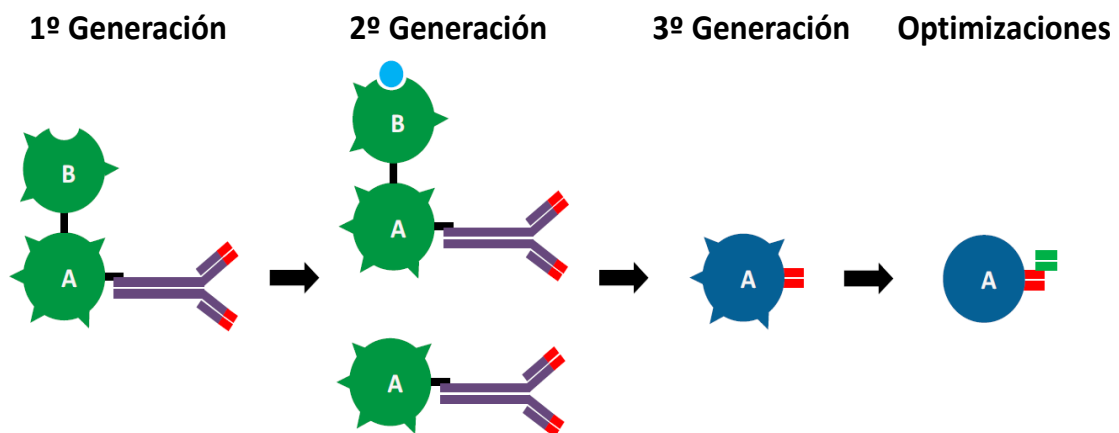
### 3.1. Evolución de las inmunotoxinas.

La primera generación de inmunotoxinas se desarrolló a comienzos de los años 70, estando las inmunotoxinas constituidas por una toxina unida químicamente a un anticuerpo completo (**Figura 13**). La mayoría de las toxinas de bacterias y plantas están constituidas por 2 subunidades, una subunidad de unión a la superficie celular, y una subunidad enzimática o tóxica propiamente dicha (Akbari *et al.*, 2017). Uno de los problemas principales en estos primeros diseños fue la utilización de toxinas completas de diferente origen, que incluyen en su estructura la correspondiente subunidad de unión a la superficie

celular, lo que supuso la aparición de toxicidades inespecíficas. Otras dificultades fueron la heterogeneidad de productos tras la conjugación entre el dominio marcador y el dominio tóxico a consecuencia de la inestabilidad del *linker* que las unía, así como una elevada inmunogenicidad (Moolten *et al.*, 1970; Rust *et al.*, 2017).

A partir de mediados de 1970 se desarrolló la segunda generación de inmunotoxinas, cuya principal mejora fue la utilización de toxinas que bloqueaban o carecían de la subunidad de unión a la superficie celular (sólo estaban constituidas por la subunidad enzimática), con lo que se redujo la toxicidad inespecífica, y permitió el desarrollo del primer ensayo clínico en 1986, utilizando la subunidad A de la ricina unida a un anticuerpo anti linfocito T (T101) en el tratamiento de la leucemia. No obstante, continuaron los problemas de heterogeneidad del inmunoconjugado y de la inmunogenicidad, pues tanto el anticuerpo como la toxina eran de origen no humano (Moolten *et al.*, 1976).

Por último, la tercera generación de inmunotoxinas utilizó las técnicas de ingeniería molecular para generar inmunotoxinas recombinantes, constituidas por la unión de anticuerpos, o derivados suyos de menor tamaño (scFv, VHH) a toxinas o subunidades de las mismas, permitiendo de esta manera una mayor homogeneidad en el producto de la expresión recombinante de la inmunotoxina, así como un ajuste del tamaño final de la inmunotoxina para una mayor penetración en tumores sólidos (Li *et al.*, 2017).



**Figura 13. Esquema de la evolución en el diseño de inmunotoxinas.** La primera generación de inmunotoxinas consistía en la fusión de anticuerpos completos con toxinas completas, constituidas tanto por la subunidad enzimática (A) como por la subunidad de unión a las células (B). La segunda generación eliminó o bloqueó la subunidad B de las toxinas. La tercera generación consistió en la expresión recombinantes de inmunotoxinas, con fragmentos de anticuerpos. Las optimizaciones incluyen eliminación de epítopos inmunogénicos en las toxinas, así como dominios marcadores biespecíficos o multiméricos. Adaptado de Rust *et al.*, 2017.

## Introducción

Además, la producción de inmunotoxinas recombinantes, gracias a las técnicas de ingeniería genética y su expresión heteróloga, ha permitido la obtención de nuevos diseños optimizados incluyendo toxinas humanizadas sin epítopos antigénicos, introduciendo dominios peptídicos que faciliten un mayor procesamiento y liberación al citosol, o modificando el dominio marcador para que reconozca distintos antígenos en la superficie celular (**Figura 13**).

### 3.2. Optimización de Inmunotoxinas

Pese a que la evolución en el diseño de inmunotoxinas ha supuesto un gran avance en su potencial aplicación terapéutica frente al cáncer, en la actualidad hay algunos aspectos que continúan dificultando su eficacia como herramientas terapéuticas, entre los que se incluyen:

- Aparición de toxicidades inespecíficas.

La aparición de toxicidades inespecíficas es debida tanto al uso de toxinas completas, pues su subunidad de unión se une a las fracciones lipídicas y glicosiladas presentes de manera ubicua en numerosos receptores de células y tejidos humanos; como al uso de dominios marcadores que estén dirigidos a antígenos que, si bien pueden estar sobreexpresados en células tumorales, también se expresan en tejidos y células sanas.

El principal síntoma clínico de esta toxicidad es el síndrome de fragilidad vascular o VLS (*Vascular Leak Syndrome*), causado por la acción inespecífica de las toxinas, principalmente de las toxinas de *Pseudomonas*, de la toxina diftérica y de la ricina, en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, provocando su muerte celular, y la consiguiente infiltración de fluidos del sistema circulatorio al espacio intersticial, provocando edema, hipoalbuminemia, infiltraciones pulmonares e hipotensión (Alewine *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2020). Además, pueden producirse alteraciones por toxicidad cardíaca, renal o hepática, siendo esta última la responsable de la suspensión terapéutica de la inmunotoxina Gemtuzumab ozogamicina (Appelbaum & Bernstein, 2017).

Para minimizar estas toxicidades inespecíficas, se modificaron las toxinas utilizadas, mutando, bloqueando o eliminando su subunidad de unión (constituyendo la 2ª generación de inmunotoxinas) o seleccionando dominios marcadores para antígenos tumorales que presenten una expresión muy diferencial entre el tejido tumoral y los tejidos sanos. Además, el antígeno seleccionado debería ser internado rápidamente tras la unión de la inmunotoxina, para que pueda llevar a cabo su acción citotóxica (Antignani *et al.*, 2020).

- Liberación al citosol.

Tras la unión de la inmunotoxina a su antígeno correspondiente, y su internación mediante endocitosis, el dominio tóxico tiene que ser traslocado al citosol para llevar a cabo su acción citotóxica. No obstante, una elevada porción de las inmunotoxinas endocitadas, y presentes en las vesículas endocíticas son degradadas en los lisosomas, sin haber llevado a cabo su acción tóxica, o bien recicladas por exocitosis al medio extracelular por lo que la liberación del dominio tóxico desde los endosomas al citosol constituye un factor clave para la eficacia terapéutica de las inmunotoxinas.

Algunas toxinas, como la toxina del ántrax, presentan un dominio de traslocación que les permite la liberación de los endosomas al citosol en respuesta a una bajada del pH endosomal; mientras que otras, como la toxina diftérica o la ricina, son transportadas al citosol vía el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, en lo que se conoce como la vía retrógrada (Williams & Tsai, 2016; Kim *et al.*, 2020).

Otras estrategias para facilitar la liberación de la toxina al citosol desde los endosomas es la administración conjunta de la inmunotoxina con potenciadores de liberación endosomal, como citolisinas formadoras de poros de la membrana (Pirie *et al.*, 2013), o agentes desestabilizadores de la membrana endosomal, como aminas lisosomotrópicas, que alteran la integridad de la membrana (Fuchs *et al.*, 2016).

Por último, se han diseñado inmunotoxinas con sitios de reconocimiento específicos de proteasas presentes en las membranas de los endosomas, como la furina. La furina es una serin-proteasa transmembrana perteneciente a la superfamilia de la subtilisina localizada en la membrana plasmática, en la membrana de los endosomas y en la membrana de la red trans-Golgi, y cuya función biológica consistiría en la maduración postraduccional de proteínas mediante rotura proteolítica (Thomas, 2002). Así, una vez que la inmunotoxina es internada, es cortada por la enzima furina en el sitio de restricción, liberándose el dominio tóxico que se traslocaría al citosol para llevar a cabo su acción tóxica (Goyal & Batra, 2000; Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019).

### 3.3 Inmunogenicidad de las Inmunotoxinas.

Uno de los principales inconvenientes a la hora de utilizar inmunotoxinas como herramientas terapéuticas es la aparición de una respuesta inmune del paciente frente a estas inmunotoxinas, produciendo anticuerpos anti-droga (ADAs). Este aspecto es de mayor importancia si la proteína terapéutica requiere una administración prolongada en el tiempo mediante la administración de repetidas dosis, pues los ADAs se detectan

## Introducción

normalmente una o dos semanas después tras la primera administración de la proteína terapéutica, aumentando sus niveles con las sucesivas administraciones terapéuticas (Fercher *et al.*, 2018).

Los ADAs, al ser una respuesta inmunológica neutralizante de la proteína terapéutica, no solo neutralizan la inmunotoxina administrada o aceleran su eliminación del torrente sanguíneo, sino que pueden dar lugar a complicaciones inmunológicas, como reacciones anafilácticas, hipersensibilidad o incluso autoinmunidad (Sauna *et al.*, 2018).

En este sentido, la inmunogenicidad de las inmunotoxinas viene dada por la inmunogenicidad de los componentes de sus dos dominios funcionales. La inmunogenicidad del dominio marcador puede controlarse incrementando el contenido de secuencia humana insertando las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en marcos humanizados. Este proceso de humanización está perfectamente establecido gracias al desarrollo tecnológico y metodológico asociado a la ingeniería de anticuerpos. En el caso del dominio tóxico, la utilización habitual de toxinas de origen bacteriano, resulta en un carácter muy inmunogénico, siendo por tanto la toxina el principal desencadenante habitual de los problemas de inmunogenicidad (Mazor *et al.*, 2018).

Las principales aproximaciones para disminuir la inmunogenicidad de las inmunotoxinas, y de su dominio tóxico en particular, consisten en: 1) recubrimiento de la inmunotoxina con polietilenglicol (PEG), 2) eliminación de los epítomos reconocidos por los linfocitos B y T, y 3) administración conjunta de agentes inmunosupresores e inmunomoduladores junto con la inmunotoxina (Mazor *et al.*, 2018; Sauna *et al.*, 2018).

- 1) El recubrimiento de las inmunotoxinas con PEG, mediante PEGilación puede reducir la inmunogenicidad disminuyendo la degradación de la proteína frente a las células presentadoras de antígenos, y enmascarando los epítomos inmunogénicos expuestos tras la degradación. No obstante, la unión química de PEG puede afectar a la funcionalidad y eficacia terapéutica de la inmunotoxina (Tsutsumi *et al.*, 2000; Molineux, 2002).
- 2) Eliminación de epítomos de linfocitos B y T. Los epítomos de los linfocitos B son las regiones en la superficie de la inmunotoxina que se unen a los receptores de las células B y provocan la liberación de ADAs. Así, se han detectado 7 epítomos principales de linfocitos B en la exotoxina A de *Pseudomonas*, mediante el mapeo de fragmentos de la toxina y su reacción con anticuerpos, y han sido eliminados mediante mutación y sustitución de aminoácidos presentes en estos epítomos por residuos de alanina (Onda *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012). Esta variante de la toxina de *Pseudomonas* deinmunizada para las células B ha sido utilizada para desarrollar

inmunotoxinas, algunas de ellas biespecíficas, frente a distintos tipos de leucemia (Vallera *et al.*, 2010). De la misma manera se han llevado a cabo mutaciones sobre epítomos de células B de la toxina diftérica, dando lugar a una versión deimmunizada de la misma (Schmohl *et al.*, 2015), que ha sido empleada para el diseño de inmunotoxinas no inmunogénicas, con mayor seguridad y eficacia para los pacientes (Schmohl *et al.*, 2018).

No obstante, la eliminación completa de los epítomos de linfocitos B es compleja, debida a la naturaleza adaptativa de las especificidades de las células B llevada a cabo en el proceso de la maduración de la afinidad. Por ello, la eliminación de epítomos de linfocitos T es una estrategia más eficiente para reducir la inmunogenicidad, ya que la especificidad de los linfocitos T no varía, y los linfocitos T CD4+ son necesarios para la maduración de afinidad de los linfocitos B y la generación de ADAs.

Para la identificación de epítomos de linfocitos T, se suelen llevar a cabo modelos *in silico* de unión de péptidos potencialmente inmunogénicos a las moléculas de HLA (de las siglas en inglés *Human Leucocyte Antigen*), pues el procesamiento de los péptidos, su unión a las moléculas de HLA y su posterior presentación es una condición necesaria para la activación de células T (Rosenberg & Sauna, 2018). También se mapean secuencias peptídicas de las proteínas potencialmente inmunogénicas, y se cultivan en contacto con células T, midiendo su activación mediante cuantificación por ELISA de citoquinas como IL-2, IL-4 o IFN $\gamma$ . Así, se han identificado y mutado residuos concretos de epítomos de células T en la ribotoxina fúngica  $\alpha$ -sarcina (Jones *et al.*, 2016), y se han diseñado inmunotoxinas frente a leucemia de células peludas utilizando una variante de la toxina de *Pseudomonas* con los epítomos de células T silenciados (Mazor *et al.*, 2014)

La eliminación completa de epítomos de linfocitos B y de linfocitos T debería teóricamente provocar una ausencia completa de reacción inmune. No obstante, al tratar de suprimir ambos tipos de epítomos en una inmunotoxina dirigida frente a mesotelina, se observó que la eliminación de un epítomo conformacional de células B había sido la causa de la aparición de un nuevo epítomo frente a células T, mostrando la dificultad de introducir numerosas modificaciones sin comprometer la inmunogenicidad resultante y la funcionalidad (Mazor *et al.*, 2016)

- 3) Administración combinada de agentes inmunosupresores o inmunomoduladores. Además de la reducción de la inmunogenicidad al modificar epítomos específicos de las inmunotoxinas, se ha observado que determinados agentes que suprimen la

## Introducción

respuesta inmune retrasan la aparición de ADAs (Mazor & Pastan, 2020). Así, se ha utilizado rituximab, que elimina las células B, como paso previo a la administración de la inmunotoxina, para retrasar la aparición de anticuerpos neutralizantes (Hassan *et al.*, 2004). También se han utilizado combinaciones de pentostatina y ciclofosfamida para eliminar tanto las células B como las células T, y de esta manera retrasar la aparición de ADAs frente a la inmunotoxina SS1P (Hassan *et al.*, 2013).

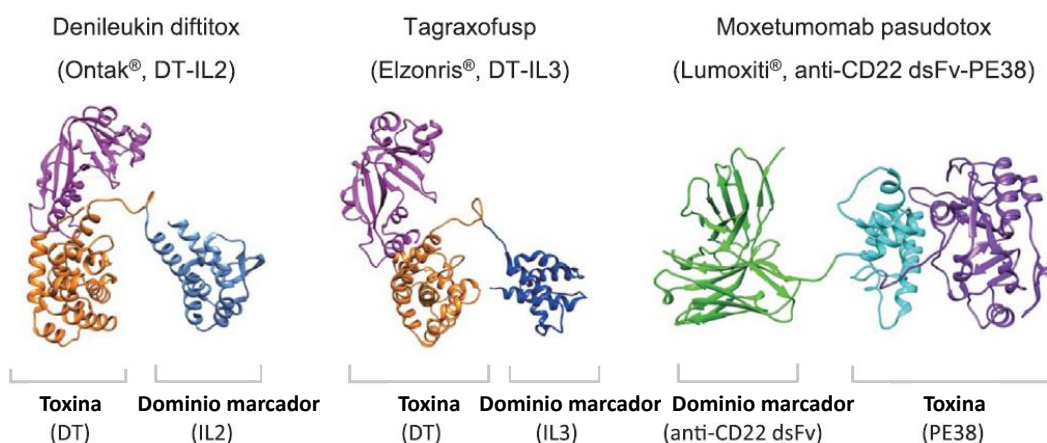
### 3.4 Inmunotoxinas en la actualidad.

En la actualidad, y gracias a las optimizaciones llevadas a cabo anteriormente, muchos diseños de inmunotoxinas están en ensayos clínicos no sólo a frente cánceres hematológicos y sólidos (**Tabla 3**), sino también frente a rechazos de trasplantes (Growth *et al.*, 2019), enfermedades virales (Sadraeian *et al.*, 2017) y enfermedades autoinmunes (Zhao *et al.*, 2019).

Inmunotoxina	Dominio marcador	Dominio tóxico	Enfermedad
Denileukin difitox	IL-2	DT	Linfoma células T cutáneo Melanoma
E7777	IL-2	DT	Linfoma células T recurrente Linfoma células T periférico
Moxetumomab pasudotox	Anti-CD22 (dsFv)	PE38	Leucemia de células peludas Leucemia linfoblástica aguda
Tagraxofusp-erzs	IL-3	DT	Neoplasma de células dendríticas plasmacitoides Leucemia mieloide aguda Leucemia mielomonocítica crónica Mieloma múltiple
MDNA55	IL-4	PE38	Glioblastoma
LMB-2	Anti-Tac (scFv)	PE38	Leucemia de células peludas Leucemia de células T
UCHT1	Anti-CD3 (BisFv)	DT	Melanoma Micosis fúngicas
DT2219ARL	Anti-CD19 y anti-CD22 (scFv)	DT	Leucemia células B
LMB100	Anti-mesotelina (Fab)	PE24-DI	Cáncer pancreático Mesotelioma
SS1P	Anti-mesotelina (dsFv)	PE38	Mesotelioma
M0C31PE	Anti-EpCAM (IgG1)	PE	Neoplasma colorrectal
Oportuzumab monatox	Anti-EpCAM (scFv)	PE38	Cáncer de vesícula
T-Guard	Anti-CD3 y anti-CD7 (IgG)	Ricina	Rechazo de trasplante
D2C7-IT	Anti-EGFR scdsFv	PE38	Glioma maligno
MT-3724	Anti-CD20 (scFv)	Shiga	Linfoma de células B

**Tabla 3. Inmunotoxinas terapéuticas aprobadas y actualmente en ensayos clínicos.** Se indica el nombre de la inmunotoxina, su dominio marcador, su dominio tóxico y la enfermedad para la que están diseñadas. DT, toxina diftérica truncada; PE38, exotoxina de *Pseudomonas* de 38 KDa; PE24-DI, exotoxina de *Pseudomonas* no inmunogénica de 24 KDa.

No obstante, solo 3 inmunotoxinas han sido aprobadas por la FDA para su administración en humanos (Kim *et al.*, 2020): Denileukin difitox (Ontak) frente a linfomas de células T, moxetumomab pasudotox (Lumoxiti) frente a leucemia de células peludas y tagraxofusp (Elzonris) frente a neoplasma de células dendríticas plasmocitoides. (**Figura 14**). Estas 3 inmunotoxinas están diseñadas para cánceres hematológicos, en los que el sistema inmune está comprometido, disminuyendo el riesgo de rechazo inmunológico por parte del paciente, y para los cuales la capacidad de penetración no es crítica. No obstante, considerando que el 80% de los cánceres humanos son tumores sólidos, el desarrollo de inmunotoxinas frente a estos tumores exige seleccionar antígenos de membrana apropiados, con diseños que permitan una mayor penetración y biodistribución en el tejido tumoral, así como utilizar toxinas que no presenten problemas de toxicidad inespecífica ni de inmunogenicidad (Lambert & Morris, 2017).



**Figura 14. Representación tridimensional de las 3 inmunotoxinas aprobadas por la FDA** para el tratamiento de tumores hematológicos en humanos. Se indica de cada una de ellas, el dominio marcador y el dominio tóxico. Adaptado de Kim *et al.*, 2020.

## 4. RNAsas fúngicas-Ribotoxinas.

Como ya se ha comentado anteriormente, además de las toxinas de origen bacteriano, como la toxina de *Pseudomonas* o la toxina diftérica, que presentan una elevada toxicidad inespecífica e inmunogenicidad, se están utilizando otras toxinas para su aplicación en el diseño de inmunotoxinas, como las proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs (*Ribosome Inactivating Proteins*), RNAsas de origen fúngico o humano (Ardelt, 2013; D'Avino *et al.*, 2014; Jordaan *et al.*, 2018) u otras proteínas citolíticas humanas (Mungra *et al.*, 2019).

## Introducción

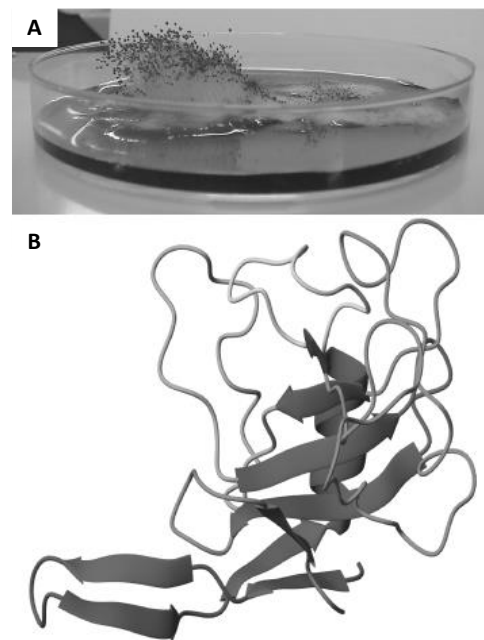
Las RIPs son una familia de toxinas que inhiben la síntesis de proteínas en células eucariotas (Rust *et al.*, 2017). Si bien anteriormente se incluían en esta familia toxinas de diferente origen, como bacterianas o fúngicas, actualmente se restringen a toxinas de plantas, en las que desempeñan una función de defensa a infecciones víricas. Ejemplos de RIPs de plantas serían la saporina, la gelonina o la ricina, presente esta última en las semillas de la planta *Ricinus communis* como ejemplo más característico. Estas toxinas llevan a cabo su acción tóxica a través de su actividad N-glicosidasa sobre el RNA ribosomal de 28S o 23S, eliminando un único residuo de adenina (A4324) en una secuencia GAGA en un lazo universalmente conservado, llamado lazo sarcina-ricina o SRL (Sarcin/Ricin Loop) (Bolognesi *et al.*, 2016; Polito *et al.*, 2019).

Es precisamente el SRL, sobre el que ejercen su acción inhibitoria del ribosoma las ribotoxinas fúngicas, pertenecientes a la familia de RNAsas fúngicas, siendo la  $\alpha$ -sarcina su miembro más representativo, justificando la inclusión de su nombre en dicho lazo descrito anteriormente (Lacadena *et al.*, 2007; Olombrada *et al.*, 2014 y 2017a; Gotte *et al.*, 2019).

Las ribotoxinas fúngicas son una familia de ribonucleasas extracelulares que fueron inicialmente descubiertas en 1960, gracias a un estudio del departamento de salud de Michigan para la búsqueda de antibióticos y agentes antitumorales. El filtrado de un hongo procedente del suelo de una granja de Michigan presentó actividades inhibitorias para el crecimiento de sarcoma 180 y de carcinoma 755 (Olson *et al.*, 1965). El hongo fue identificado como *Aspergillus giganteus* MDH18894, y la molécula responsable de estos efectos antitumorales resultó ser una proteína, llamada  $\alpha$ -sarcina (Olson & Goerner, 1965)

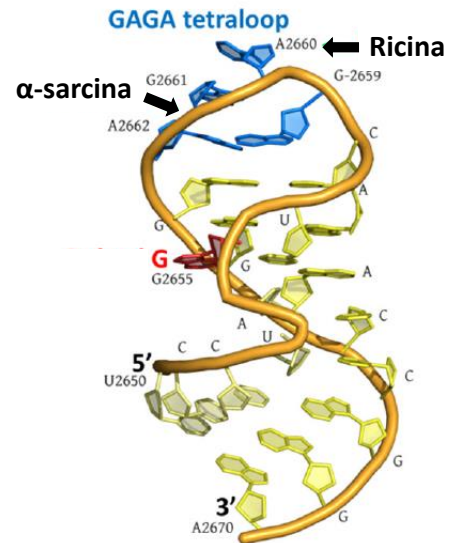
(Figura 15).

Las ribotoxinas, además de ser RNAsas extracelulares producidas por hongos filamentosos, presentan actividad citotóxica. Son producidas mayoritariamente por especies del género *Aspergillus*, aunque otros hongos entomopatógenos, como *Hirsutella thompsonii* o *Metarhizium anisopliae* también son capaces de sintetizarlas.



**Figura 15.** A. Fotografía de un cultivo de *Aspergillus giganteus* MDH18894. B. Primera determinación de la estructura tridimensional de la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina. Adaptado de Lacadena *et al.*, 2007.

Llevan a cabo su acción ribonucleolítica sobre la subunidad mayor del RNA ribosomal inactivándolo, actuando sobre el lazo sarcina o SRL. Este SRL consiste en una horquilla de rRNA, en el que los elementos estructurales más destacados son un *tetra*loop GAGA y un residuo de guanina prominente. No obstante, el mecanismo de acción es diferente, pues las RIPs inactivan el ribosoma depurinando un único residuo de adenina (A2660), mientras que las ribotoxinas rompen un único enlace fosfodiéster situado en el extremo 3' de G2661. (**Figura 16**). Este SRL, junto con la región de unión uL11, el segmento L7/L12 y las proteínas ribosomales uL6 y uL14 constituye el sitio de unión al factor de elongación, requerido para la biosíntesis de proteínas (Lacadena *et al.*, 2007).



**Figura 16. Estructura del SRL.** Se indica la adenina depurinada por la ricina, el enlace fosfodiéster cortado por el  $\alpha$ -sarcina, así como elementos estructurales del SRL, el *tetra*loop GAGA (azul) y un residuo de guanina prominente (rojo). Adaptado de Lacadena *et al.*, 2007

La rotura del SRL por las ribotoxinas mediante una rotura endonucleolítica típica de tipo ácido-base (Lacadena *et al.*, 1998) produce un pequeño fragmento de 300-400 nucleótidos de rRNA conocido como fragmento  $\alpha$ , inhibiéndose la biosíntesis de proteínas y produciéndose la muerte celular por apoptosis. (García-Ortega *et al.*, 2010; Olombrada *et al.*, 2017).

La toxicidad de las ribotoxinas es debida tanto a su actividad RNasa altamente específica, como a su capacidad de atravesar membranas lipídicas. Esta capacidad de las ribotoxinas de atravesar membranas lipídicas es llevada a cabo sin la participación de ningún receptor, siendo particularmente capaces de atravesar las membranas de células transformadas o infectadas por virus, así como las membranas más fluidas y finas de células de insecto (Oñaderra *et al.*, 1993; Olmo *et al.*, 2001). Esto es debido a la diferente permeabilidad de estas membranas celulares, junto con la interacción de determinados residuos básicos en la superficie de las ribotoxinas con los fosfolípidos ácidos presentes en las membranas lipídicas (Lacadena *et al.*, 2007; Olombrada *et al.*, 2013).

Las ribotoxinas más estudiadas y caracterizadas son la  $\alpha$ -sarcina, producida por *Aspergillus giganteus*; la restrictocina, producida por *Aspergillus restrictus* y Asp f 1, producida por el patógeno humano *Aspergillus fumigatus* (Gasset *et al.*, 1994; Kao *et al.*,

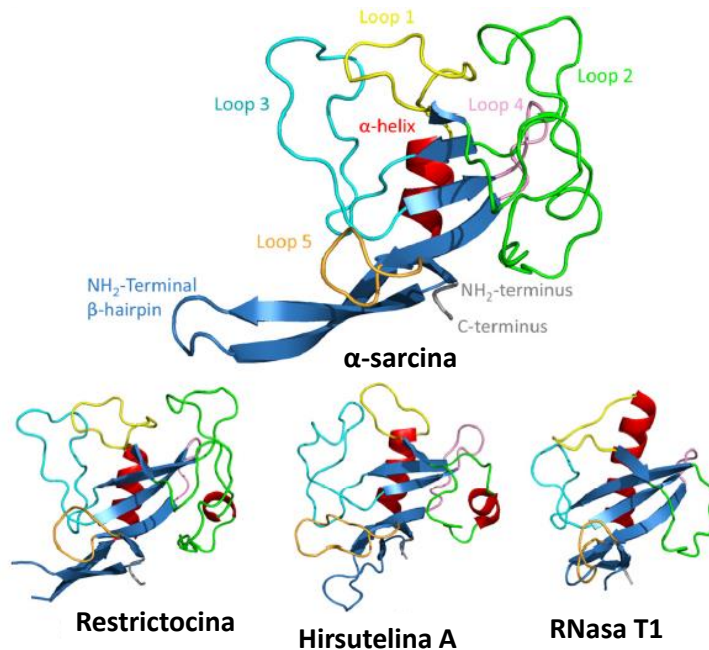
## Introducción

2001). Todas ellas muestran un alto grado de conservación, así como una similitud en la secuencia de aminoácidos superior al 85%.

No obstante, la hirsutelina A, una ribotoxina extracelular producida por el hongo patógeno *Hirsutella thompsonii* sólo presenta un 25% de identidad de secuencia con las ribotoxinas previamente caracterizadas (Herrero-Galán *et al.*, 2013). También se han encontrado

ribotoxinas en otros géneros de hongos, como la pequeña anisoplina producida por *Metarhizium anisopliae*, mostrando que la producción de ribotoxinas no es exclusiva del género *Aspergillus* (Olombrada *et al.*, 2017b).

Filogenéticamente próximas a las ribotoxinas, pero sin actividad citotóxica, son las RNAsas extracelulares fúngicas, de las que la RNasa T1, producida por *Aspergillus oryzae* es el miembro más caracterizado (Yoshida, 2001). Este grupo



**Figura 17.** Estructuras tridimensionales de alguna de las principales ribotoxinas ( $\alpha$ -sarcina, restrictocina e hirsutelina A) y de la RNasa T1. Los elementos estructurales comunes aparecen indicados con los mismos colores. Adaptado de Olombrada *et al.*, 2017.

presenta un alto grado de secuencia y similitud estructural con las ribotoxinas, pero no son capaces de atravesar membranas lipídicas, razón por la cual no son citotóxicas. Además de la RNasa T1, la RNasa U2, producida por *Ustilago spaherogena* es otra RNasa extracelular fúngica no tóxica que está filogenéticamente próxima a las ribotoxinas (García-Ortega *et al.*, 2005).

Las ribotoxinas son proteínas más grandes, de aproximadamente 150 aminoácidos, generalmente básicas, que contienen *loops* largos cargados positivamente que están ausentes en las RNAsas fúngicas no citotóxicas, siendo estos *loops* los responsables de su toxicidad. (Figura 17).

La determinación de la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -sarcina por resonancia magnética nuclear (Campos-Olivas *et al.*, 1996; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000) mostró que en disolución presenta 5 láminas  $\beta$  antiparalelas y una  $\alpha$ -hélice de 3 vueltas, que constituyen

una superficie cóncava donde se encuentran los residuos del centro activo enzimático: His50, Glu96, Arg121 e His137. Además, los residuos 1-26 constituyen una larga horquilla  $\beta$ . Se ha demostrado que el *loop 2* de la  $\alpha$ -sarcina (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000) y los residuos de lisina del *loop 3* son necesarios para el reconocimiento y contacto del SRL, pues reconocen específicamente el residuo de guanina prominente.

Por otro lado, el alto contenido de aminoácidos básicos, el *loop 2* y la horquilla  $\beta$  del extremo N-terminal parecen estar implicadas en la interacción y capacidad de atravesar membranas lipídicas, pues la delección de la horquilla  $\beta$  N-terminal en la  $\alpha$ -sarcina produce un mutante que mantiene su actividad ribonucleolítica, pero con impedimentos para interactuar con membranas (Martínez-del-Pozo *et al.*, 1988; García-Ortega *et al.*, 2002).

La función biológica de las ribotoxinas extracelulares en condiciones nativas es desconocida, pero se postula que son secretadas por los hongos para un papel defensivo y predatorio. Así, *A. restrictus* sintetiza la ribotoxina restrictocina en un momento específico del desarrollo vital del hongo, durante la formación del conidióforo, para ser degradada posteriormente cuando el desarrollo de los conidios se ha completado (Brandhorst *et al.*, 1992). Por su parte, *Hirsutella thomposonii* infecta ácaros, desarrollándose los conidios del hongo a través de la cutícula de estos artrópodos, habiéndose demostrado el papel de la actividad de la ribotoxina hirsutelina en la patogénesis e infección de ácaros y otros insectos (Peng *et al.*, 2002; Herrero-Galán *et al.*, 2013; Olombrada *et al.*, 2013).

### 4.1 Aplicaciones biotecnológicas de las ribotoxinas.

#### ***Ribotoxinas como biopesticidas.***

A medida que los progresos técnicos y médicos nos permiten alcanzar una mayor esperanza de vida, la población mundial se incrementa exponencialmente, y se estima que en 2050 alcanzaremos los 9,5 billones de habitantes. Esta expansión demográfica requiere un crecimiento equivalente de recursos alimenticios, y una de las principales amenazas a las fuentes de alimentación son las plagas, que causan la pérdida del 40% de la producción agrícola al año (Olombrada *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, se han empleado pesticidas químicos para controlar las plagas, como el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) en 1940. No obstante, la escasa especificidad de estos compuestos, su toxicidad y la emergencia de resistencias ha llevado a buscar otras formas de controlar las plagas, surgiendo los biopesticidas como una solución prometedora (Glare *et al.*, 2012).

## Introducción

Los biopesticidas incluyen todas aquellas técnicas de control de plagas que utilizan microorganismos (bacterias, hongos, virus...) así como los metabolitos (péptidos y proteínas) producidos por ellos.

En particular, los hongos entomopatógenos han sido utilizados para controlar determinadas plagas de artrópodos, como *B. bassiana* frente a insectos y moscas, *M. anisopliae* frente al mosquito *Anopheles gambiae* o *H. thompsonii* para el control del ácaro *Varroa destructor* (Whetstone & Hammock, 2007; Kim *et al.*, 2014).

Además de la infección llevada a cabo por el microorganismo completo, también se podrían utilizar sus factores de virulencia, como las ribotoxinas producidas por ellos para controlar las plagas. En este sentido, uno de los principales inconvenientes radicaría en la toxicidad de estas proteínas para las células de vertebrados, pero este inconveniente se podría superar caracterizando e investigando variantes de ribotoxinas tóxicas para insectos, pero inocuas para los vertebrados, como los mutantes de hirsutelina, que mantienen su actividad ribonucleolítica, pero son incapaces de entrar en las células de mamífero, reduciendo su toxicidad inespecífica (Herrero-Galán *et al.*, 2012).

### **Ribotoxinas en inmunotoxinas**

Pese a que las ribotoxinas fueron inicialmente descubiertas como agentes antitumorales, su investigación fue abandonada debido a la aparición de toxicidades inespecíficas frente a células no tumorales (Roga *et al.*, 1971). No obstante, con el desarrollo de las inmunotoxinas se reavivó su interés, al poder constituir el dominio tóxico de estas inmunotoxinas, y ser específicamente dirigidas a las células diana.

Las ribotoxinas fúngicas presentan una serie de propiedades que las convierten en candidatas idóneas para su inclusión como dominio tóxico de las inmunotoxinas. Destacando, entre otras, su pequeño tamaño, elevada termoestabilidad, una baja inmunogenicidad, resistencia a proteasas y una elevada especificidad para inactivar ribosomas, produciendo la muerte de la célula diana por inhibición de la biosíntesis de proteínas (Lacadena *et al.*, 2007; Olombrada *et al.*, 2017).

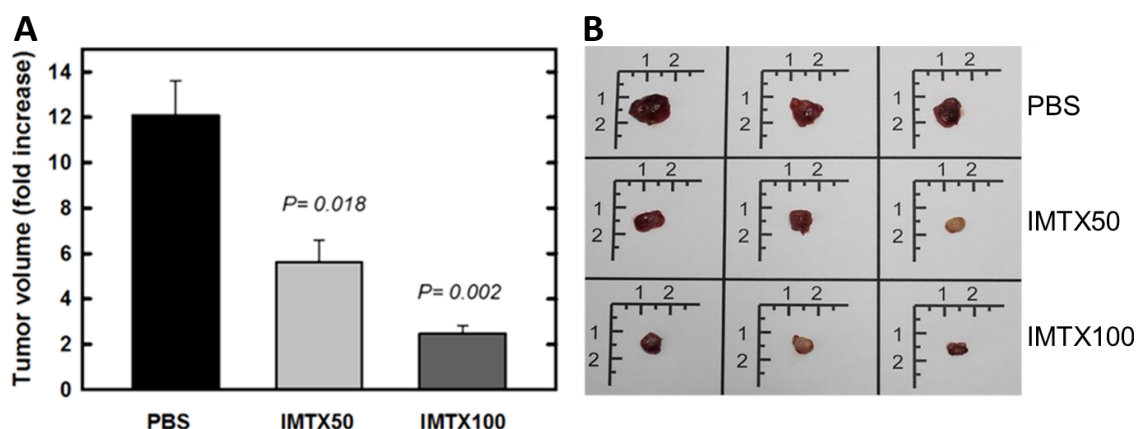
Así, se diseñaron y caracterizaron inmunotoxinas de primera generación, utilizando anticuerpos completos conjugados químicamente a la  $\alpha$ -sarcina, dirigidas específicamente frente a células tumorales que expresan el receptor de transferrina (Rathore *et al.*, 1997) o frente a cáncer de vejiga (Wawrzynczak *et al.*, 1991). También se ha utilizado la ribotoxina restrictocina como dominio tóxico para la construcción de inmunotoxinas (Rathore & Batra, 1996).

## 5. Inmunotoxinas desarrolladas en nuestro grupo.

Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación desde hace más de 20 años, relacionados con el esclarecimiento de la relación estructura-función en las RNAsas extracelulares fúngicas, centrado especialmente en las ribotoxinas, ha permitido trasladar este conocimiento a su potencial aplicación biomédica o biotecnológica. De este modo, se han obtenido diferentes diseños de inmunotoxinas frente a cáncer y más recientemente frente a alergia (Lázaro-Gorines *et al.*, 2020).

Centrándonos en el caso de los diseños de inmunotoxinas antitumorales desarrollados por nuestro grupo, inicialmente se diseñaron dos inmunoRNAsas, IMTXA33 $\alpha$ S y scFvA33T1, basadas en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina y en la RNasa T1, respectivamente (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012; Tomé-Amat *et al.*, 2012). Ambas compartiendo el mismo dominio marcador basado en scFvA33, que reconoce el antígeno tumoral GPA33, sobreexpresado en cáncer colorrectal.

Los resultados obtenidos en la caracterización *in vitro* de dichas inmunoRNAsas mostró que ambas eran capaces de unirse específicamente y provocar la muerte por apoptosis de las células diana (GPA33+), presentando IMTXA33 $\alpha$ S una eficacia citotóxica mucho mayor (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012). Además, se estudió el efecto antitumoral de IMTXA33 $\alpha$ S *in vivo*, observándose que la administración de esta inmunotoxina produjo una inhibición muy significativa del crecimiento tumoral, presentando propiedades antiangiogénicas y antiproliferativas sobre tumores colorrectales xenoinjertados en modelo de ratón (**Figura 18**). Estos resultados supusieron una prueba de concepto del potencial uso terapéutico de las inmunotoxinas basadas en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina (Tomé-Amat *et al.*, 2015c).



**Figura 18. Análisis *in vivo* de la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S.** Se indica el control negativo al que se le administró PBS, IMTX50 o tratamiento con 50 $\mu$ g de inmunotoxina e IMTX100 o tratamiento con 100 $\mu$ g de inmunotoxina. En A, se observa la disminución del volumen tumoral con los distintos tratamientos. En B se representan macroscópicamente los tumores, en los que se puede observar que presentan un menor tamaño, y una menor vascularización en los tratamientos con inmunotoxina respecto al control de PBS. Adaptado de Tomé-Amat *et al.*, 2015c.

## Introducción

Para tratar de explicar las diferencias observadas en su eficacia citotóxica se llevó a cabo un estudio en profundidad del mecanismo de acción de estas dos construcciones, realizando para ello estudios de colocalización intracelular mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia (Tomé-Amat *et al.*, 2015a). De este modo, se realizó un seguimiento de la ruta intracelular seguida por las diferentes construcciones. En estos estudios se incluyó un nuevo diseño de inmunotoxina basada en una variante no citotóxica de la hirsutelina A (IMTXA33HtAΔ3W), que mantenía las características ribonucleolíticas de las ribotoxinas, pero que había perdido su capacidad para interactuar con membranas (Tomé-Amat *et al.*, 2015b). Esta nueva construcción se comportó de forma similar a scFvA33T1.

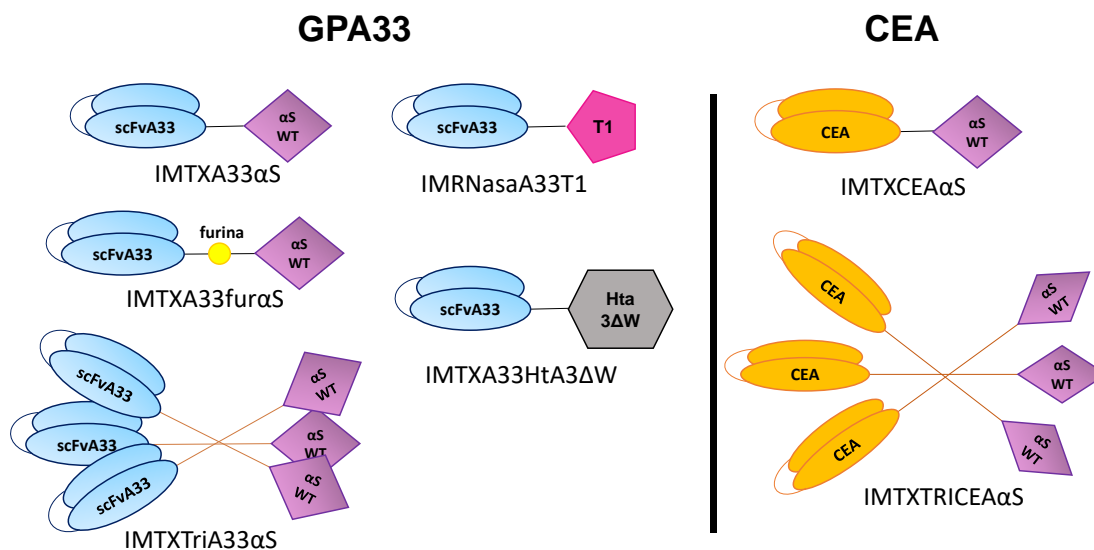
Los resultados indicaron que las diferencias en actividad antitumoral observadas entre las diferentes construcciones se debían especialmente a la ruta intracelular seguida por cada una de las RNasas, siendo este procesamiento intracelular determinante para la citotoxicidad (Tomé-Amat *et al.*, 2015a). Así, la  $\alpha$ -sarcina se traslocaría al citosol desde los endosomas, mientras que la RNasa T1 se dirigiría mayoritariamente hacia los lisosomas.

Por ello, se plantearon nuevos diseños optimizados de las construcciones originales (**Figura 19**), incluyendo un sitio de reconocimiento y corte por la proteasa furina entre el dominio marcador y el dominio tóxico (IMTXA33fur $\alpha$ S y scFvA33furT1) (Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019). Los resultados mostraron un incremento en la eficacia citotóxica de ambas construcciones en comparación con las construcciones originales.

Por otro lado, se diseñaron dos inmunotoxinas dirigidas frente a CEA, otro antígeno tumoral en cáncer colorrectal, utilizando un formato clásico de inmunotoxina de una única cadena basada en scFv y un formato novedoso de conformación trimérica en disolución, incorporando en este último un dominio de trimerización TIE<sup>XVIII</sup> entre el dominio marcador y el dominio tóxico (Cuesta *et al.*, 2009). Así, se obtuvieron las inmunotoxinas IMTXCEA $\alpha$ S e IMTXTRICEA $\alpha$ S (Lázaro-Gorines *et al.*, 2019) (**Figura 19**). Ambas construcciones presentaron una elevada especificidad y eficacia antitumoral *in vitro* e *in vivo*, siendo mucho mayor en el caso de la inmunotoxina trimérica, asociado a un efecto sinérgico debido a una mayor avidéz en la interacción con el antígeno, al posible incremento de la vida media de la construcción y a un aumento en la carga tóxica durante el tratamiento. Estos resultados, supusieron una prueba de concepto para el potencial terapéutico de las inmunotoxinas con formato trimérico.

No obstante, quedan numerosos obstáculos para la aplicación terapéutica de las inmunotoxinas a gran escala: la inmunogenicidad que presentan las toxinas utilizadas, que provoca la generación de ADAs y la consiguiente reducción terapéutica para tratamientos

que requieren varias dosis; diseñar inmunotoxinas con un tamaño y formato adecuado, que permita su penetración en tumores sólidos, la permanencia en ese tejido diana, y una baja tasa de aclaramiento renal; diseñar inmunotoxinas frente a distintos antígenos para que el tumor no adquiera resistencia al tratamiento por desarrollo de rutas proliferativas paralelas o combinar distintas estrategias terapéuticas a la hora de curar una enfermedad como el cáncer que, si por algo se caracteriza, es por su versatilidad de aparición, desarrollo y resiliencia. Algunos de estos diseños son objeto de estudio en esta Tesis doctoral.



**Figura 19. Esquema de las distintas inmunotoxinas diseñadas y caracterizadas en nuestro grupo de investigación, tanto frente a GPA33 como frente a CEA.** Se indican los dominios marcadores en azul (scFv frente a GPA33) o naranja (scFv frente a CEA), y los dominios tóxicos en morado ( $\alpha$ -sarcina), rosa (RNasa T1) o gris (hirsutelina A 3 $\Delta$ W).

La experiencia acumulada en el grupo de investigación, y los resultados obtenidos con las diferentes inmunotoxinas descritas anteriormente, son el punto de partida para los diseños planteados en esta Tesis Doctoral. Para ello, disponemos de un sistema de expresión heteróloga perfectamente establecido, basado en la levadura metilotrónica *Pichia pastoris* que, además de ser considerado un organismo seguro para la salud o GRAS (de las siglas en inglés: *Generally Regarded As Safe*) (Tran *et al.*, 2017) permite la producción de cantidades suficientes de inmunotoxinas para su posterior caracterización funcional (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012; Lázaro-Gorines *et al.*, 2019; Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019).

## Introducción

# **Objetivos**

## Objetivos

## Objetivos

Los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación en el diseño, producción y caracterización de inmunotoxinas antitumorales, publicados en numerosos artículos de investigación y tesis doctorales, han permitido confirmar el enorme potencial terapéutico de las inmunotoxinas basadas en ribonucleasas fúngicas.

Así, el **objetivo general** de este trabajo se centra en el diseño y caracterización de nuevos diseños optimizados de inmunotoxinas, que eviten los principales problemas de la aplicación terapéutica de las inmunotoxinas, como la elevada inmunogenicidad del dominio tóxico, su escasa penetración en tumores sólidos, un tráfico intracelular ineficiente; así como el diseño de nuevas plataformas biomédicas, que combinen las propiedades físicas de las nanopartículas de oro, con las propiedades terapéuticas de las inmunotoxinas.

Este objetivo general puede concretarse en los siguientes objetivos específicos, agrupados en tres bloques:

### **Bloque A. Producción y caracterización de inmunotoxinas no inmunogénicas basadas en una variante no inmunogénica de la $\alpha$ -sarcina.**

Se van a estudiar las características estructurales y funcionales de la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina, así como su inclusión como dominio tóxico en inmunotoxinas frente a GPA33, y en inmunotoxinas optimizadas que incorporan un sitio de reconocimiento y corte de furina para facilitar su procesamiento intracelular.

### **Bloque B. Producción y caracterización de nanoimmunotoxinas basadas en un *nanobody* (VHH) frente a EGFR.**

Este bloque se basa en el diseño, producción y caracterización de nanoimmunotoxinas, cuyo dominio marcador consiste en un *nanobody* frente a EGFR, así como de variantes optimizadas como nanoimmunotoxinas triméricas, o inmunotoxinas biespecíficas, que reconozcan tanto al antígeno EGFR como a GPA33.

### **Bloque C. Vehiculización de inmunotoxinas mediante nanopartículas de oro.**

Se va a aprovechar el potencial de las nanopartículas de oro como plataformas biomédicas aptas para la unión en su superficie de diferentes moléculas, para la obtención y caracterización de complejos nanopartícula-inmunotoxina, y estudiar su efecto terapéutico combinado.

## Objetivos

**MATERIALES Y MÉTODOS.**

## **Materiales y Métodos**

# MATERIALES

## 1. TIPOS CELULARES Y ORGANISMOS

### 1.1 *Escherichia coli*

**Cepa BL21 (DE3):** Genotipo: F-, lon-11,  $\Delta(\text{ompT-nfrA})885$ ,  $\Delta(\text{galM-ybhJ})884$ ,  $\lambda\text{DE3}$  [*lacI*, *lacUV5-T7* gene 1, *ind1*, *sam7*, *nin5*],  $\Delta 46$ , [*mal+*]K-12( $\lambda\text{S}$ ), *hsdS10*. Cepa utilizada para la amplificación, purificación y propagación del plásmido pINPG $\alpha$ SDI.

**Cepa RB791 (W3110*lacI*<sup>q</sup>L8):** Genotipo: F', *lacI*p-4000(*lacI*Q),  $\lambda$ -, IN(*rrnD-rrnE*)1. Cepa que, una vez que incorporado el plásmido pINPG $\alpha$ SDI en su citoplasma, ha sido utilizada para la expresión, y exportación de  $\alpha$ SDI al espacio periplásmico.

**Cepa DH5 $\alpha$ F':** Genotipo: F' *endA1 hsdR17* (r-K m-K) *supE44 thi-1 recA1 gyr A* (NalR) *relA1*  $\Delta(\text{lacZYA-argF})$  U169 *deoR* [ $\Theta 80$  *dlac*  $\Delta(\text{lacZ})$  M15]. Cepa utilizada para la amplificación, propagación y purificación del plásmido pPICZ $\alpha$ A. Al ser de genotipo F' presenta un factor F', o factor de fertilidad, que le confiere la capacidad de transferir DNA por conjugación. Se utilizan cepas competentes, preparadas mediante el método de Hanahan con una modificación que implica la adición de RbCl.

### 1.2 *Pichia pastoris*

**Cepa KM71H:** Genotipo *aox1*: ARG4. Fenotipo: His+, MutS. Se trata de una cepa de la levadura *Pichia pastoris*, que tiene interrumpido el gen de la enzima alcohol oxidasa I. Este gen es responsable del metabolismo del 80% del metanol, por lo que dicho metabolismo debe ser llevado a cabo por la enzima alcohol oxidasa II (del gen *AOXII*), de actividad más lenta. De ahí que la cepa sea MutS (*Methanol Utilization Slow*).

**Cepa Bg11 (PPS-9011):** Genotipo: *aox1* $\Delta$ , Fenotipo: His+, MutS. Cepa derivada de la cepa salvaje BG10, desarrollada por la compañía *Biogramatics*. Debido a la delección completa del marco de lectura del gen *AOX1*, esta cepa presenta un crecimiento lento cuando el metanol es la única fuente de carbono disponible.

### 1.3 Líneas celulares de mamíferos

**SW1222 (ATCC HB-11028):** Línea celular adherente de cáncer de colon humano. Su crecimiento es rápido y forma agrupaciones o "domos". Se ha utilizado como modelo de células GPA33-positivas. Células crecidas en medio RPMI 1640, suplementadas con 50

## Materiales y Métodos

U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 300 mg/ml de L-glutamina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente por tripsinización.

**A431 (ATCC CRL-1555):** Línea celular adherente de carcinoma epidermoide. Su crecimiento es rápido, formando varias capas celulares ordenadas. Se ha utilizado como modelo de células EGFR-positivas. Células crecidas en medio RPMI 1640, suplementadas con 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 300 mg/ml de L-glutamina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente por tripsinización.

**HeLa (ATCC CCL-2):** Línea celular de adenocarcinoma de cérvix. Su crecimiento es rápido, formando monocapas ordenadas. Se ha utilizado como modelo de GPA33-negativo, y también como modelo celular EGFR-positivo. Células crecidas en medio DMEM, suplementadas con 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 300 mg/ml de L-glutamina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente por tripsinización.

**THP-1-XBlue™ (ATCC TIB-202):** Línea celular en suspensión derivada de THP-1, siendo ésta una línea celular de monocitos humanos. Se ha utilizado como modelo de activación inmunológica de monocitos, debido a que ante la activación de TLR (2-5) y la consiguiente ruta de señalización NF- $\kappa$ B, secretan al medio extracelular una fosfatasa alcalina (SEAP). Células crecidas en medio RPMI 1640, suplementadas con 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 200  $\mu$ g/ml de zeocina, 300 mg/ml de L-glutamina y FBS al 10% (v/v). Su propagación se realizó rutinariamente por centrifugación y dilución.

### 1.4 Células obtenidas de humanos.

**PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica aisladas de 3 donantes sanos. Se utilizaron para ensayos de activación inmunológica, y detección de citoquinas. Una vez aislados de la sangre total utilizando una centrifugación en gradiente de Ficoll, se crecieron en suspensión en medio RPMI 1640, suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 300 mg/ml de L-glutamina y FBS al 10% (v/v).

### 1.5 Organismos

**Ratones *BALB/c nude*:** Cepa de ratón, caracterizada por presentar una mutación génica en el gen *FOXN1*, que provoca la ausencia, o el deterioro del timo, por lo que el número de linfocitos T maduros es muy reducido provocando inmunodeficiencia. Dicha inmunodeficiencia es necesaria para no provocar rechazo inmunológico por parte del ratón

cuando se injertan las células tumorales. Los ratones provinieron de la empresa Harlan y Envigo (Barcelona).

### 2. Vectores de secuenciación y expresión heteróloga.

**pEMBL18 (+)** (Dente & Cortese, 1987): Vector utilizado para la obtención del ssDNA correspondiente a la  $\alpha$ SDI. Contiene un gen de resistencia a ampicilina.

**pINPG:** Vector utilizado para la expresión de  $\alpha$ SDI en *E. coli*, y su secreción al espacio periplásmico. Presenta el péptido señal OmpA, que permite la secreción al periplasma de la proteína producida. La inducción de la expresión se lleva a cabo mediante la adición de IPTG, que provoca la activación del complejo promotor/operador *lac*. Contiene un gen de resistencia a ampicilina.

**pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen):** Vector utilizado para la expresión de inmunotoxinas en la levadura *P. pastoris*. Presenta regiones homólogas al gen *AOX1* de *P. pastoris*, permitiendo su integración en el genoma de la levadura. Presenta el péptido señal factor  $\alpha$ , que permite la secreción al medio extracelular de la proteína producida. Además, detrás del sitio de multiclonación contiene la secuencia correspondiente a una extensión de 6 histidinas (Histag), que permite la posterior purificación de la proteína. La inducción de la expresión se lleva a cabo mediante la adición de metanol, que provoca la activación del gen *AOX1*. Contiene un gen de resistencia a zeocina.

### 3. Secuencias de cDNA

**scFvA33 (cDNA):** Secuencia de DNA codificante de los fragmentos variables de cadena única frente al antígeno GPA33. El cDNA se obtuvo gracias al grupo del Dr. Carl Batt de la Universidad de Cornell en Ithaca (NY). Dicha secuencia está incluida en los plásmidos pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ S, pPICZ $\alpha$ AA33furaS, pPICZ $\alpha$ A33Tri $\alpha$ S y pPICZ $\alpha$ AscFvA33Histag.

**Fur (cDNA):** Secuencia de DNA codificante del sitio mínimo de reconocimiento y corte de la proteasa furina, presente en endosomas y aparato de Golgi. Dicha secuencia está incluida en el plásmido pPICZ $\alpha$ AA33furaS.

**$\alpha$ S (cDNA):** Secuencia de DNA codificante de la ribotoxina fúngica  $\alpha$ -sarcina.

**VHH anti-EGFR 7D12v2 (cDNA):** Secuencia de DNA codificante del *nanobody* o VHH frente a EGFR. El cDNA se obtuvo gracias a la colaboración con el grupo de la Dra. Laura

## Materiales y Métodos

Sanz Alcober del Departamento de Inmunología Molecular del Hospital Puerta del Hierro de Madrid. Dicha secuencia está incluida en el plásmido pPICZ $\alpha$ A-EGFR-CD3.

**L21-hNC1-L21 (cDNA):** Secuencia de DNA codificante del dominio de trimerización del colágeno humano tipo XVIII (TIE XVIII), flanqueado a ambos lados por un *linker* de 21 aminoácidos (L21). El cDNA se obtuvo gracias a la colaboración con el grupo de la Dra. Laura Sanz Alcober del Departamento de Inmunología Molecular del Hospital Puerta del Hierro de Madrid. Dicha secuencia está incluida en el plásmido pPICZ $\alpha$ AA33Tri $\alpha$ S.

### 4. Medios de cultivo

#### 4.1 Medios de cultivo para *E. coli*.

**LB** (Sambrook *et al.*, 1989): Medio general para el mantenimiento de cepas. Contiene Bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l, pH 7,5. Para prepararlo como medio sólido, se añadió agar 10 g/l. Para la selección de cepas transformantes resistentes a ampicilina, se añadió ampicilina, a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml.

**LB-soso:** Medio general para el mantenimiento de cepas resistentes a zeocina. Contiene Bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l pH 7,5. Para prepararlo como medio sólido, se añadió agar 10 g/l. Para la selección de cepas transformantes resistentes a zeocina, se añadió zeocina, a una concentración final de 25  $\mu$ g/ml.

**Medio Mínimo** (Sambrook *et al.*, 1989): Medio utilizado para la expresión de  $\alpha$ SDI. Contiene la mezcla de sales M9 1x (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g/l, NaCl 0,25 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 0,5 g/l), MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,01 mM y glucosa 0,2 (p/v).

**$\Psi$ -Broth:** Medio utilizado para la obtención de células competentes de *E. coli*, y su posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene Bacto triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), MgSO<sub>4</sub> 0,4% (p/v) y KCl 10 mM pH 7,6.

**TfB1:** Medio utilizado para la obtención de células competentes de *E. coli*, y su posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene: RbCl 100 mM, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 30 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15 % (v/v), pH 5,2.

**TfB2:** Medio utilizado para la obtención de células competentes de *E. coli*, y su posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene: RbCl 10 mM, MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15% (v/v), pH 7.

### 4.2 Medios de cultivo para *P. pastoris*

**YPD:** Medio utilizado para el mantenimiento de cepas de la levadura *P. pastoris*. Contiene extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l y dextrosa 2% (p/v). Para prepararlo como medio sólido se añadió agar 20 g/l. Para la selección de cepas resistentes a zeocina, se añadió zeocina a diferentes concentraciones (de 100 µg/ml hasta 750 µg/ml).

**YPDS:** Medio utilizado para el mantenimiento de cepas de *P. pastoris* tras la electroporación. Tiene la misma composición que el medio YPD, añadiendo sorbitol 1 mM.

**BMGY:** Medio utilizado para el crecimiento de las cepas de *P. pastoris*. Contiene extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, tampón fosfato potásico 100 mM pH 6, YNB 1,34% (p/v), Biotina  $4 \times 10^{-5}$  (p/v) y glicerol 1% (p/v).

**BMMY:** Medio utilizado para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Tiene la misma composición que el medio BMGY, pero sustituyendo el glicerol 1%, por metanol 0,5% (v/v).

**Tampón fosfato sódico.**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5. Tampón utilizado para la diálisis del medio inducido, previo a la purificación por cromatografía de afinidad. También es el tampón general de disolución de las proteínas liofilizadas y el utilizado en la mayoría de los ensayos.

### 4.3 Medios de cultivo para líneas celulares.

**RPMI-1640:** Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células SW1222, A431, PBMCs y THP1-xBlue. Contiene el agente reductor glutatión y altas concentraciones de colina, inositol y vitaminas (biotina, vitamina B12, ácido 4-aminobenzoico). Debido a que utiliza bicarbonato sódico como tampón, necesita un ambiente de  $\text{CO}_2$  5-10% (v/v) para el mantenimiento del pH. Requiere suplementación con FBS al 10% (v/v).

**DMEM:** Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células HeLa. Al igual que el RPMI-1640, requiere un ambiente de  $\text{CO}_2$  y suplementación con FBS al 10% (v/v).

## 5. Disoluciones y tampones

### 5.1 Electroforesis de ácidos nucleicos:

**TAE 1X:** Tris-base 484 g/l, ácido acético glaciado 1,14 ml/l y EDTA 1 mM.

## **Materiales y Métodos**

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

### **5.2 Electroforesis de proteínas.**

**Tampón de aplicación 1X:** Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,02% (p/v), pH 7,6. Para reducir las proteínas, se añadió 2-mercaptoetanol 5% (p/v).

**Tampón de desarrollo de electroforesis:** Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 0,1% (p/v).

**Azul de Coomassie:** Azul de Coomassie R-250 0,26% (p/v), metanol 45,4% (v/v), ácido acético glacial 9,2% (v/v).

**Solución de desteñido:** Metanol 20% (v/v) y ácido acético glacial 7,5% (v/v).

### **5.3 Inmunodetección (*Western Blot*).**

**PBS:** NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM pH 7,4.

**Solución de revelado:** Tetrahidroclorato de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) 0,03% (p/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,016% (v/v).

**Tampón de transferencia:** Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) y metanol 20% (v/v).

**Tampón de bloqueo:** Leche en polvo 3% (v/v) en PBS, o al 0,1% en el caso de bloqueo durante 16 horas.

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

### **5.4 Ensayos de actividad RNasa.**

**Tampón A:** Tris 40 mM, EDTA 10mM, pH 7,5; para el ensayo de reticulocitos.

**Tampón B:** Tris 50 mM, SDS 5%, pH 7,4; para el ensayo de reticulocitos.

**Tampón C:** Tris 40 mM, pH 7,5; para el ensayo de reticulocitos

**MOPS 10X:** MOPS 0,2 M; EDTA 10 mM, NaAC 50 mM, pH 7; para el ensayo de reticulocitos

## Materiales y Métodos

**TBE 10X:** Tris 108 g/l (p/v), ácido bórico 55 g/l (p/v), EDTA 83,2 g/l (p/v), para el ensayo con SRL.

**Azul de toluidina 0,2%,** para el zimograma.

### 5.5 ELISA

Solución de **tapizado:** PBS.

Solución de **lavado:** PBS, Tween20 0,05%.

Solución de **bloqueo:** PBS, BSA 2%, Tween20 0,05%.

Solución de **revelado:** TMB.

Solución de **parada:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M.

### 6. Columnas de cromatografía utilizadas.

Columna de **Amberlita IRC-50.** Utilizada para llevar a cabo una cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de  $\alpha$ SDI (Olson *et al.*, 1965).

Columna **Biogel P-10.** Utilizada para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular para la purificación de  $\alpha$ SDI (Gasset *et al.*, 1991).

Columna de **Ni<sup>2+</sup>-NTA** (HisTrap FF Crude, GE Healthcare). Columnas con níquel inmovilizado utilizadas para llevar a cabo una cromatografía de afinidad para la purificación de las inmunotoxinas objeto de estudio de esta tesis doctoral.

Columna **Superdex 200 10/300 GL** (GE Healthcare). Columna de exclusión molecular utilizada en el sistema FPLC Akta Purifier para la estimación de masas moleculares de proteínas en solución en condiciones nativas.

### 7. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Antígeno	Tipo	Aplicación/ Dilución	T <sup>a</sup> (°C)	T (h)	Origen
Anti $\alpha$ -sarcina	$\alpha$ -sarcina	<i>Rabbit</i>	WB/ 1:3000	25°C	3	UCM

## Materiales y Métodos

Anti poliHis-HRP	Histag	Mouse	WB/ 1:2000	25°C	1	Sigma-Aldrich
GAR-HRP	Rabbit IgG	Goat	WB/ 1:3000	25°C	1	BioRad
Anti poliHis-Alexa488	His-tag	Mouse	FACs/ 1:100	25°C	1	Sigma-Aldrich

### 8. Oligonucleótidos utilizados

Número	Secuencia 5'...3'	Amplificación
1	GCGGCCGCGCGGTGACCTGGACCTGC TTGAAC <u>ACC</u> CAGAAGAACCCCAAGACC AACAAGTATGAGACC	Inserción de la mutación <b>D9T</b> para la construcción de IMTXA33αSDI
2	ATTCATCAGTCGACTCAGTGGTGGTGG TGGTGGTGGTGTCTCGAGATGAGAGCA GAGCTTAAGTTCGCC <u>CGT</u> GTTCTCCTT AGTATGAGCAATGATACC	Inserción de la mutación <b>Q142T</b> para la construcción de IMTXA33αSDI
3	ATTCATCAGCGGTGACCTGGACCTGCT TGAAC <u>ACC</u> CAGAAGAACCCCAAGACC AACAAGTATGAGACC	Inserción de la mutación <b>D9T</b> para la construcción de αSDI
4	ATTCATCAGGATCCTCAATGAGAGCAG AGCTTAAGTTCGCC <u>CGT</u> GTTCTCCTTA GTATGAGCAATGATACCACAGAACAC	Inserción de la mutación <b>Q142T</b> para la construcción de αSDI
5	ATTCATCAGCGGCCGCTGGCGGAGGT GGCTCTGCGGTGACCTGGACCTGCTT GAACGACCAGAAG	Inserción del sitio de restricción <i>NotI</i> y el <i>linker</i> de 5 aa para el fragmento <i>NotI</i> -L5-αS
6	ATTTACAGTCGACTTATTAATGGTGAT GATGGTG	Oligo utilizado para la amplificación del fragmento <i>NotI</i> -L5-αS- <i>SaI</i> .
7	ATTCATCAGAATTCCAAGTGAAGCTGG AAGAGTCTGGCGGCGGATCT	Inserción del sitio <i>EcoRI</i> para la obtención del fragmento <i>EcoRI</i> -VHHEGFR-L5- <i>EcoRI</i>
8	ATTCATCAGAATTCTCTCGGTGGAGGC GGTCTCGATTGAGAGTG	Inserción del sitio <i>EcoRI</i> para la obtención del fragmento <i>EcoRI</i> -VHHEGFR-L5- <i>EcoRI</i>

# METODOLOGÍA

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

### 1.1 Amplificación de DNA por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA por PCR se han llevado a cabo en un termociclador Gene AmpSystem 2400 (Perkin-Elmer). Para la amplificación del DNA de las distintas construcciones se han utilizado 50 µl de una mezcla de reacción conteniendo: el molde de cDNA sobre el que amplificar, los oligonucleótidos indicados en el apartado de Materiales como cebadores (1 µM), dNTPs (200 µM cada uno) y la enzima Pfu polimerasa (Promega), junto con su tampón comercial. El programa base utilizado para la amplificación consistió en una primera etapa de desnaturalización del molde de DNA a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificación consistentes cada uno de ellos en: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 45 segundos de hibridación a una temperatura 10°C menor que la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos empleados en la reacción y 2 minutos de elongación a 72°C. Una vez transcurridos los ciclos de amplificación, se mantiene la muestra a 72°C durante 10 minutos, para finalizar la elongación.

### 1.2 Digestión de DNA mediante enzimas de restricción.

Las digestiones de DNA se realizaron siguiendo las temperaturas y tampones marcados por la enzima utilizada. En todas ellas, se utilizó BSA (albúmina de suero bovino) a 1 mg/ml. Los volúmenes finales de reacción fueron de 80 o 10 µl para las digestiones preparativas o analíticas, respectivamente. En la mayoría de los casos se mantuvo la digestión O/N.

### 1.3 Purificación de fragmentos de DNA.

La purificación se realizó con el kit comercial Wizard PCR preps (Promega). Una vez localizado y recortado el bloque del gel de agarosa donde se encuentra el fragmento de interés, se fundió mediante su incubación a 65°C, y se siguió el protocolo del kit. Finalmente, se eluyó el fragmento deseado en 50 µl de H<sub>2</sub>O.

### 1.4 Ligación de fragmentos de DNA.

La reacción de ligación entre los fragmentos de DNA de interés se llevó a cabo mediante la adición de la DNA ligasa del bacteriófago T4 (ThermoScientific), su tampón y ATP 1 mM. La reacción se mantuvo a 22°C durante 4 horas.

En los casos en los que los fragmentos a ligar tuviesen extremos romos, y para evitar la religación del plásmido digerido en lugar de la ligación entre los fragmentos, se utilizó el kit

## **Materiales y Métodos**

para desfosforilar (Thermoscientific) el fragmento correspondiente al plásmido digerido, previamente a la ligación con el inserto.

### **1.5 Electroforesis en geles de agarosa.**

Los geles de agarosa se prepararon al 0,7% (en el caso de plásmidos o fragmentos de DNA purificados) o al 1% (p/v) (en el caso de separar los fragmentos de DNA resultantes de la digestión) en TAE 1X. La electroforesis se desarrolló a 100 V durante 1 hora. Las muestras se aplicaron con el tampón de aplicación 6X. Una vez desarrollada la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio (1 µg/ml), observándose las bandas de DNA bajo la luz ultravioleta en un transiluminador Universal Hood II (Biorad).

### **1.6 Purificación de plásmidos de DNA-Miniprep.**

El DNA plasmídico se purificó con el kit comercial de Minipreps (ThermoScientific). Se partió de un cultivo de 5 ml de LB o LB soso, en función del antibiótico utilizado, junto con una colonia aislada de las bacterias transformadas. El cultivo se creció 24 horas a 37°C, con 220 rpm de agitación. Pasado ese tiempo, se recogieron las bacterias por centrifugación, y se resuspendieron en el tampón de resuspensión. Posteriormente se lisaron utilizando el tampón de lisis, y la reacción se paró con el tampón de neutralización, mediante el ajuste del pH de la mezcla. Se centrifugaron los extractos bacterianos para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante se introdujo en las columnas proporcionadas, cuya resina presenta afinidad por el DNA. Tras unos lavados con el tampón de lavado, el plásmido de DNA se eluyó en 75 µl de agua destilada autoclavada.

### **1.7 Purificación de plásmidos de DNA-Maxiprep.**

Una vez que se obtuvo un plásmido conteniendo la construcción de interés, se llevó a secuenciar mediante secuenciación Sanger al CAI de Genómica de la Facultad de Biología UCM. Si la secuencia resultaba ser correcta, se llevaba a cabo una Maxiprep, con el fin de obtener mayor cantidad de plásmido. Para ello, se utilizó el kit de Maxipreps (Quiagen), cuyo protocolo era básicamente idéntico al descrito anteriormente, pero partiendo de un cultivo bacteriano de 500 ml de LB o LB soso, y la elución del plásmido en la etapa final se llevó a cabo mediante adición de 500 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5-8).

### **1.8 Preparación de células competentes de *E. coli*.**

Para la preparación de alícuotas de células *E. coli* DH5αF' competentes se siguió el protocolo de Hanahan modificado, que incluye el uso de RbCl (Hanahan, 1983). Para ello, se crecieron las células en 5 ml de ψ-Broth a 37°C con agitación, hasta que alcanzaron una densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) de 0,3. Una vez alcanzado, se añadieron otros 95 ml de ψ-Broth

fresco, y las células se mantuvieron en condiciones de crecimiento hasta que se alcanzó una  $DO_{600nm}$  de 0,48. A continuación, se centrifugaron las células a 4°C, 2200 rpm durante 20 minutos, y el sedimento se resuspendió en 30 ml de tampón TfB1 frío, manteniéndose en hielo durante 90 minutos. Pasado ese tiempo, se sedimentaron las células, y se resuspendieron en 4 ml de TfB2 frío. Tras la completa resuspensión de las células, se mantuvieron en alícuotas de 0,2 ml a -80°C.

### 1.9. Transformación de células de *E. coli*.

Alícuotas de 0,2 ml de células competentes para ser transformadas se descongelaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, se añadió el DNA de interés (10 ng de DNA) y se mantuvo otros 15 minutos en hielo. La entrada del plásmido al interior de las células se llevó a cabo mediante choque térmico (4 minutos a 37°C, y posterior enfriamiento en hielo durante 2 minutos). Para la recuperación de la integridad de las membranas plasmáticas, y la expresión del gen de resistencia al antibiótico, se incubaron las células en 4 volúmenes de  $\psi$  Broth a 37°C con agitación. Pasado ese tiempo, se plaquearon diferentes volúmenes en placas de LB o LB soso en función del antibiótico que llevasen, y las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de las colonias transformadas.

### 1.10. Electroporación de células de *P. pastoris*

Para la electroporación de *P. pastoris*, y debido a la necesidad de linealizar el plásmido pPICZ $\alpha$ A, se llevó a cabo previamente la digestión de este con la enzima de restricción *Pme*I. El plásmido digerido se fenolizó, y el DNA se concentró y purificó mediante precipitación con etanol a -20°C y posterior centrifugación.

Se utilizaron 10  $\mu$ g del DNA digerido, y se añadió a las células electrocompetentes de *P. pastoris*. La mezcla se incubó 5 minutos en hielo, y se pasó a la cubeta de electroporación. Se dio un pulso de 5 ms, voltaje: 2,3 kV, capacitancia 25  $\mu$ F y resistencia 200 ohms, de acuerdo con las condiciones establecidas por el electroporador (Biorad) para el protocolo de *P. pastoris*, e inmediatamente se añadió 1 ml de sorbitol 1 M para favorecer la regeneración de la membrana. La mezcla se mantuvo en hielo 2 minutos, y posteriormente se incubó a 30°C en medio YPD durante 4 horas. Pasado ese tiempo se recogieron las células por centrifugación, y se plaquearon en placas de YPDS-agar con diferentes concentraciones de zeocina. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias transformadas.

## **Materiales y Métodos**

### **2. Técnicas de producción y purificación de proteínas.**

#### **2.1 Producción y purificación de $\alpha$ SDI.**

La producción de  $\alpha$ SDI en *E. coli* se realizó de acuerdo con lo descrito previamente para la  $\alpha$ -sarcina recombinante nativa (Lacadena *et al.*, 1994) Para ello, se crecieron bacterias RB791 transformadas con el plásmido pINPG $\alpha$ SDI en 100 ml de LB-Ampicilina (100  $\mu$ g/ml), a 30°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se pasó el cultivo a 2 L de medio mínimo con ampicilina, manteniéndose la incubación a 37°C, hasta que la DO<sub>600</sub> se encontró entre 0,7 y 0,8. En ese momento se añadió IPTG para una concentración final de 1 mM, y se indujo la expresión de la proteína durante 16 horas. A continuación, se recogieron las células por centrifugación, y el sedimento bacteriano se resuspendió en 60 ml de Tris 33 mM, EDTA 33 mM, pH 7. Se sometieron a un choque osmótico mediante una primera incubación con sacarosa (40%) a RT, y una segunda incubación en H<sub>2</sub>O fría. De esta manera se favorece la rotura de la pared celular, separándose la fracción periplásmica del sedimento celular por centrifugación. Por último, se lisaron las células mediante sonicación y se obtuvo la  $\alpha$ SDI perteneciente a la fracción soluble.

Para la purificación de  $\alpha$ SDI se juntaron las fracciones en las que se observó expresión de la proteína mediante análisis electroforético en PAGE-SDS. Seguidamente, se llevó a cabo una primera cromatografía de intercambio iónico en una resina Amberlita IRC-50, eluyéndose  $\alpha$ SDI con un contenido en NaCl de 0,6 M. El volumen del conjunto de fracciones que tenía proteína se concentró utilizando el sistema Centriprep 10 (Amicon). Una vez concentrado, se llevó a cabo una cromatografía de penetrabilidad en Biogel P-10. Una vez analizadas las distintas fracciones en las que se encontraba la proteína, se juntaron y dializaron frente a ácido acético 50 mM, pH 5 para su posterior liofilización.

#### **2.2 Producción y purificación de inmunotoxinas.**

El vector de expresión pPICZ $\alpha$ A fue el utilizado para la producción de inmunotoxinas a partir del sistema de expresión heterólogo de la levadura metilotrófica *P. pastoris* (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012; Tomé Amat *et al.*, 2012). Debido a que las levaduras necesitan para su crecimiento una mayor agitación y oxigenación que en el caso de bacterias, se cultivaron en Erlenmeyers tabicados, tapados en la parte superior con una gasa Miracloth (Merck) que permitía el intercambio gaseoso. Inicialmente se inoculó un precultivo de 100 ml de BMGY Zeocina 100  $\mu$ g/ml, con la levadura que ha incorporado el vector de expresión deseado durante 24 horas, a 30°C, 200 rpm. Posteriormente, el precultivo se distribuyó en 2 L de BMGY para su crecimiento óptimo, a 30°C y 200 rpm durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se centrifugó el cultivo y las células se resuspendieron en 1 L de BMMY para la inducción de la producción de las inmunotoxinas. Las condiciones de inducción se

optimizaron para cada inmunotoxina. Tras el período de inducción, se centrifugó el cultivo para obtener el medio extracelular.

Dicho medio se dializó varias veces frente al tampón fosfato sódico (Ver apartado 4.2 de Materiales). Una vez centrifugado y filtrado, el sobrenadante dializado se dejó pasando por una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA (GE Healthcare), utilizando una bomba peristáltica con un flujo máximo de 1 ml/min, recogiendo el volumen no retenido para su posterior análisis. Previo a la elución, se llevó a cabo un lavado con tampón de cromatografía y posteriormente con el mismo tampón conteniendo imidazol 20 mM. La elución de la proteína purificada se llevó a cabo utilizando tampón de cromatografía con imidazol 250 mM. La presencia de la inmunotoxina de interés en cada caso se analizó mediante electroforesis en PAGE-SDS. Las fracciones conteniendo la inmunotoxina purificada se juntaron y dializaron frente al tampón de cromatografía.

### 2.3 Liofilización de proteínas.

En los casos en los que se requirió el almacenamiento por tiempos prolongados, o la necesidad de concentrar las proteínas, se llevó a cabo la liofilización de las mismas. Para ello, en primer lugar, se dializó la disolución de proteínas frente a un tampón volátil, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM en el caso de las inmunotoxinas, o ácido acético 50 mM, pH 5 en el caso de  $\alpha$ SDI. Tras la diálisis, se centrifugó la disolución a 14.000 rpm, 4°C durante 15 minutos, para precipitar la proteína desnaturalizada a causa de la diálisis y, tras recoger el sobrenadante, se congeló utilizando N<sub>2</sub> líquido, y se liofilizó utilizando un liofilizador Lioalfa6 (Telstar).

### 2.4 Caracterización de proteínas mediante electroforesis.

Se desarrollaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS), para determinar la presencia, pureza, y masa molecular de las proteínas en condiciones reductoras. Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida-bisacrilamida (30:1) del 15%. Las muestras a analizar se disolvieron en tampón de aplicación 3X en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, como agente reductor, y se mantuvieron en ebullición (90°C) durante 15 minutos para su desnaturalización. Una vez aplicadas las muestras en el gel, se desarrolló la electroforesis con amperaje constante de 25 mA por gel, hasta que el azul de bromofenol, presente en el tampón de aplicación, alcanzó el final del gel. Posteriormente, se tiñó el gel usando azul de Coomassie durante 15 minutos, y se destiñó utilizando solución de desteñido hasta la visualización de las bandas deseadas. Las imágenes se obtuvieron con el transiluminador Universal Hood II (Biorad), utilizando el software Quantity One.

## **Materiales y Métodos**

### **2.5 Inmunodetección (*Western Blot*).**

Cuando se quiso llevar a cabo la inmunodetección de las inmunotoxinas, tras la electroforesis, se sumergió el gel durante 5-10 minutos en tampón de transferencia. Pasado ese tiempo, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de transferencia Inmobilon-P (Merck) utilizando un transferidor (Scieplas) a un amperaje constante de 0,9 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante 1 hora. A continuación, se incubó la membrana en tampón de bloqueo, y se añadió el anticuerpo primario según las condiciones indicadas para cada caso (Ver Apartado Materiales). Posteriormente, se lavó la membrana con tampón de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario, que en la mayoría de los casos fue un GAR-HRP (Biorad), a una dilución 1:3.000, durante 1 hora. Tras otro lavado, se procedió al revelado, utilizando la solución de revelado, hasta la visualización de las bandas, momento en el que se paró la reacción sumergiendo la membrana en H<sub>2</sub>O destilada. Las imágenes se obtuvieron mediante un transiluminador Universal Hood II (Biorad), utilizando el software Quantity One.

En los casos en los que la cantidad de proteína fue muy baja para utilizar la solución de revelado basada en DAB, se reveló mediante electroquimioluminiscencia (ECL), que presenta mayor sensibilidad, obteniéndose las imágenes en el aparato Chemidoc-it 810 Imager (Bioimaging Systems), con el software Vision Works.

## **3. Caracterización estructural de proteínas**

### **3.1 Cálculo del coeficiente de extinción.**

Los coeficientes de extinción ( $E^{0,1\%}$ ) de las proteínas purificadas se estimaron mediante el software ProtParam (ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics).

### **3.2 Espectroscopía de dicroísmo circular.**

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un dicrógrafo JASCO J-715. La concentración de proteína empleada fue de 0,1-0,2 mg/ml, y se utilizaron cubetas de cuarzo de 0,1 cm. Cada espectro resultante se obtuvo a partir del registro de 4 acumulaciones, en el caso del blanco, y 6 acumulaciones, en el caso de las muestras de proteína, con una velocidad de barrido de 40 nm/min. Para el estudio de la termoestabilidad de las proteínas, se calculó la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ), mediante el registro de la variación de la elipticidad molar por residuo (MWR) a 220 nm, en el intervalo de 20-80°C, con una variación de temperatura de 0,5°C/min. En todos los casos los espectros se registraron mediante el software Spectra Manager.

### 3.3 Espectroscopía de emisión de fluorescencia.

Los espectros de emisión de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C, que contaba con una lámpara de arco de xenón de 450 W. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 0,2 cm de paso óptico. La anchura de rendija utilizada fue de 4 nm, tanto para el haz de excitación (275 nm y 295 nm), como para el de emisión. El voltaje de los canales se ajustó en cada caso, de modo que la señal recibida se encontrase en los límites óptimos aconsejados. La contribución de tirosina se calculó como la diferencia entre los 2 espectros normalizados.

### 4. Caracterización de la actividad ribonucleolítica.

Todos los ensayos de caracterización de la actividad ribonucleolítica de la  $\alpha$ -sarcina o su variante no inmunogénica, incluidas en las diferentes construcciones de inmunotoxinas, se llevaron a cabo utilizando material y reactivos RNasa-free.

#### 4.1 Zimograma.

Para la evaluación de la actividad ribonucleolítica inespecífica de las ribotoxinas se llevó a cabo un zimograma (Blanck *et al.*, 1982). Para ello, se llevó a cabo un PAGE-SDS con poli adenina 0,3 mg/ml embebida en el gel separador, y se utilizaron muestras no reducidas, para permitir la posterior renaturalización de la proteína. Una vez finalizada la electroforesis, se llevaron a cabo lavados consecutivos con Tris 10 mM, pH 7,5 y con el mismo tampón conteniendo isopropanol (25%), para eliminar el SDS y permitir la renaturalización. Posteriormente se incubó el gel en Tris 0,1M pH 7,5 a 37°C durante 2 horas, para favorecer la actividad enzimática. Posteriormente, se tiñó el gel con azul de toluidina al 0,2%, y se lavó con agua hasta la aparición de las bandas, apareciendo estas sin tinción como consecuencia de la degradación del polinucleótido.

#### 4.2 Actividad frente a SRL (lazo sarcina-ricina).

Se partió de un oligonucleótido sintético, que imitaba la secuencia y estructura del SRL. (Kao *et al.*, 2001; García-Ortega *et al.*, 2010) La secuencia de este oligonucleótido era 5'-GGGAAUCCUGCUCAGUACGAGAGGAACCGCAGGUU-3' (La secuencia de corte por parte de la  $\alpha$ -sarcina aparece subrayada). El SRL (2  $\mu$ M) fue incubado en contacto con diversas cantidades de proteína durante 15 min a 37°C en un tampón Tris 50 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7,5. Para la visualización del resultado, se llevó a cabo un PAGE-SDS (acrilamida 19%, bis-acrilamida 0,5%, Urea 7 M) en tampón TBE 1X y posterior tinción con bromuro de etidio.

## Materiales y Métodos

### 4.3 Ensayo frente a ribosomas (Ensayo de reticulocitos).

Para la evaluación de la actividad ribonucleolítica específica de las ribotoxinas frente al SRL de ribosomas de mamífero, y la consiguiente liberación del fragmento de RNA característico de 400 nucleótidos (fragmento  $\alpha$ ), se pusieron en contacto las construcciones que contenían  $\alpha$ -sarcina con un lisado de reticulocitos de conejo libre de células (Promega) (Kao *et al.*, 2001; Martínez-Ruiz *et al.*, 2001). Para ello, se diluyó la muestra de reticulocitos con tampón A (1,5: 2,5), y se centrifugó para eliminar agregados. Se incubaron 50  $\mu$ L de la muestra de reticulocitos con diferentes cantidades de proteínas a ensayar, a RT con agitación durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, se añadieron 250  $\mu$ l de tampón B para parar la reacción, y el RNA fue purificado mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y una precipitación con isopropanol. Para la visualización del RNA ribosómico y del fragmento  $\alpha$ , se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) y paraformaldehído 16 % (v/v) en tampón MOPS. El gel fue posteriormente teñido con bromuro de etidio, y las bandas se visualizaron bajo luz UV con el transiluminador Universal Hood II.

### 5. Ensayos de agregación de lípidos

Con el objetivo de evaluar la capacidad de interacción de la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica con los lípidos de la membrana celular, se llevó a cabo un ensayo de agregación de liposomas, uno de los ensayos clásicos de caracterización funcional de las ribotoxinas, fundamentado en la interacción entre los aminoácidos básicos de la  $\alpha$ -sarcina y los fosfolípidos ácidos de la membrana (Gasset *et al.*, 1989).

Para ello, se prepararon vesículas de DMPG (1,2-dimiristoil,3-fosfatidil glicerol) de 100 nanómetros de diámetro, calentando los lípidos a 37°C, y posteriormente haciéndolos pasar por un extruder (Avanti Polo Lipids, Inc) para obtener vesículas lipídicas homogéneas (LUV, de Large Unilamellar Vesicles).

Tras la obtención de las vesículas, se analizó la capacidad de agregación lipídica de la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica registrando la variación de la absorbancia a 360 nm durante 900 segundos de una disolución con las vesículas de DMPG a 0,3  $\mu$ M, a la que se añadieron distintas concentraciones de  $\alpha$ SDI o  $\alpha$ SWT. El ensayo se llevó a cabo en tampón MOPS 50 mM; NaCl 0,1 M; EDTA 1 mM pH 7. Se utilizó un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) equipado con portacubetas termostatizado. Como control negativo del ensayo, se añadió tampón en vez de proteínas.

### **6. Caracterización de la interacción antígeno-anticuerpo.**

#### **6.1 Ensayo de unión mediante ELISA.**

Para estudiar la capacidad de unión de la nanoinmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S a su antígeno, EGFR, se llevó a cabo un ensayo de unión de la nanoinmunotoxina a EGFR inmovilizado en placas de ELISA. Para ello, se tapizaron placas de ELISA con EGFR (0,25  $\mu$ g/pocillo) a 37°C, O/N. Pasado ese tiempo, se llevaron a cabo varios lavados con tampón de lavado, y se bloquearon los pocillos con PBS-BSA 2%. A continuación, se añadió la nanoinmunotoxina a ensayar (1 $\mu$ M) incubándose durante 1 hora a RT. Posteriormente, se llevaron a cabo lavados con tampón de lavado, y se incubaron los pocillos con el anticuerpo de detección anti-poliHis-HRP durante 2 h a RT. Tras la incubación, los pocillos se lavaron nuevamente con tampón de lavado, y se incubaron con 100  $\mu$ l de tampón de revelado, parándose la reacción con 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Como control positivo de unión se utilizó el *nanobody* VHHEGFR y como control negativo se utilizó albúmina de suero bovino (BSA).

#### **6.2 Ensayo de unión mediante citometría de flujo.**

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar la capacidad de unión de las proteínas a sus respectivos antígenos en la superficie de membranas celulares, en condiciones nativas. Para ello, las diferentes células fueron levantadas, y alicuotadas en 1 ml de medio, a razón de 330.000 células/ml. Posteriormente se centrifugaron las células a 4°C, 1,6 g, 10 minutos, se lavaron con 500  $\mu$ l de PBS-BSA 1% e incubaron con 100  $\mu$ l de la concentración de proteína disuelta en tampón PBS-BSA 1%, a RT, con agitación durante 45 minutos. Posteriormente, se volvieron a centrifugar las células y se lavaron con 500  $\mu$ l de PBS-BSA 1%, y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de anticuerpo secundario anti-poliHis-Alexa488 (Ver Apartado Materiales) en tampón PBS-BSA 1% a RT durante 45 minutos. Pasado ese tiempo, se volvieron a centrifugar las células, se volvieron a lavar con PBS-BSA 1% y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de paraformaldehído (PFA) 1% en PBS hasta ser llevados al citómetro de flujo Scan (CAI). Los resultados se analizaron utilizando el software FlowJo.

### **7. Caracterización de la actividad enzimática de la enzima furina.**

Para analizar la incorporación del sitio de reconocimiento y corte de furina en la construcción IMTXA33fura $\alpha$ SDI, se llevó a cabo un ensayo enzimático de proteólisis con dicha enzima. Se disolvieron 0,1 mg de IMTXA33fura $\alpha$ SDI en 70  $\mu$ L tampón HEPES 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, X-Triton 0,5% a los que se añadieron 1  $\mu$ L de enzima furina (ThermoFisher), manteniendo la actividad enzimática durante 0, 3 y 24 horas a 37°C.

## **Materiales y Métodos**

Tras el tiempo de incubación, la reacción se paró mediante la adición de 35  $\mu$ l tampón de aplicación de electroforesis 3X conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol, calentándolo a 95°C durante 15 minutos. El resultado se analizó mediante electroforesis PAGE-SDS, y posterior tinción con azul de Coomassie. Como control interno de degradación inespecífica, se mantuvo una muestra a 37°C durante 24 horas sin adición de la enzima. Las mismas condiciones se llevaron a cabo para la inmunotoxina no inmunogénica sin sitio de reconocimiento de furina, IMTXA33 $\alpha$ SDI.

### **8. Caracterización de la estabilidad de proteínas.**

Para analizar la estabilidad estructural y funcional de las distintas proteínas producidas, se incubaron alícuotas de las diferentes inmunotoxinas producidas con FBS a 37°C (condiciones fisiológicas), durante 24, 48, 72 y 96 horas. De esta manera, se evaluaba la termoestabilidad, y resistencia a degradación por proteasas de las inmunotoxinas purificadas. La caracterización se llevó a cabo mediante inmunodetección por *Western Blot*, espectroscopía de dicroísmo circular, ensayo de reticulocitos para cuantificar la actividad ribonucleolítica específica y ensayo de unión mediante citometría de flujo frente a células antígeno positivas. Para el ensayo del *Western Blot*, y dicroísmo circular, las inmunotoxinas sólo se incubaron con PBS a 37°C, debido a que el elevado número de proteínas presentes en el suero dificultaba la ejecución e interpretación del resultado. En todos los casos se tomó una alícuota en FBS (o PBS) a tiempo 0, como control interno del ensayo.

### **9. Caracterización de la eficacia citotóxica *in vitro*.**

#### **9.1 Ensayo de inhibición de la biosíntesis de proteínas.**

Para evaluar la actividad citotóxica específica de las inmunotoxinas frente a las células, se analizó la capacidad de incorporación de leucina marcada radiactivamente por parte de estas, debido a que las ribotoxinas, al cortar el SRL, inactivan el ribosoma, e impiden a la célula incorporar aminoácidos para sintetizar sus proteínas. Siguiendo el protocolo descrito (Kao *et al.*, 2001), las células se incubaron en placas de 96 pocillos, en el medio y cantidad de células descritas para cada tipo celular. Pasadas 24 horas para su adhesión, se retiró el medio, y se añadieron 200  $\mu$ l de medio libre de suero con la concentración de proteína deseada, incubándose durante 72 horas, para permitir su acción citotóxica. Finalmente, se añadió a cada pocillo 1 mCi de L-4,5-<sup>3</sup>H-Leucina (Amersham, UK) durante 6 horas. A continuación, se retiró el medio, y los sedimentos celulares fueron fijados con ácido tricloroacético 5% (p/v) en PBS a RT durante 15 minutos. Tras una serie de lavados con

## **Materiales y Métodos**

100 µl de etanol frío (-20°C), los sedimentos celulares se disolvieron en 200 µl de NaOH 0,1 M; SDS 0,1% (p/v) y se incorporaron a viales de centelleo conteniendo 10 ml de líquido de centelleo. La señal de radiactividad incorporada fue registrada mediante un contador de centelleo Beckman LS3802. Como control de muerte, en vez de proteína se añadió DMSO (dimetilsulfóxido) 20%, mientras que para el control de viabilidad celular no se adicionó proteína. Se realizaron todas las muestras por cuatuplicado. El resultado se representó como porcentaje de biosíntesis de proteínas, siendo el 100% el porcentaje de radioactividad incorporada en las muestras control incubadas sin proteína, y se utilizó para calcular el valor IC<sub>50</sub> en el ensayo de viabilidad celular.

### **9.2 Ensayo de viabilidad celular por MTT.**

Para evaluar la muerte celular causada por las inmunotoxinas, también se llevó a cabo un segundo tipo de ensayo, en este caso un ensayo clásico de viabilidad celular por MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). Se sembraron los diferentes tipos celulares en placas de 96 pocillos, en el medio y cantidad de células descritas para cada tipo celular. Tras 24 horas en estufa de CO<sub>2</sub>, se aspiró el medio y se añadieron las proteínas cuyo efecto citotóxico se quería analizar, en 200 µl de medio libre de suero. Pasado el tiempo a estudiar, se añadió 20 µl de MTT a 5 mg/ml y se dejó incubando 3 horas. Posteriormente, se aspiró el medio, y se disolvieron los cristales de formazán formados por la actividad enzimática de las células vivas, capaces de reducir el MTT, con 100 µl de DMSO:Metanol (1:1). La cuantificación colorimétrica se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 570 nm menos la absorbancia de fondo de 655nm, utilizando un lector de placas (Biorad).

## **10. Caracterización inmunológica.**

### **10.1 Ensayo de estimulación de la división celular: Recuento de PBMCs.**

Este ensayo consiste en una primera aproximación a la capacidad inmunogénica de una proteína, y se basa en la estimulación de la división de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, mayoritariamente linfocitos y monocitos) cuando son activadas por un estímulo inmunogénico. El aislamiento de los PBMCs se llevó a cabo a partir de sangre completa de donantes sanos mediante un gradiente de Ficoll. En primer lugar, se diluyó la sangre 1/2 con PBS, y se añadieron 35 ml de sangre lentamente sobre 15 ml de Ficoll. Se centrifugó a 800 g, a RT, sin agitación y sin freno durante 20 minutos y se recogió la fracción correspondiente a los PBMCs. Esta fracción se lavó con 2 volúmenes de NaCl 0,9%, y tras cada lavado se centrifugó la muestra a 1600 g, con freno y aceleración, durante

## **Materiales y Métodos**

5 minutos. Se lisaron los eritrocitos con H<sub>2</sub>O miliQ, y tras el último lavado, se resuspendieron los PBMCs en medio RPMI y se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad celular de 50.000 células/pocillo. A las 24 horas, se añadieron diferentes concentraciones de las proteínas a ensayar. Como control de activación se añadió LPS (lipopolisacárido) (100 ng) y como control negativo se añadió medio sin suero. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Tras incubación durante 48 horas en estufa, a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, se contaron los PBMCs utilizando un hemocitómetro convencional o cámara de Neubauer.

### **10.2 Ensayo de proliferación de linfocitos mediante CFSE.**

Este ensayo se basa en la utilización de una sonda fluorescente, la carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE), para cuantificar la proliferación de linfocitos. Cuando el CFSE entra al interior de las células, es degradado por esterasas intracelulares formando un compuesto fluorescente. A medida que proliferan los linfocitos, la cantidad de CFSE en el interior de cada una de las células hijas va siendo menor, de manera que la disminución de la fluorescencia se corresponde con una mayor activación inmunológica (Palomares *et al.*, 2019).

Para la realización del ensayo, se sembraron PBMCs (5.000 células/pocillo) en medio RPMI, y se incubó con CFSE (5µM) a RT, en oscuridad, durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se lavaron las células 3 veces con 5 ml de PBS, centrifugando las células tras cada lavado a 800 g, durante 5 minutos. Se sembraron en los pocillos, con diferentes concentraciones de la proteína que se quería analizar. Como control positivo de activación, se usó LPS (100 ng) y como control negativo, medio RPMI.

A los 5 días, se midió la fluorescencia celular a 520nm por citometría de flujo, representando el índice de estimulación, como la intensidad de fluorescencia de cada tratamiento/intensidad de fluorescencia para el control positivo.

### **10.3 Ensayo de activación de THP-1-xBlue.**

Para analizar la respuesta inmunogénica de los monocitos frente a las diferentes inmunotoxinas, se usaron las células THP-1-xBlue (línea celular de leucemia humana utilizada como modelo de actividad de monocitos). Cuando estas células son activadas vía los TLR (Toll-Like-Receptor), se pone en marcha la cascada de señalización de NF-κB secretándose al medio extracelular una fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP). Esta activación se puede cuantificar colorimétricamente con el compuesto QUANTI-Blue, que se torna azul/morado en contacto con SEAP (Chanput *et al.*, 2014)

Para el ensayo, se siembran 200.000 células/pocillo, en 200  $\mu$ l de medio RPMI con zeocina (200  $\mu$ g/ml), y se incuban con diferentes concentraciones de la proteína a analizar en estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Como control positivo de activación, se añadieron 100 ng de LPS, y como control negativo medio de cultivo.

Pasadas 24 horas, se añadieron 20  $\mu$ l del sobrenadante a 180  $\mu$ l del compuesto QUANTI-Blue (InvivoGen) previamente atemperado, y se dejó incubando durante 6 horas. Midiéndose finalmente la absorbancia de cada pocillo a 620 nm utilizando un lector de placas (Biorad), se determinó el nivel de activación de los monocitos.

### 10.4 Ensayo de cuantificación de citoquinas mediante ELISA.

Para analizar la activación inmunológica de los PBMCs en contacto con las inmunotoxinas de manera más específica, además de su respuesta proliferativa, se cuantificó la secreción de diversas citoquinas al medio extracelular (Tordesillas *et al.*, 2008; Roth-Walter *et al.*, 2014). Para ello, se llevó a cabo un ELISA para cuantificar las siguientes citoquinas: IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$ .

Se sembraron PBMCs, a partir de 2 donantes, a razón de 50.000 células/pocillo en 100  $\mu$ L de medio RPMI. A las 24 horas, se añadió el estímulo en un volumen de 100  $\mu$ l, de tal manera que la concentración final del estímulo fuese de 0,5; 1 y 2  $\mu$ M; como control positivo de activación se utilizó LPS 100 ng, y como control negativo PBS. Cada tratamiento se realizó por triplicado. A las 48 horas, se llevó a cabo un recuento de PBMCs, para medir la proliferación celular con cada estímulo, mediante una cámara de Neubauer, representándose el Índice de Estimulación (Stimulation Index, SI), definido como el número de PBMCs de cada tratamiento dividido entre el número de PBMCs del control negativo.

Para la posterior cuantificación de citoquinas, se centrifugó cada cultivo a 1.500 rpm, a 4°C durante 10 minutos para separar el sedimento celular. Se recogieron los sobrenadantes, en los que se encontrarían las citoquinas secretadas, que se congelaron a -20°C. Todo el proceso de cultivo y estimulación se llevó a cabo en estufa a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%.

Una vez obtenidos los sobrenadantes de cada tratamiento, se llevó a cabo el ensayo de ELISA, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial para cada citoquina (Sigma-Aldrich). La descripción de las diferentes disoluciones utilizadas se detalla en el correspondiente apartado de Materiales. De manera general, se tapizó la placa de ELISA, con el anticuerpo de captura de la citoquina diluido en solución de tapizado, manteniéndose a 37°C, O/N. A continuación, se bloqueó cada pocillo con 300  $\mu$ l de la solución de bloqueo durante 1 hora a RT. Se añadieron 100  $\mu$ l del sobrenadante del cultivo de PBMCs a cada pocillo, y se incubaron durante 2 horas a RT. A continuación, se añadió el anticuerpo de

## **Materiales y Métodos**

detección de la citoquina, durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadió un HRP-Estreptavidina, para unirse al anticuerpo de detección durante 30 minutos, añadiéndose a continuación 100  $\mu$ L de solución de sustrato a cada pocillo. Una vez producido el viraje de color, se paró la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de solución de parada. Se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas. Para cada una de las citoquinas, se llevó a cabo una recta patrón con distintas cantidades de citoquinas, para interpolar posteriormente la medida de absorbancia de las muestras. Antes de cada incubación se incluyó una etapa de lavado por adición de 100  $\mu$ l de solución de lavado, secándose posteriormente el exceso vigorosamente.

### **11. Caracterización de la eficacia antitumoral *in vivo*.**

Todos los procedimientos que implicaron los ensayos *in vivo* se realizaron con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid y de la autoridad competente de la Comunidad Autónoma de Madrid, según lo establecido y regulado en el Real Decreto 53/2013.

La eficacia antitumoral *in vivo* de las diferentes inmunotoxinas se estudió mediante modelo de ratón xenoinjertado con células SW1222 o A431, dependiendo de la construcción a ensayar, utilizando ratones Balb/c *nude* de siete semanas de edad. Todos los estudios se llevaron a cabo en el Animalario del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) en Madrid. Los ratones, una vez ubicados en el animalario, se mantuvieron en un periodo de adaptación de siete días con acceso libre a alimentos y agua, previamente a la inoculación de las células tumorales.

Se partió de cultivos celulares en confluencia de células SW1222 o A431 que fueron tripsinizados y lavados tres veces en PBS. Las células se resuspendieron en el volumen adecuado de PBS para la administración de  $2 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ l de PBS-Matrigel (BD Biosciences) (1:1) a cada ratón. Para ello, se hicieron alícuotas de  $4 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS, que se mezclaron suavemente con 100  $\mu$ l de matrigel, conservándose en frío para evitar la gelificación del matrigel. La suspensión con las correspondientes células se inoculó bajo la piel en el flanco derecho de cada ratón. El crecimiento del tumor se determinó mediante la utilización de un calibre, calculando su volumen con la fórmula (ancho<sup>2</sup> x largo) x 0.52. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño superior a 50 mm<sup>3</sup> se comenzó el tratamiento. Para ello, los ratones se distribuyeron de forma aleatoria en los diferentes grupos experimentales (n= 5), existiendo para cada ensayo un grupo control al que se le suministró PBS, y dos o tres grupos de tratamiento por inmunotoxina a ensayar, correspondientes a la cantidad de inmunotoxina a ensayar (25 o 50  $\mu$ g de

inmunotoxina/dosis). El tratamiento consistió en la administración por vía intravenosa de seis dosis, mediante inyección cada 48 horas de 100  $\mu$ l de PBS o de inmunotoxina a la concentración deseada.

La evolución del crecimiento tumoral se realizó mediante determinación del volumen del tumor en cada ratón, cada dos días durante la duración del tratamiento. Paralelamente, los ratones fueron pesados tanto a su llegada al animalario como al inicio y finalización del experimento. Tras la finalización del tratamiento, en alguno de los ensayos se continuó con el registro del volumen del tumor, con el fin de estudiar la duración del efecto sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Así, el volumen de los tumores se midió del modo anteriormente descrito. En todos los ensayos, los animales fueron sacrificados, en caso de evidencia de sufrimiento, o para evitar un posible sufrimiento potencial causado por un crecimiento desproporcionado del tumor, a partir de un volumen de 2.000  $\text{mm}^3$ , o a partir del día 30 desde el inicio del ensayo, como límite temporal del experimento.

### **12.- Métodos asociados al estudio con nanopartículas de oro**

#### **12.1 Síntesis y caracterización de AuNS.**

Se han sintetizado nanoestrellas de oro (AuNS) mediante el método de crecimiento asistido por semillas (Yuan *et al.*, 2012). Dicha síntesis se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Andrés Guerrero del Dpto. de Química Física de la UCM.

En primer lugar, se sintetizaron las semillas, a partir de  $\text{HAuCl}_4$ . Para ello, a partir de 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  agitándose en ebullición, se añadieron 30 ml de citrato sódico (3%) y 2 ml de  $\text{Au}^{3+}$  50mM, formándose las semillas. Una vez formadas las semillas clúster, se procedió al crecimiento de las nanoestrellas de oro. Para ello, a partir de 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , se añadieron 3 ml de la muestra conteniendo las semillas clúster, 1,25 ml de  $\text{Au}^{3+}$  50 mM, 250  $\mu$ l de HCl 1 M, 1,25 ml de ácido ascórbico 100 mM, y 2,5 ml de  $\text{Ag}^+$  10 mM, manteniéndose la mezcla a 27°C a lo largo del tiempo. Para favorecer la estabilización de las nanoestrellas, se añadieron 4 mg de PEG-SH.

A continuación, se llevó a cabo la funcionalización de las AuNS mediante la introducción del complejo ANTACo<sup>II</sup>. Para ello, se añadió en primer lugar una disolución de ácido lipoico 10 mM, que se adicionó al precipitado de nanoestrellas durante 4 horas a RT. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con tampón HEPES 20 mM pH 8 a 9.000 rpm durante 30 minutos, resuspendiéndose el precipitado final en 500  $\mu$ l de HEPES 20 mM. Para la activación del grupo carboxílico del ácido lipoico, y que tuviese lugar la reacción con aminas primarias dando lugar a amidas se utilizó EDC 35 mM (N'(3-

## Materiales y Métodos

Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimina clorhidrato) y NHS 35 mM (N-hidroxisuccinimida), que se dejaron reaccionando durante 30 minutos a RT.

Por último, se introdujo el complejo ANTACo<sup>II</sup>, preparando por separado una disolución de ANTA (N<sub>α</sub>, N<sub>α</sub>-Bis(carboximetil)-L-lisina hidrato) 100 mM y mezclándola con otra disolución de cloruro de cobalto (II) 150 mM. De la disolución final se adicionaron 500 μl a las nanoestrellas. Se eliminó el exceso de los reactivos mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 45 minutos, resuspendiendo el sedimento en un volumen final de 2 ml de tampón HEPES 20 mM.

La caracterización de las nanoestrellas de Au se llevó a cabo mediante espectroscopía del UV-Vis, ya que la interacción entre la radiación electromagnética y las nanopartículas de oro es dependiente del tamaño y forma de estas nanopartículas.

También se estudió la morfología y el tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), que, a diferencia de la microscopía óptica, utiliza un haz de electrones como fuente de emisión a través de una muestra delgada de tejido, para producir una imagen bidimensional en una pantalla fosforescente. El microscopio utilizado fue el modelo JEOL JEM1400, del Centro Nacional de Microscopía. Este microscopio posee una tensión de aceleración de 40 kV a 120 kV, en pasos de 33 V y cañón termoiónico con filamento de W o LaB6. Para la visualización de las muestras, se añadieron 10 μl de la muestra sobre rejillas de cobre, recubiertas con un polímero y con carbono amorfo, dejando que se evaporasen a RT.

### 12.2 Caracterización de la unión AuNS-proteína.

Para la optimización de las condiciones de unión entre las nanoestrellas de Au y la proteína de interés (se utilizó en primer lugar la proteína scFvA33, y posteriormente la inmunotoxina completa, IMTXA33αS), se ensayaron en primer lugar distintas *ratios* de concentración Nanoestrella Au/ Proteína. Se incubaron en agitación durante 1 hora a 4°C las distintas disoluciones con una concentración de proteína de 5 μM y una concentración de nanoestrellas con concentraciones variables entre 50 y 0,05 pM. Posteriormente se centrifugó a 5.000 rpm, 10°C durante 10 minutos recogiendo en el sobrenadante la proteína no unida. Se resuspendió el sedimento en 200 μL de tampón fosfato sódico y se mantuvo en agitación a 4°C durante 10 min. Pasado ese tiempo, se centrifugó nuevamente a 5.000 rpm, 10°C durante 10 minutos, separándose el sobrenadante (Lavado inespecífico) y el sedimento con el complejo AuNS-Proteína unida. El sedimento se resuspendió en 200 μL de tampón fosfato sódico, EDTA 6 mM, y se dejó incubando durante 15 min, a RT con agitación. Se centrifugó nuevamente a 5.000rpm, 10°C, 10 minutos, obteniéndose en el sobrenadante la proteína liberada del complejo (Sobrenadante tras la liberación). Las

distintas alícuotas se analizaron mediante *Western Blot* usando un anticuerpo anti poliHis-HRP, detectándose las bandas mediante ECL.

Una vez determinada la *ratio* de concentración Nanoestrella Au/Proteína en la que se observaba mayor presencia de proteína en la alícuota “Complejo AuNS-Proteína unida”, se determinó el tiempo de incubación óptimo para una mayor presencia de proteína en la alícuota “Complejo AuNS-Proteína unida”. Para ello, se incubó la proteína 5  $\mu$ M y las nanoestrellas Au 5pM durante 1, 4, 8, 12 y 24 horas a 4°C en agitación. Las diferentes fracciones se recogieron y analizaron siguiendo el mismo protocolo indicado anteriormente.

Tras la optimización de las condiciones de unión, como la *ratio* concentración Nanoestrellas Au/Proteína y tiempo de incubación de las Nanoestrellas Au con la proteína, se procedió a evaluar la capacidad de liberación de la proteína del complejo con la AuNS, para lo cual, la alícuota “Complejo AuNS-Proteína unida” se resuspendió en tampón fosfato sódico con o sin EDTA 60mM, analizándose nuevamente mediante inmunodetección.

Con el fin de determinar si la unión de la proteína a las nanopartículas era específica de la interacción del cobalto de las nanopartículas con el Histag de la proteína, una vez determinadas las condiciones de unión, se repitió el ensayo de unión con las AuNS recubiertas de PEG, sin la incorporación del grupo ANTA-CO<sup>II</sup>.

Estos ensayos se llevaron a cabo inicialmente con la proteína scFvA33. Una vez determinadas las condiciones óptimas se analizó la unión de las nanoestrellas de Au con IMTXA33 $\alpha$ S, con el fin de determinar si se comportaba igual que scFvA33.

### 12.3 Caracterización del complejo AuNS-proteína

#### 12.3.1 Caracterización morfológica y espectroscópica del complejo AuNS-proteína.

Se preparó una disolución del complejo AuNS-scFvA33 a una concentración de 2,5 pM-2,5  $\mu$ M en tampón fosfato sódico, que se depositó en una rejilla de cobre recubierto de carbón para la visualización en el TEM Jeol JEM 1400. Para la caracterización espectroscópica, se realizó un espectro de absorbancia en el rango UV-Visible (300 nm-900 nm) utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu). Como control, tanto del análisis morfológico como espectroscópico, se utilizó una disolución de Nanoestrellas de Au 2,5 pM en tampón fosfato sódico.

## **Materiales y Métodos**

### *12.3.2 Caracterización de la funcionalidad de la proteína en el complejo AuNS-proteína.*

#### A) Caracterización de la capacidad de unión específica a células GPA33+ del complejo AuNS-proteína.

El análisis de la capacidad de unión del complejo AuNS-proteína se llevó a cabo mediante citometría de flujo (Ver apartado Materiales y Métodos) utilizando células SW1222, GPA33-positivas. Para ello, en primer lugar, se analizó la capacidad de unión del complejo AuNS-scFvA33 a distintas concentraciones (10 nM - 5  $\mu$ M), sobre las células SW1222, representando el porcentaje de células marcadas fluorescentemente. Como control positivo del ensayo, se utilizó el dominio marcador scFvA33 sin unirse a las nanoestrellas.

Posteriormente se analizó la capacidad de unión del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, de manera idéntica que el apartado anterior, utilizando IMTXA33 $\alpha$ S libre como control positivo.

#### B) Caracterización de la actividad ribonucleolítica del complejo AuNS-proteína.

Para evaluar la actividad ribonucleolítica del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, causada por la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina presente en dicho complejo, se llevó a cabo el ensayo de reticulocitos frente a ribosomas, descrito anteriormente (Ver apartado Materiales y Métodos: Ensayo de Reticulocitos).

Se analizaron distintas cantidades de complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S (correspondiendo a 2, 6 y 12 pmoles de IMTXA33 $\alpha$ S), llevándose a cabo la reacción en presencia del tampón C, en lugar del tampón A, debido a la presencia de EDTA 10 mM en este último (Ver apartado Materiales: 4.4 Ensayos de actividad RNasa), que implicaría la separación de los componentes del complejo. Nuevamente, se utilizó la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S como control positivo.

### *12.3.3 Caracterización de la internación del complejo AuNS-proteína.*

Con el fin de determinar la internación del complejo AuNS-scFvA33 en el interior de las células, se llevó a cabo un ensayo mediante microscopía de fluorescencia, para observar la presencia de scFvA33 (fracción proteica del complejo) marcada con el fluoróforo Alexa555, mientras que para la visualización de las nanoestrellas del complejo, se realizó microscopía electrónica de transmisión.

#### A) Visualización de la internación del complejo mediante microscopía de fluorescencia.

Para determinar la correcta internación de la fracción proteica del complejo AuNS-scFvA33, fue preciso en primer lugar marcar la proteína scFvA33 con el fluoróforo Alexa555, previo a la unión con las nanopartículas.

## Materiales y Métodos

Siguiendo las indicaciones del Kit "Alexa Fluor 555 Protein Labeling Kit" (Invitrogen), a partir de una alícuota de scFvA33Histag a 1 mg/ml se adicionó NaHCO<sub>3</sub> 1 M, pH 8 y la sonda fluorescente Alexa555 (44,6 nmol) y se mantuvo en agitación en oscuridad durante 1 hora a RT. Pasado ese tiempo, se añadió tampón Tris 1 M pH 8,8 para parar la reacción. Se llevaron a cabo varias diálisis frente a tampón fosfato sódico con el fin de retirar el exceso de sonda fluorescente sin unir. Se calculó el DOL como  $DOL = \frac{Abs\ 555nm}{150000*[scFvA33]}$ , para determinar la eficiencia del marcaje fluorescente.

Tras la obtención de scFvA33-Alexa555, se llevó a cabo el experimento de microscopía de fluorescencia. Se sembraron células SW1222 en placas de 24 pocillos con un cubreobjetos de 12 nm, a razón de 80.000 células/pocillo, incubándose 24 horas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se añadieron los diferentes componentes (scFvA33-Alexa555 1 μM, AuNS-scFvA33 Alexa555 1 μM-1 pM, o AuNS 1 pM) en un volumen de 300 μL de RPMI, durante 24 horas.

Las muestras se lavaron tres veces con 300 μL de PBS. A continuación, se fijaron las células mediante adición e incubación con paraformaldehído (PFA) 4%, durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, se realizaron tres lavados con PBS, y se fijaron las muestras en los cubres a un portaobjetos con ProlongGold-DAPI (Invitrogen), para poder visualizar los núcleos. Las muestras ya preparadas se guardaron a 4°C, hasta su utilización en microscopía.

### B) Visualización de la internación del complejo mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para analizar la internación mediante la visualización de las nanopartículas del complejo AuNS-Proteína, se llevó a cabo el ensayo mediante microscopía electrónica de transmisión. Al igual que en el caso anterior, se sembraron células SW1222 en placas de 24 pocillos, a razón de 80.000 células/pocillo, y se incubaron de forma similar a lo indicado anteriormente. Posteriormente, se añadieron los estímulos (AuNS 0,5 pM; AuNS-scFvA33 0,5 pM-0,5 μM; AuNS-IMTXA33αS 0,5 pM-0,5 μM) en 1 mL de RPMI, durante 24 horas.

Pasado ese tiempo, se levantaron las células mediante tripsinización, y se fijaron las células con una disolución de paraformaldehído (4%) y glutaraldehído (2,5%) a 4°C durante 5 horas. Se realizaron tres lavados de las células con tampón HEPES 200 mM y se dejaron secar a RT durante 24 horas, realizándose tres nuevos lavados con PBS, seguidos de una segunda fijación con una disolución de tetraóxido de osmio (tetraóxido de osmio: H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 1:1) durante 1 hora a RT, con el fin de aumentar el contraste de las imágenes. A continuación, se efectuó una deshidratación con 500 μL de concentraciones crecientes de

## Materiales y Métodos

acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%) mediante incubaciones de 15 min a RT para cada concentración. A continuación, se llevó a cabo la infiltración en resina de tipo epoxy, para lo cual se resuspendió el sedimento de células en diferentes *ratios* de resina:acetona (1:3, 1:1, 3:1), dejando actuar cada concentración de resina durante 1 hora. Finalmente se dejaron secar los sedimentos durante 48 horas a 70°C. Mediante unas pinzas EPON se cortaron las muestras por ultramicrotomía en secciones de 60 nm de espesor para su observación al microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1400.

### 12.3.4 Caracterización del potencial terapéutico del complejo AuNS-Proteína

#### A) Potencial citotóxico del complejo AuNS-Proteína sin efecto fototérmico.

Para evaluar la eficacia antitumoral tanto de las nanoestrellas con o sin cobalto, como del complejo formado por las nanoestrellas unidas a scFvA33 o IMTXA33αS, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad mediante análisis de viabilidad por MTT (Ver apartado Materiales y Métodos: Caracterización de la actividad citotóxica).

#### B) Potencial citotóxico del complejo AuNS-scFvA33Histag con efecto fototérmico.

Para evaluar la citotoxicidad del complejo AuNS-scFvA33 provocada por el efecto fototérmico de las nanoestrellas al ser irradiadas por luz infrarroja, se sembraron células SW1222 en placas de 96 pocillos con 10.000 células/pocillo, en 200 μL de RPMI. A las 24 horas, se añadió el estímulo, nanoestrellas o el complejo AuNS-scFvA33, a diferentes concentraciones. Tras 24 horas de incubación, se irradiaron los pocillos con un láser CW (MDL H808, con una fuente PSU-H-LED, Changchun New Industries, China), a 808 nm, con una potencia de 800mW, durante 2 minutos/ pocillo; estando la altura de la fuente del láser a 29 nm, siendo el diámetro del haz infrarrojo de 5-8 mm, y las dimensiones de la superficie del láser de 155x77x60 mm<sup>3</sup> (López de Pablo *et al.*, 2014). Tras la irradiación de los pocillos, se evaluó la viabilidad celular por MTT (Ver apartado Materiales y Métodos: Ensayo de viabilidad celular por MTT).

# Resultados

## Resultados

### BLOQUE A

# PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INMUNOTOXINAS NO INMUNOGÉNICAS BASADAS EN UNA VARIANTE NO INMUNOGÉNICA DE LA $\alpha$ -SARCINA

En este primer bloque, se presentan los resultados relativos a la expresión y caracterización de inmunotoxinas no inmunogénicas, a partir de la inclusión de una variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI).

El esquema seguido corresponde a la caracterización de cada una de las proteínas caracterizadas; siendo estas:

- 1.  $\alpha$ SDI.** Variante de la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, incluyendo las mutaciones D9T y Q142T que la convierten en una proteína no-inmunogénica; (Jones *et al.*, 2016). Se ha llevado a cabo su caracterización estructural y funcional, comparándola con la  $\alpha$ -sarcina recombinante ( $\alpha$ SWT), paso previo a su inclusión en el diseño optimizado de nuevas inmunotoxinas.
- 2. IMTXA33 $\alpha$ SDI.** Inmunotoxina recombinante, cuyo dominio marcador es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) frente al antígeno GPA33 (glicoproteína A33) y cuyo dominio tóxico es la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI). Se ha llevado a cabo su caracterización estructural, funcional e inmunológica, comparándola con la inmunotoxina original conteniendo  $\alpha$ SWT como dominio tóxico (IMTXA33 $\alpha$ S) ya descrita previamente (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012).
- 3. IMTXA33fur $\alpha$ SDI.** Inmunotoxina recombinante optimizada, similar a la indicada anteriormente, pero que incluye entre ambos dominios, un sitio de reconocimiento y corte por la proteasa furina, una enzima transmembrana que se encuentra en endosomas tempranos y aparato de Golgi, y es responsable de la maduración proteolítica de diferentes proteínas. Esta variante se ha diseñado con el fin de facilitar la liberación del dominio tóxico, al citoplasma celular (Alewine *et al.*, 2015; Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019). Se ha llevado a cabo su caracterización estructural, funcional e inmunológica.

## Resultados Bloque A

### 1. Diseño, purificación y caracterización de $\alpha$ SDI.

#### 1.1. Obtención del vector de expresión (pINPG $\alpha$ SDI)

La obtención del vector de expresión requirió una etapa previa de clonaje sobre el plásmido pEMBL $\alpha$ S, debido a la presencia de 2 sitios de restricción para *Bst*EII en el plásmido pINPG $\alpha$ S.

Brevemente, se amplificó el fragmento *Bst*EII- $\alpha$ SDI-*Bam*HI utilizando los oligos 3 y 4 (Ver apartado Materiales y Métodos, Oligonucleótidos utilizados) y como molde el plásmido pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ S. El producto de dicha amplificación y el plásmido pEMBL $\alpha$ S se digirieron con las enzimas de restricción *Bst*EII y *Bam*HI, obteniéndose el nuevo plásmido pEMBL $\alpha$ SDI mediante la ligación de los fragmentos de interés obtenidos.

Posteriormente, el plásmido pEMBL $\alpha$ SDI se digirió con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI, y el fragmento resultante, *Xba*I- $\alpha$ SDI-*Bam*HI se clonó en el vector pINPG $\alpha$ S digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el vector de expresión pINPG $\alpha$ SDI. El nuevo plásmido pINPG $\alpha$ SDI se secuenció para comprobar que presentaba la secuencia correcta.

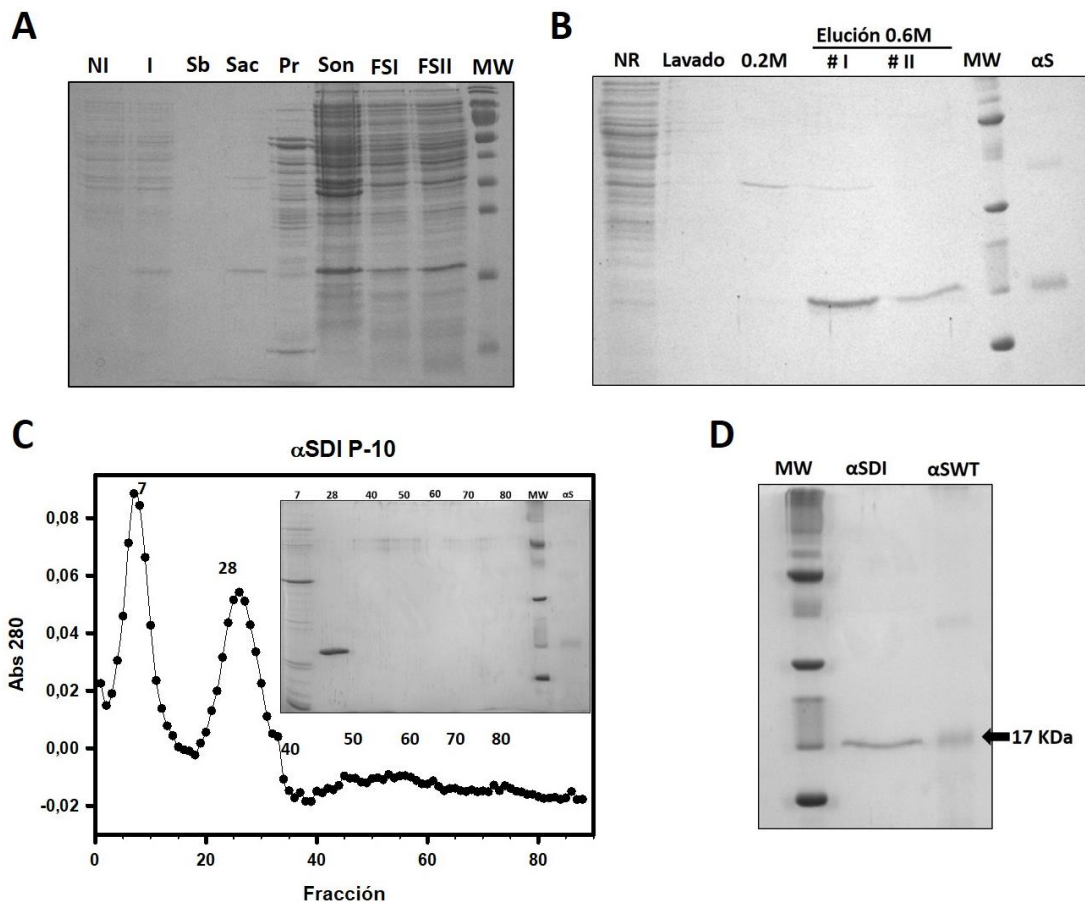
#### 1.2. Producción y purificación de $\alpha$ SDI.

La producción de  $\alpha$ SDI se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* RB791 tras la transformación de esta cepa con el vector de expresión pINPG $\alpha$ SDI. Una vez llevada a cabo la transformación, y tras el crecimiento de distintas colonias en placas de LB-agar Ampicilina, se llevó a cabo una prueba de expresión, para analizar la expresión de  $\alpha$ SDI por parte de distintas colonias. El resultado se analizó mediante inmunodetección (*Western Blot*) utilizando un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina, seleccionándose la colonia que expresaba una mayor cantidad de  $\alpha$ SDI para su posterior producción a gran escala.

La producción a gran escala se llevó a cabo como aparece descrito en el apartado de Materiales y Métodos, y a lo largo de la purificación se llevó a cabo un análisis electroforético en PAGE-SDS, con el fin de determinar la presencia/ausencia de la  $\alpha$ SDI en las diferentes fracciones y pasos de la purificación (**Figura A.1**). Tras la inducción y la obtención de las diversas fracciones celulares en las primeras etapas de producción, se detectó la presencia de  $\alpha$ SDI soluble en las fracciones periplásmica tras los diversos ciclos de sonicación (**Figura A.1A**). Las fracciones de interés se juntaron y se incubaron con la resina Amberlita IRC-50 a 4°C durante 16 horas. Posteriormente se separó por decantación el volumen no retenido y se dieron lavados sucesivos con el tampón de cromatografía y con dicho tampón conteniendo 0,2 M NaCl. Finalmente, se eluyó  $\alpha$ SDI por la adición en dos etapas del tampón con 0,6 M NaCl. Las diferentes fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico se analizaron mediante electroforesis en PAGE-SDS

## Resultados Bloque A

(Figura A.1B). Como se observa, se detectó la presencia de  $\alpha$ SDI en las fracciones obtenidas por la elución con tampón 0,6 M NaCl. Estas fracciones conteniendo  $\alpha$ SDI se juntaron y concentraron para su aplicación en una cromatografía de penetrabilidad en Biogel P-10. A partir del perfil de elución obtenido por determinación de los valores de  $A_{280}$  se seleccionaron diferentes fracciones que se analizaron por PAGE-SDS para detectar la presencia de  $\alpha$ SDI (Figura A.1C), obteniéndose  $\alpha$ SDI purificada a homogeneidad (Figura A1.D) con un rendimiento de 2 g/L de cultivo.



**Figura A.1. Análisis electroforético de las diferentes etapas de la producción y purificación de  $\alpha$ SDI.** Tinción con azul de Coomassie del análisis electroforético correspondiente a: (A) Alícuotas de las diferentes fracciones celulares; cultivo no inducido (NI), cultivo inducido (I), sobrenadante tras centrifugación (Sb), choque osmótico con sacarosa (Sac) fracción periplásmica (Pr), fracción sonicada (Son), las fracciones solubles de los ciclos de sonicación (FSI y FSII) ; (B); Alícuotas de las diferentes fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico con Amberlita IRC-50: No retenido, lavado con tampón de cromatografía; lavado con tampón de cromatografía conteniendo 0,2 M de NaCl y elución en dos etapas con el mismo tampón incluyendo 0,6 M NaCl. (C) Perfil de elución de la cromatografía de penetrabilidad en Biogel P-10. *Inset*: Análisis electroforético de alícuotas de las fracciones seleccionadas. (D) Alícuota de  $\alpha$ SDI purificada. En todos los casos MW corresponde con patrones de masa molecular y  $\alpha$ S con un control de la ribotoxina.

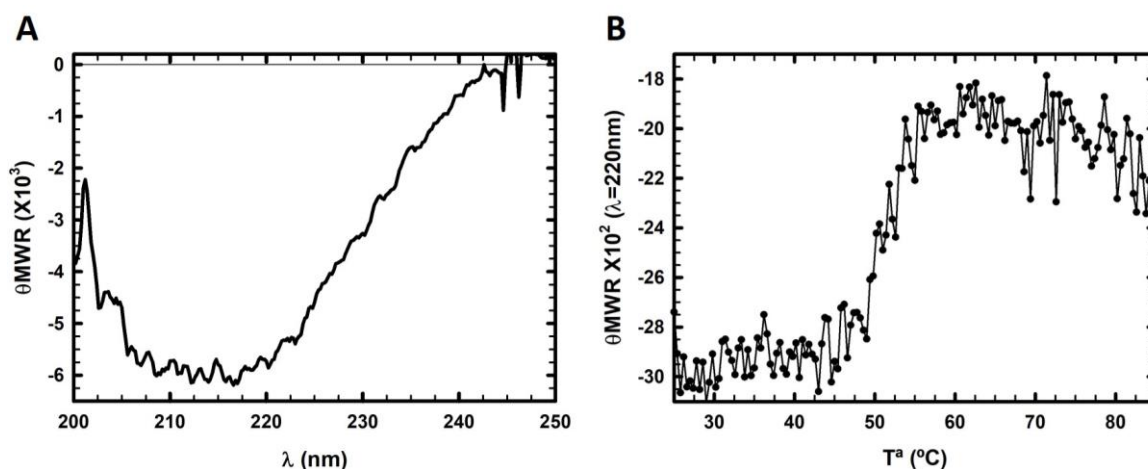
## Resultados Bloque A

### 1.3. Caracterización estructural de $\alpha$ SDI

La caracterización estructural de  $\alpha$ SDI, se llevó a cabo mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano (Ver apartado Materiales y Métodos, caracterización estructural), con el fin de obtener información sobre el plegamiento y estructura secundaria de la proteína, así como sobre su termoestabilidad mediante la determinación de su  $T_m$  (Ver apartado Materiales y Métodos, caracterización estructural).

Como se observa en la **Figura A.2A**,  $\alpha$ SDI presenta un plegamiento compatible con el de una proteína globular soluble en disolución, con un predominio mayoritario de estructura secundaria  $\beta$ , similar al descrito para la  $\alpha$ -sarcina nativa fúngica y recombinante (Martínez-del-Pozo *et al.*, 1988; Lacadena *et al.*, 1994).

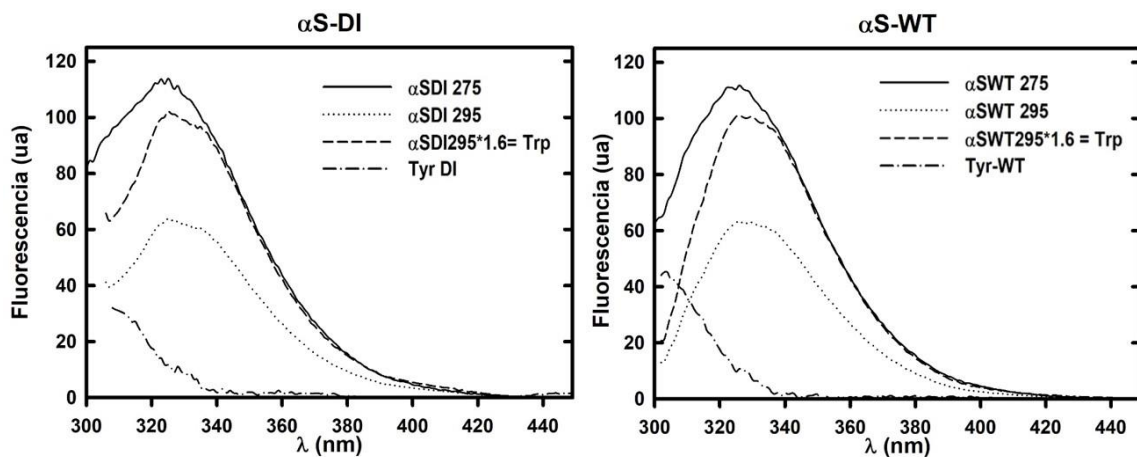
Por otro lado, a partir del registro de la elipticidad molar por residuo a 220 nm en función de la temperatura, se obtuvo un valor de  $T_m$  de  $\alpha$ SDI de 52°C (**Figura A.2B**), siendo idéntica a la descrita para la  $\alpha$ SWT fúngica (Lacadena, 1997).



**Figura A.2. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de  $\alpha$ SDI.** A) Espectros de CD en el UV-lejano de  $\alpha$ SDI (0,2 mg/ml). Se representa  $\theta_{MRW}$ , elipticidad molar por residuo, expresada como: grado $\cdot$ cm $^2$  $\cdot$ dmol $^{-1}$ . Los espectros se realizaron en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1 M pH 7,4 con una concentración de proteína de 0,2 mg/ml. B)  $T_m$  de  $\alpha$ SDI.

## Resultados Bloque A

La caracterización estructural se completó con el registro de los espectros de emisión de fluorescencia de  $\alpha$ SDI y  $\alpha$ SWT recombinante (**Figura A.3**), observándose que la contribución de tirosina (Tyr) y de triptófano (Trp) era igual en ambas proteínas, por lo que la incorporación de las mutaciones no inmunogénicas en  $\alpha$ SDI no implicó ningún cambio estructural a nivel de estructura secundaria, ni en el entorno de estructura terciaria de los residuos aromáticos.



**Figura A.3. Espectros de emisión de fluorescencia** de  $\alpha$ SDI (izquierda) y de  $\alpha$ SWT recombinante (derecha). En ambos casos se muestran los espectros obtenidos por excitación a 275 nm (línea continua); a 295 nm (línea punteada); contribución de Trp (línea discontinua) y de Tyr (línea de rayas y puntos).

### 1.4 Caracterización funcional de $\alpha$ SDI.

El diseño y caracterización inicial de  $\alpha$ SDI (Jones *et al.*, 2016) se centró directamente en el análisis de su inmunogenicidad y de su citotoxicidad *in vitro*. Sin embargo, no se llevó a cabo una caracterización más exhaustiva de su actividad ribonucleolítica ni de su capacidad de interacción con fosfolípidos ácidos, ambos responsables de sus propiedades citotóxicas. Por ello, se ha profundizado en su caracterización funcional, antes de plantear su inclusión como dominio tóxico en nuestros diseños de inmunotoxinas.

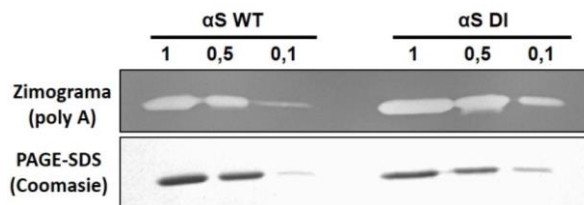
#### 1.4.1. Caracterización de la actividad ribonucleolítica.

Para evaluar la actividad ribonucleolítica de  $\alpha$ SDI, se llevaron a cabo los ensayos descritos y establecidos por nuestro grupo para la  $\alpha$ -sarcina (Lacadena *et al.*, 2007; Olombrada *et al.*, 2017).

En primer lugar, se realizó un zimograma, para determinar su actividad ribonucleolítica inespecífica sobre un homopolímero de poli adenina (polyA) embebido en un gel de poliacrilamida, empleándose distintas cantidades de  $\alpha$ SDI y de  $\alpha$ SWT (**Figura A.4**).

## Resultados Bloque A

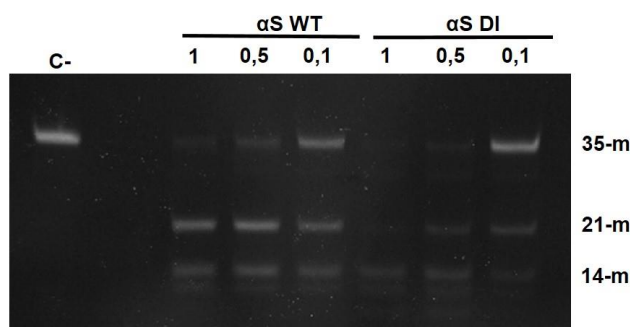
Como se observa,  $\alpha$ SDI mantuvo la actividad ribonucleolítica inespecífica, siendo ésta ligeramente mayor que la descrita para el caso de la  $\alpha$ SWT. La prácticamente idéntica intensidad en las bandas de las 2 proteínas patentes por el PAGE-SDS teñido con azul de coomassie indica que esta diferencia de actividad sería intrínseca a la actividad enzimática de  $\alpha$ SDI, y no sería debida a una diferencia en la cantidad de proteína ensayada.



**Figura A.4. Estudio de la actividad RNasa inespecífica de  $\alpha$ SDI** en comparación con  $\alpha$ SWT. Se muestra el resultado del análisis electroforético en condiciones no reductoras del zimograma, tras tinción con azul de metileno (arriba) y tras tinción con azul de Coomassie (abajo) de las mismas muestras aplicada en dos PAGE-SDS en condiciones no reductoras, utilizando poly A embebido en los geles como sustrato.

Por otro lado, una de las principales características de las ribotoxinas fúngicas, y de la  $\alpha$ -sarcina en este caso particular, es su extraordinaria especificidad ribonucleolítica frente a una región altamente conservada en el RNAr de la subunidad grande de los ribosomas, concretamente en la zona conocida como lazo sarcina-ricina (SRL), que implica una horquilla formada por el tetrabucle GAGA. Su acción sobre el SRL libera un pequeño fragmento de RNA de 400 nucleótidos, conocido como fragmento  $\alpha$  (Lacadena *et al.*, 2007; Olombrada *et al.*, 2017).

Para evaluar el mantenimiento de la actividad ribonucleolítica específica de  $\alpha$ SDI se realizaron dos ensayos diferentes. En primer lugar, se ensayó si era capaz de cortar un oligorribonucleótido sintético que imitaba la secuencia y la estructura SRL (Ver apartado Materiales y Métodos, Ensayo de SRL). (Figura A.5). En la figura se observa actividad RNasa frente al SRL sintético en función de la concentración de ribotoxina utilizada, tanto para  $\alpha$ SWT como para  $\alpha$ SDI.



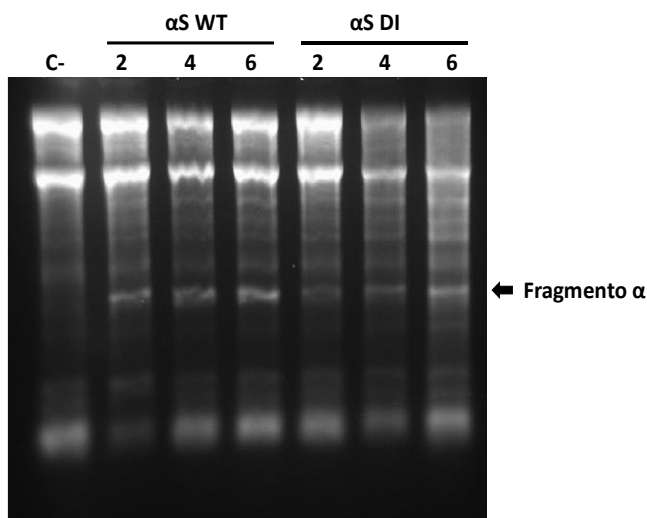
**Figura A.5. Ensayo de actividad ribonucleolítica sobre SRL**, utilizando distintas concentraciones de  $\alpha$ SDI y de  $\alpha$ SWT. C-, es un control negativo realizado en ausencia de ribotoxina. Se muestra la movilidad electroforética correspondiente a los oligonucleótidos de 21-mer y de 14-mer resultantes del corte del SRL de 35-mer. Se ensayaron 1; 0,5 y 0,1  $\mu$ M de ribotoxina.

De modo similar a lo observado en el zimograma,  $\alpha$ SDI presentaría una mayor actividad ribonucleolítica

## Resultados Bloque A

respecto a  $\alpha$ SWT, de acuerdo con la mayor desaparición de la banda correspondiente a la banda de 35-mer observada ya a 0,5  $\mu$ M de  $\alpha$ SDI, concentración a la cual prácticamente no se detectó el fragmento de 35 mer. No obstante, no se observó correlación entre la disminución de la intensidad del fragmento de 35 mer y un incremento en la intensidad del fragmento de 21 mer, que sí se aprecia en el caso del fragmento de 14 mer en el caso de  $\alpha$ SDI. Ello podría ser debido a la existencia de degradación inespecífica del fragmento de 21 mer por la propia  $\alpha$ SDI.

Finalmente, para comprobar que  $\alpha$ SDI era ribonucleolíticamente funcional y específica frente a su sustrato, los ribosomas, se realizó un ensayo con un lisado de reticulocitos libre de células, analizándose la liberación del fragmento  $\alpha$ .



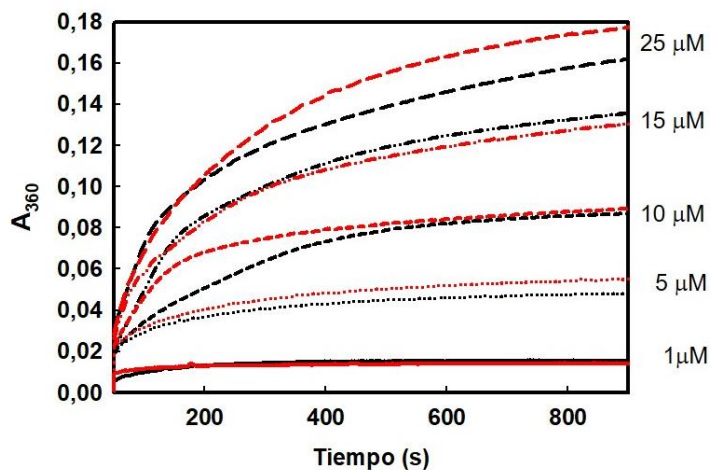
**Figura A.6. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica frente a reticulocitos,** comparando  $\alpha$ SDI con  $\alpha$ SWT. El C- es tampón sin ribotoxina. Se ensayaron 2, 6 y 12 pmoles de  $\alpha$ SDI y de  $\alpha$ SWT recombinante. Se indica con una flecha la banda correspondiente al fragmento  $\alpha$ .

Los resultados mostraron (**Figura A.6**) que  $\alpha$ SDI era ribonucleolíticamente funcional y específica frente a los ribosomas, como se deduce de la liberación del fragmento  $\alpha$ . Además, esta actividad fue dependiente de la concentración, pues la intensidad del fragmento  $\alpha$  aumentó a medida que se incrementó la concentración de ribotoxina ensayada.

### 1.4.2. Caracterización de la interacción con lípidos.

Una vez comprobado que  $\alpha$ SDI mantenía las características ribonucleolíticas de la ribotoxina original, se evaluó su capacidad para interactuar con lípidos. Como se ha mencionado en la introducción, la  $\alpha$ -sarcina es capaz de atravesar las membranas lipídicas de células transformadas o infectadas por virus, debido a alteraciones de su permeabilidad (Olson *et al.*, 1965), a través de la interacción de los residuos cargados positivamente de la  $\alpha$ -sarcina con los fosfolípidos ácidos presentes en las membranas (Gasset *et al.*, 1989).

## Resultados Bloque A



**Figura A.7. Ensayo de agregación de vesículas de DMPG** tras incubación con diferentes concentraciones de  $\alpha$ SDI (negro) y de  $\alpha$ SWT (rojo). Se registró la absorbancia a 360 nm a lo largo de 15 minutos (900s).

Como se observa en la figura (Figura A.7) la agregación de las vesículas de DMPG causado por las interacciones de la  $\alpha$ -sarcina implica un aumento en la  $A_{360}$ , observándose que la pendiente de la curva va aumentando a medida que se incrementa la ratio proteína: lípido.

El comportamiento observado para  $\alpha$ SDI fue similar al de  $\alpha$ SWT recombinante, utilizado como control, con pendientes similares para las diferentes concentraciones de ribotoxinas utilizadas. Por tanto,  $\alpha$ SDI mantenía intacta la capacidad de interacción con vesículas formadas por fosfolípidos ácidos.

Para evaluar la capacidad de  $\alpha$ SDI de interactuar con lípidos, se llevó a cabo un ensayo de agregación de vesículas de DMPG, uno de los ensayos establecidos y descritos por nuestro grupo para la caracterización de las ribotoxinas (Gasset *et al.*, 1989; Oñaderra *et al.*, 1993).

Como se observa en la figura (Figura A.7) la agregación de las vesículas de DMPG causado por las interacciones de la  $\alpha$ -sarcina implica un

### 2. Diseño, purificación y caracterización de IMTXA33 $\alpha$ SDI

En este apartado se exponen los resultados obtenidos en el diseño, producción, purificación y caracterización, estructural y funcional, de una variante no inmunogénica de la inmunotoxina basada en  $\alpha$ SDI, dirigida contra el antígeno tumoral GPA33, específico de cáncer colorrectal (**Figura A.8**).

#### 2.1 Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI.

Para la obtención del vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI se amplificó mediante PCR el fragmento  $\alpha$ SDI, utilizando los oligos 1 y 2 para la incorporación de las mutaciones no inmunogénicas D9T y Q142T (Jones *et al.*, 2016) y como molde el plásmido pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ S. Una vez obtenido el fragmento de PCR, se digirió con las enzimas *NotI* y *SaI*, obteniéndose el fragmento *NotI*- $\alpha$ SDI-*SaI*. El plásmido pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ S se digirió con las mismas enzimas llevándose a cabo la ligación entre el fragmento pequeño *NotI*- $\alpha$ SDI-*SaI* y el fragmento grande, obteniéndose el vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI (**Figura A.8**). El vector de expresión se secuenció comprobándose que presentaba la secuencia correcta.



**Figura A.8.** Diagrama esquemático mostrando la secuencia codificante (A) y proteica correspondiente al modelo de estructura en disolución (B) de la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ SDI. Se destacan los diferentes componentes del cDNA de la inmunotoxina. De izquierda a derecha, el factor  $\alpha$ , el dominio marcador scFvA33, el dominio tóxico correspondiente a la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica y el tag de histidinas para la posterior purificación. En cuanto a los dominios estructurales de la inmunotoxina, se muestra el dominio marcador scFvA33 y el dominio tóxico constituido por  $\alpha$ SDI.

#### 2.2 Producción y purificación de IMTXA33 $\alpha$ SDI

La producción de IMTXA33 $\alpha$ SDI se llevó a cabo en la cepa Bg11 de la levadura *P. pastoris*, mediante electroporación con el vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI. Con la mezcla de electroporación se sembraron placas de cultivo con diferentes concentraciones de zeocina para seleccionar posteriormente aquellas colonias con alto nivel de expresión, de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

## Resultados Bloque A

Así, se llevó a cabo una prueba de expresión a pequeña escala con las diferentes colonias, con el fin de determinar qué colonia era capaz de producir mayor cantidad de proteína, así como las condiciones óptimas de expresión. El nivel de expresión de las diferentes colonias se analizó mediante *Western Blot*, observándose en todos los casos un máximo de expresión a las 24 horas de inducción.

A partir de una de las colonias que presentó una mayor expresión de IMTXA33 $\alpha$ SDI, se llevó a cabo su producción y purificación siguiendo la metodología descrita en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos, y ya empleada con otras variantes de inmunotoxinas producidas en el grupo de investigación. De este modo, tras 24 horas de inducción en medio BMMY a 25°C, el cultivo se centrifugó, y el

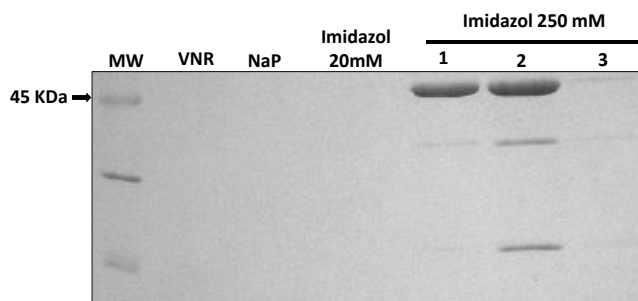
medio extracelular se dializó frente a tampón fosfato 50 mM, NaCl 0.1M, pH 7.5, para su posterior aplicación en una cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa.

A partir de las diferentes alícuotas recogidas en las distintas etapas de la cromatografía de afinidad, se llevó a cabo su análisis electroforético mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras (**Figura A.9**).

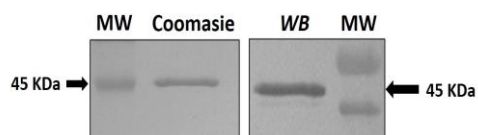
Como se observa en la figura, la inmunotoxina se detectó en las primeras fracciones del eluido con imidazol 250 mM. La masa molecular de 45 KDa obtenida, fue coherente con el esperado, de acuerdo con los componentes de la inmunotoxina.

Por otro lado, también se observó un patrón de bandas de degradación muy minoritario, correspondiente seguramente a la escisión de ambos dominios.

Se juntaron las fracciones conteniendo la inmunotoxina y se dializaron en bolsas de diálisis de 25 KDa de diámetro de poro, frente a tampón de cromatografía, eliminándose el imidazol, y los productos de degradación. De



**Figura A.9. Análisis electroforético mediante PAGE-SDS de las distintas alícuotas recogidas durante el proceso de purificación.** Se indica: VNR, volumen no retenido en la columna; NaP, lavado de la columna con tampón fosfato sódico; Imidazol 20mM, lavado de la columna con tampón fosfato sódico Imidazol 20mM; Imidazol 250 mM, las diferentes alícuotas obtenidas mediante la elución con tampón fosfato sódico imidazol 250 mM.



**Figura A.10. Análisis electroforético mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie (izquierda) y Western-Blot (derecha) utilizando un anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina y revelado mediante DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la fracción final purificada de IMTXA33 $\alpha$ SDI (1  $\mu$ g).**

este modo se logró purificar a homogeneidad la inmunotoxina no inmunogénica IMTXA33 $\alpha$ SDI con un rendimiento de 1 mg/L de medio de inducción (**Figura A.10**).

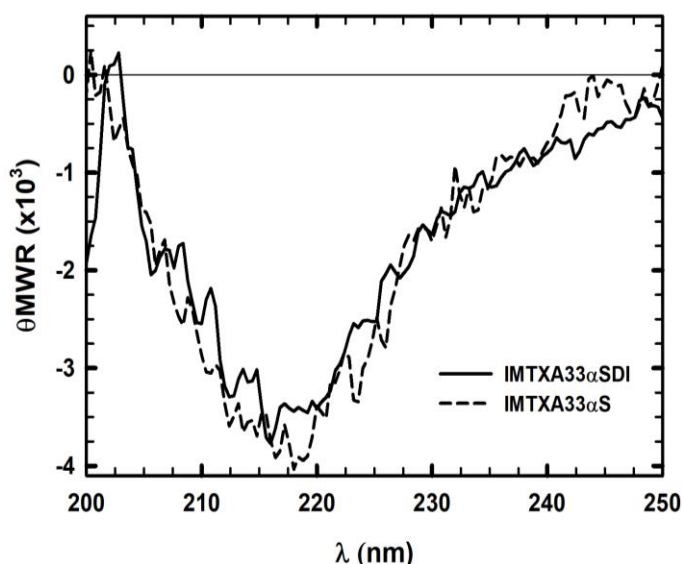
### 2.3 Caracterización estructural de IMTXA33 $\alpha$ SDI

Existe una íntima relación estructura-función en las proteínas, por la cual la adecuada funcionalidad de las proteínas está íntimamente ligada a la estructura de la proteína global, y al adecuado plegamiento de cada uno de sus dominios en particular.

Una vez purificada a homogeneidad la inmunotoxina no inmunogénica, se confirmó su identidad molecular mediante inmunodetección y se determinó su coeficiente de extinción al 0,1% ( $E^{0,1\%}$ ) de la proteína,

mediante el software ProtParam, obteniéndose un valor de 1,6 (cm.mg/ml)<sup>-1</sup>

Para obtener información acerca del plegamiento de la proteína, y la composición de los diferentes elementos de estructura secundaria en la proteína ( $\alpha$ -hélice, lámina  $\beta$ , estructura aleatoria) se registró el espectro de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de IMTXA33 $\alpha$ SDI (**Figura A.11**).



**Figura A.11. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de IMTXA33 $\alpha$ SDI (línea continua) y de IMTXA33 $\alpha$ S (línea discontinua).** En ambos casos se utilizó una concentración de 0,2 mg/ml en tampón fosfato sódico.  $\theta_{MWR}$  representa la elipticidad molar por residuo como grados x cm<sup>2</sup> x dmol<sup>-1</sup> para las distintas longitudes de onda.

El resultado, mostrado en la figura confirmó que la nueva inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ SDI presentaba un plegamiento coherente con el de una proteína globular en disolución, semejante a la ya descrita para IMTXA33 $\alpha$ S (Carreras-Sangrá *et al.*, 2012), con predominio de lámina  $\beta$ , lo cual es coherente con la estructura secundaria de cada uno de sus 2 dominios componentes: el scFvA33 (Carmichael *et al.*, 2003, Wilkinson *et al.*, 2009) y la  $\alpha$ -sarcina (Martínez del Pozo *et al.*, 1988; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000).

## Resultados Bloque A

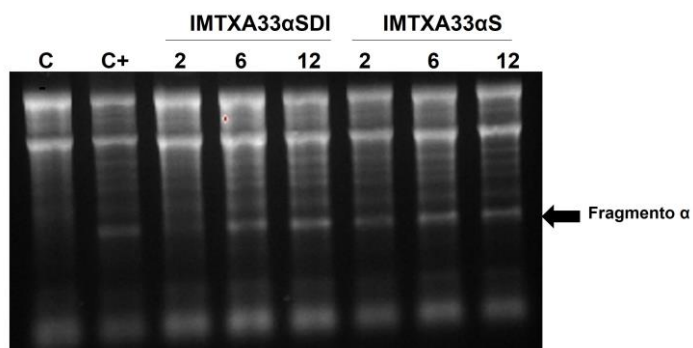
### 2.4 Caracterización funcional de IMTXA33 $\alpha$ SDI

La caracterización funcional consistió en la evaluación de cada uno de los dominios de la inmunotoxina por separado. Así, en primer lugar, se analizó si el dominio tóxico ( $\alpha$ SDI) mantenía su capacidad ribonucleolítica, llevándose a cabo un ensayo de reticulocitos, tal y como se ha descrito anteriormente (Ver apartado Materiales y Métodos). Por otro lado, para la caracterización funcional del dominio marcador, se llevó a cabo un ensayo de unión mediante citometría de flujo, utilizando células SW1222, GPA33+.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad frente a dichas células, con el fin de evaluar la acción conjunta de ambos dominios y el efecto terapéutico de la inmunotoxina.

#### 2.4.1 Caracterización del dominio tóxico de IMTXA33 $\alpha$ SDI.

Para la evaluación del dominio tóxico, se llevó a cabo un ensayo de reticulocitos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, que permite caracterizar la actividad ribonucleolítica específica de las ribotoxinas. Como se muestra en la **Figura A.12** la incubación del lisado de reticulocitos con diferentes cantidades de IMTXA33 $\alpha$ SDI produjo la liberación del fragmento  $\alpha$  característico, siendo esta liberación mayor a medida que se incrementaba la cantidad de inmunotoxina ensayada, y similar a la producida por la inmunotoxina original. Así, se confirmó que la nueva variante no inmunogénica mantenía la actividad ribonucleolítica de la inmunotoxina original.



**Figura A.12. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica frente a reticulocitos** comparando la actividad de IMTXA33 $\alpha$ SDI con la de IMTXA33 $\alpha$ S. En la imagen se muestra el gel de agarosa del ensayo. Como control negativo (C-) se usó tampón y como control positivo (C+) se usó  $\alpha$ -sarcina WT 2 pmol. De IMTXA33 $\alpha$ SDI y IMTXA33 $\alpha$ S se ensayaron 2, 6 y 12 pmol. La flecha indica la posición del fragmento  $\alpha$ .

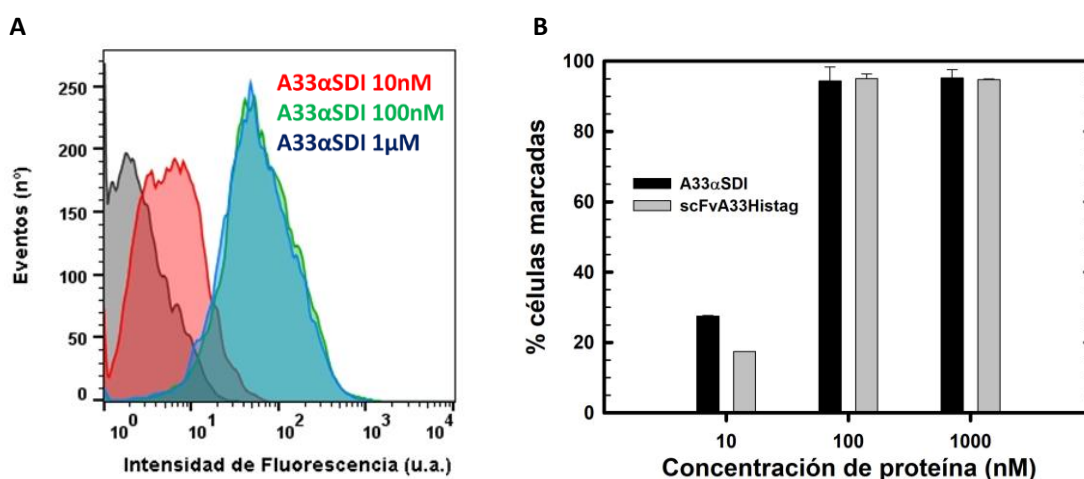
#### 2.4.2 Caracterización del dominio marcador de IMTXA33 $\alpha$ SDI.

Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que el dominio marcador scFvA33 es capaz de reconocer y unirse específicamente a células que presentan el antígeno GPA33 en su membrana, como las células SW1222, de carcinoma de colon

## Resultados Bloque A

primario, o las células AspC1, de carcinoma pancreático (Tomé-Amat *et al.*, 2012; Carreras-Sangrá *et al.*, 2012).

Por ello, se estudió la capacidad de unión específica de IMTXA33 $\alpha$ SDI a células SW1222, empleando diferentes concentraciones de inmunotoxina en ensayos de unión mediante citometría de flujo, utilizando como control el dominio marcador scFvA33Histag. Los resultados obtenidos, se muestran en la **Figura A.13**. Como se observa en la figura, IMTXA33 $\alpha$ SDI se unió de forma específica a las células SW1222, observándose que a medida que aumenta la concentración de IMTXA33 $\alpha$ SDI, se produce un aumento de la fluorescencia, que se relaciona con un mayor número de moléculas unidas por célula, alcanzándose la saturación en torno a 100 nM. Por otro lado, la cuantificación de la unión (Figura A.13B), mostró que la capacidad de IMTXA33 $\alpha$ SDI de reconocer y unirse específicamente a las células en condiciones de saturación es la misma que la observada con scFvA33.

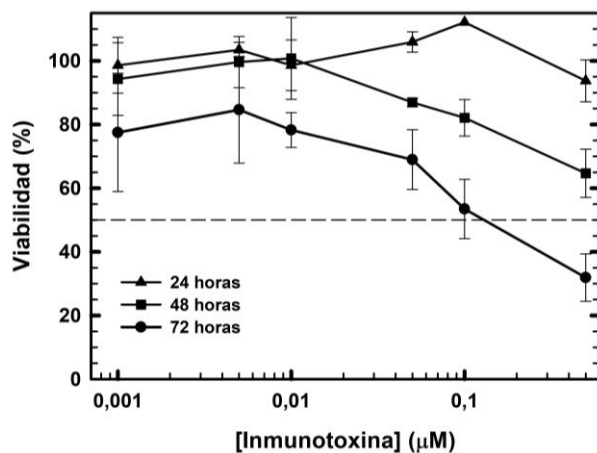


**Figura A.13. Ensayo de unión mediante citometría de flujo de IMTXA33 $\alpha$ SDI sobre células SW1222.** A) Se muestra la intensidad de fluorescencia obtenida tras incubación de las células SW1222 con distintas concentraciones de inmunotoxina. B) Cuantificación del porcentaje de células marcadas tras incubación con IMTXA33 $\alpha$ SDI (negro) o scFvA33Histag (gris).

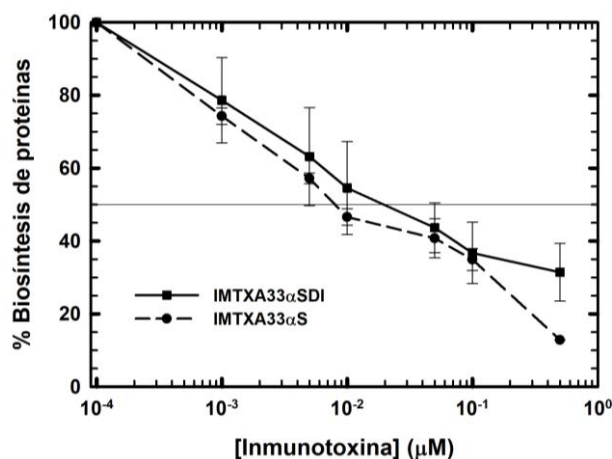
### 2.4.3 Caracterización de la capacidad citotóxica de IMTXA33 $\alpha$ SDI.

Una vez evaluada la funcionalidad por separado de ambos dominios de la inmunotoxina, se procedió a la caracterización citotóxica *in vitro* de la inmunotoxina frente a las células diana. Para ello, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de citotoxicidad: ensayos de viabilidad celular clásicos basados en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT (Ver apartado Materiales y Métodos, ensayos de citotoxicidad), y ensayos de inhibición de biosíntesis de proteínas basados en la menor incorporación de Leu-H<sup>3</sup> por parte de las células, siendo este último el ensayo utilizado habitualmente para analizar la citotoxicidad

## Resultados Bloque A



**Figura A.14. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT.** Se representa la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas de incubación de las células SW1222 con distintas concentraciones de IMTXA33αSDI. La línea discontinua indica el 50% de viabilidad celular.



**Figura A.15. Ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas.** Se analiza la inhibición de la biosíntesis sobre células SW1222 de IMTXA33αSDI (línea continua) o frente a su variante inmunogénica IMTXA33αS (línea discontinua) a las 72 horas de incubación. La línea horizontal indica el 50% de viabilidad celular.

específica de las ribotoxinas, o de las inmunotoxinas derivadas de ellas (Sangrà *et al.*, 2012; Tomé-Amat *et al.*, 2012).

En primer lugar, para el ensayo de viabilidad clásico por MTT, se sembraron células SW1222, y se analizaron distintas concentraciones de IMTXA33αSDI (0,001 μM-0,5 μM) a diferentes tiempos. Como se observa en la **Figura A.14**, se produjo una disminución de la viabilidad celular en función de la concentración de IMTXA33αSDI, obteniéndose una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 0,15 μM, a las 72 horas de incubación.

En cuanto al ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas, este se realizó por incubación con distintas concentraciones de IMTXA33αSDI con células SW1222 durante 72 horas (**Figura A.15**). Como se observa en la figura, la citotoxicidad de IMTXA33αSDI fue similar a la obtenida y descrita previamente con IMTXA33αS (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012), con una IC<sub>50</sub> alrededor de 20 nM.

### 2.4.4 Caracterización de la estabilidad de IMTXA33αSDI

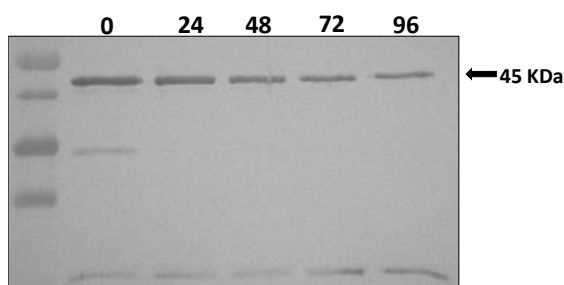
La integridad estructural y el mantenimiento de la funcionalidad de las inmunotoxinas en las condiciones del entorno fisiológico es fundamental tanto para el correcto desarrollo de su actividad citotóxica *in vitro*, como para el desempeño de su actividad antitumoral *in vivo*. Por este motivo, como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

## Resultados Bloque A

Metodología para el estudio de la estabilidad en condiciones fisiológicas de las inmunotoxinas).

Para la efectiva aplicación terapéutica de inmunotoxinas, estas deben mantener su integridad estructural y su funcionalidad en condiciones fisiológicas, a 37°C, y en un entorno en el que se dan interacciones con proteínas plasmáticas presentes en el torrente sanguíneo. Por este motivo, se estudió la estabilidad estructural y funcional de la inmunotoxina por incubación en FBS a 37°C, tal y como se describe en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos. Para ello, se procedió a la incubación de IMTXA33 $\alpha$ SDI 1  $\mu$ M con FBS (para los ensayos de funcionalidad) o PBS (para la integridad estructural mediante *Western Blot*) a 37°C durante 24, 48, 72 y 96 horas, utilizándose una alícuota de t=0 como control interno del ensayo.

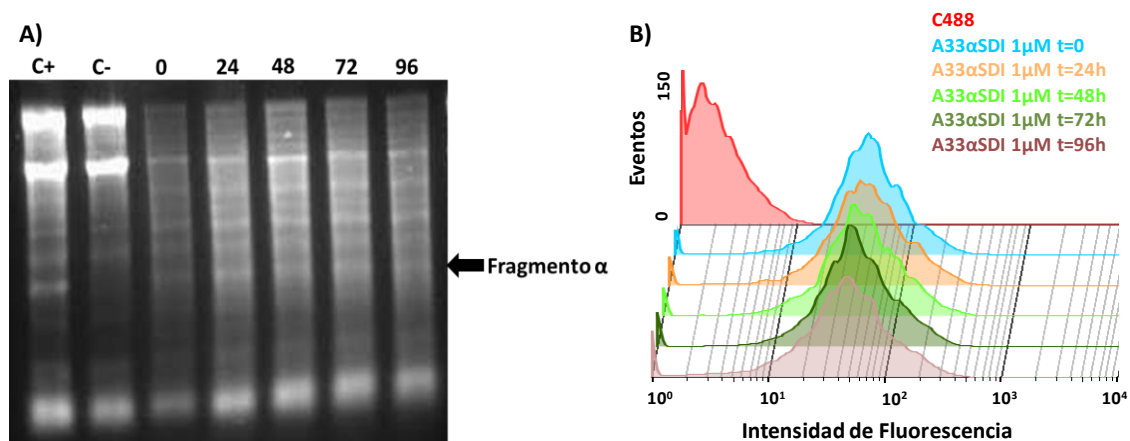
Como se observa en la **Figura A.16**, el análisis electroforético y posterior inmunodetección con un anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina de las alícuotas de IMTXA33 $\alpha$ SDI a diferentes tiempos de incubación, no mostró una pérdida significativa de la integridad de la inmunotoxina, siendo algo mayor a partir de las 72 horas de incubación, apreciable por un aumento de la banda inferior, correspondiente a la  $\alpha$ -sarcina libre del dominio marcador.



**Figura A.16. Ensayo de estabilidad de la integridad de IMTXA33 $\alpha$ SDI, mediante inmunodetección por *Western Blot* de diferentes alícuotas de IMTXA33 $\alpha$ SDI, incubadas con PBS a 37°C durante 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Para su revelado se utilizó un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina y se reveló con DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

En cuanto al mantenimiento de la funcionalidad del dominio tóxico, la actividad ribonucleolítica de IMTXA33 $\alpha$ SDI se mantuvo prácticamente intacta para los diferentes tiempos de incubación analizados (**Figura A.17A**), sin que se observase en este caso una disminución de la actividad a partir de las 72 horas. Del mismo modo, en cuanto a la capacidad de reconocimiento y unión del dominio marcador (**Figura A.17B**), esta se mantuvo estable a todos los tiempos de incubación ensayados. Por tanto, IMTXA33 $\alpha$ SDI presentó una elevada estabilidad, manteniendo intacta la funcionalidad de sus dos dominios constituyentes.

## Resultados Bloque A



**Figura A.17. Ensayos de estabilidad funcional de alícuotas de IMTXA33αSDI incubadas a 37°C a diferentes tiempos.** A) Ensayo de actividad ribonucleolítica específica, usando un C+ ( $\alpha$ -sarcina), un C- (solo tampón) y las alícuotas de inmunotoxinas incubadas a 37°C a distintos tiempos. B) Ensayo de unión mediante citometría de flujo sobre células SW1222 con alícuotas de las mismas muestras. C488, corresponde con el control negativo de isotipo. En todos los casos los tiempos de incubación fueron 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

### 2.4.5 Caracterización inmunológica de IMTXA33αSDI.

Como se ha mencionado en la introducción, uno de los principales problemas para la aplicación terapéutica de las inmunotoxinas radica en su posible inmunogenicidad, en parte por el origen y naturaleza de las toxinas que componen su dominio tóxico. Por ello, es de vital importancia reducir la inmunogenicidad de las inmunotoxinas. En el caso de IMTXA33αSDI, debido a que el dominio marcador se trata de un scFv humanizado, la eliminación de los epítomos de células T del dominio tóxico debería ser suficiente para convertir a IMTXA33αSDI en una inmunotoxina no inmunogénica, pues ninguno de sus dos dominios presentaría epítomos inmunogénicos.

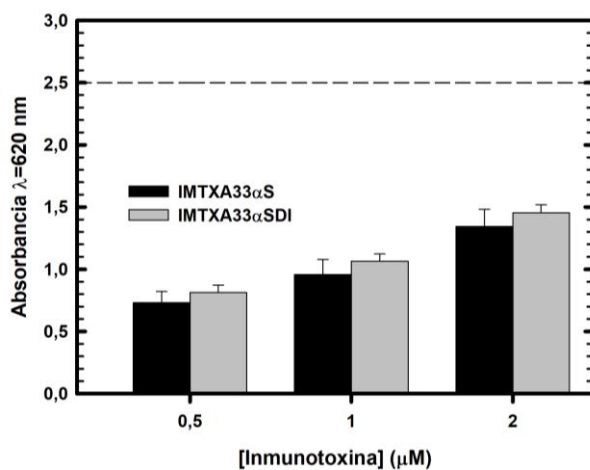
Con el fin de caracterizar inmunológicamente las inmunotoxinas diseñadas, y comprobar que efectivamente las variantes no inmunogénicas no estimulaban el sistema inmune, se llevaron a cabo diferentes tipos de ensayos sobre distintos tipos de células implicadas en la respuesta inmunológica. En esta sección se mostrarán los ensayos relativos a la activación de monocitos, utilizando las células THP1-XBlue como modelo de activación de monocitos en sangre y los ensayos de proliferación de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), extraídos a partir de sangre de donantes, y su cuantificación mediante la medición de una sonda fluorescente como es el CFSE por citometría de flujo (Ver apartado Materiales y Métodos, Caracterización Inmunológica).

Los ensayos relativos a la secreción y cuantificación de citoquinas, (IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$ ) se mostrarán junto con los resultados de la caracterización inmunológica de IMTXA33furaSDI, en el siguiente apartado (3.4.6. Caracterización inmunológica de IMTXA33furaSDI).

## Resultados Bloque A

Inicialmente, se analizó el efecto de IMTXA33 $\alpha$ S, y su variante no inmunogénica IMTXA33 $\alpha$ SDI sobre monocitos, linfocitos producidos en la médula ósea que se encuentran en el torrente sanguíneo, y son capaces de extravasarse a los tejidos conectivos del organismo para diferenciarse a macrófagos con actividad fagocítica en contextos inflamatorios. Por tanto, el sistema monocito-macrófago formaría parte de la respuesta inmune innata, por lo que su activación temprana por parte de las inmunotoxinas reduciría su potencial terapéutico. Se utilizaron células THP1-xBlue como modelo celular de activación monocítica.

Así, utilizando esta línea celular, y la medida de absorbancia resultante de la interacción entre el compuesto Quanti-Blue y SEAP, producto de activación de las células se puede inferir la respuesta de activación monocítica. En la **Figura A.18**, se observa que ninguna



**Figura A.18.** Ensayo de activación de las células THP1-XBlue por IMTXA33 $\alpha$ S (color negro) y por IMTXA33 $\alpha$ SDI (color gris). La línea discontinua horizontal indica el valor de absorbancia de las células estimuladas por el LPS.

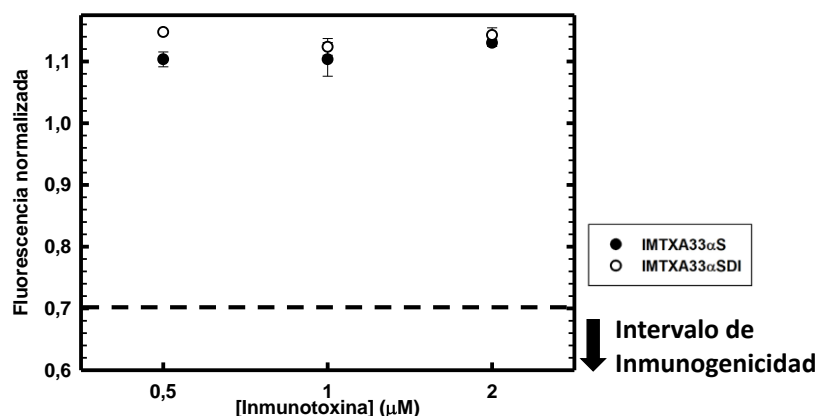
de las dos inmunotoxinas analizadas, ni IMTXA33 $\alpha$ S, ni su variante no inmunogénica provocaron activación monocítica, pues el valor de absorbancia producto de la reacción previamente descrita es muy inferior al observado por la activación mediante LPS.

Para el ensayo de proliferación de PBMCs, y su cuantificación mediante CFSE, se llevó a cabo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se

ensayaron nuevamente ambas inmunotoxinas, utilizando tres concentraciones diferentes, 0,5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M, las cuales eligieron arbitrariamente, escogiendo un intervalo entre la concentración a la cual se da la IC<sub>50</sub> en los ensayos de viabilidad *in vitro*, y la máxima concentración a la cual se suelen realizar los ensayos funcionales de inmunotoxinas. No se analizaron mayores concentraciones, pues el uso farmacológico de cualquier tratamiento terapéutico busca encontrar la dosis a la cual se produce el máximo efecto con la mínima toxicidad. El fundamento del ensayo se basa en que la presencia de un estímulo inmunogénico induce la activación y división de los PBMCs, de tal manera que al añadir una sonda intracelular fluorescente, la fluorescencia media por célula será menor cuanto más inmunogénico sea el estímulo.

## Resultados Bloque A

Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura A.19**. La estimulación inmunológica por LPS estableció el valor de 0.7 unidades de fluorescencia como límite de inmunogenicidad positiva. De tal manera que valores menores de fluorescencia indicarán una mayor división de los PBMCs, y por consiguiente una activación inmunogénica positiva. Así, se observó que ni IMTXA33 $\alpha$ SDI, ni IMTXA33 $\alpha$ S pueden ser consideradas inmunogénicas. Además, el ligero aumento de la fluorescencia de los PBMCs incubados con IMTXA33 $\alpha$ SDI



mostraría que es ligeramente menos inmunogénica, y por tanto más apta para el tratamiento terapéutico, que la variante original, IMTXA33 $\alpha$ S.

**Figura A.19. Ensayo de proliferación de PBMCs**, cuantificado mediante CFSE de la IMTXA33 $\alpha$ S (negro) y la IMTXA33 $\alpha$ SDI (blanco). La línea recta discontinua representa el control + de inmunogenicidad, por debajo del cual se considera que el estímulo es inmunogénico.

### 2.4.6 Caracterización del efecto antitumoral *in vivo* de IMTXA33 $\alpha$ SDI

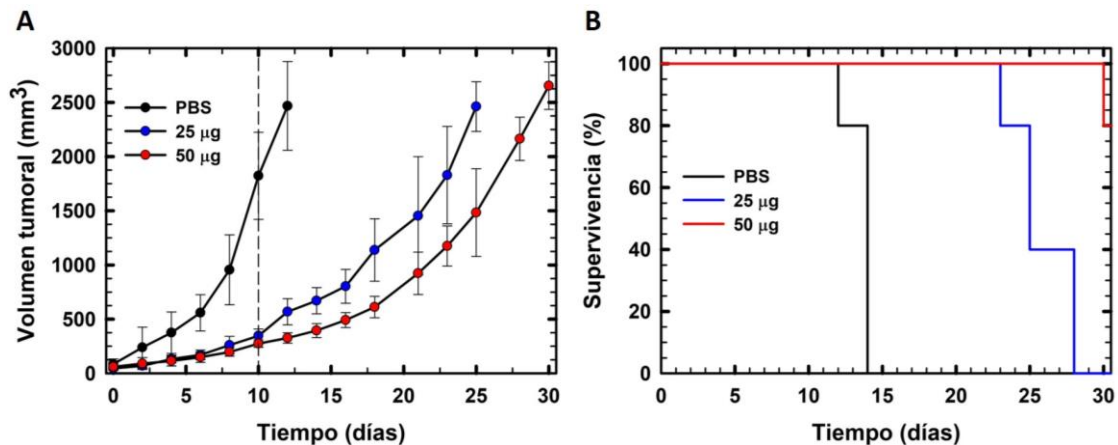
La eficacia citotóxica *in vitro* de IMTXA33 $\alpha$ SDI, junto con su estabilidad funcional a lo largo del tiempo, y su carácter no inmunogénico justificó la realización de un ensayo de inhibición del crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados con células SW1222, para caracterizar su efecto antitumoral *in vivo*.

En este ensayo se utilizaron 5 ratones para cada grupo experimental: grupo control, tratado con PBS, y dos grupos tratados con 25  $\mu$ g o 50  $\mu$ g de inmunotoxina respectivamente cada 48 horas, para un total de seis dosis. En todos los casos se comenzó el tratamiento una vez que el volumen tumoral del xenoinjerto alcanzó los 50 mm<sup>3</sup>. El seguimiento del volumen tumoral se inició tras la primera dosis, y se prolongó hasta el día 30, siendo necesario sacrificar los ratones cuando el volumen tumoral superó los 2500 mm<sup>3</sup>.

Los resultados recogidos en la **Figura A.20** mostraron un potente efecto antitumoral *in vivo* de IMTXA33 $\alpha$ SDI. El volumen tumoral fue cuatro veces menor en los ratones tratados con 25  $\mu$ g de IMTXA33 $\alpha$ SDI, y seis veces menor en los tratados con 50  $\mu$ g de IMTXA33 $\alpha$ SDI al final del tratamiento. Tras la administración de las dosis, se observó una recuperación

## Resultados Bloque A

del crecimiento tumoral, alcanzándose un volumen de 2500 mm<sup>3</sup> a los 25 días para el caso de los ratones tratados con 25 µg de IMTXA33αSDI, y a los 30 días para el caso del tratamiento con 50 µg. El análisis de supervivencia mediante representación de Kaplan-Meier (**Figura A.20.B**) mostró que la administración de 25 µg de la inmunotoxina duplicaba el tiempo de supervivencia respecto al control, y que la administración de 50 µg de IMTXA33αSDI provocó una supervivencia del 80% a los 30 días, momento en el que finalizó el ensayo, indicando que la administración de IMTXA33αSDI, además de promover una significativa inhibición del crecimiento tumoral, aumentaba considerablemente la supervivencia.

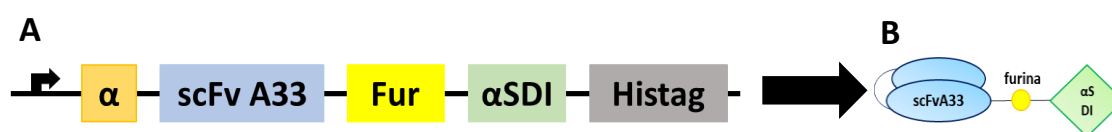


**Figura A.20. Eficacia antitumoral *in vivo* de IMTXA33αSDI en ratones xenoinjertados con células SW1222 (n=5).** A) Gráfica con la evolución del crecimiento tumoral de los 3 grupos experimentales: tratados con PBS (negro), con 25 µg/dosis (azul) o 50 µg/dosis (rojo) de IMTXA33αSDI cada 48 horas. La línea vertical indica el final del tratamiento. B) Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de los distintos grupos experimentales: tratados con PBS (negro) o 25 µg (azul) o 50 µg (rojo) de IMTXA33αSDI.

## Resultados Bloque A

### 3. Diseño, purificación y caracterización de IMTXA33furaSDI

Debido a que el procesamiento intracelular y la velocidad de traslocación al citosol de una inmunotoxina determinan de manera crítica su eficiencia citotóxica, se llevó a cabo el diseño, producción, purificación y caracterización de una nueva inmunotoxina (IMTXA33furaSDI) cuyo dominio variable consiste en el scFv frente a GPA33, cuyo dominio tóxico consiste en la ya caracterizada  $\alpha$ SDI, y que presenta entre ambos dominios un sitio de reconocimiento y corte por la enzima furina (**Figura A.21**). La inclusión de este sitio de restricción de furina permitiría una mayor liberación del dominio tóxico al citosol, en vez de ser degradada en los lisosomas o reciclada el dominio extracelular, traducándose en un aumento de su eficacia citotóxica (Tortorella *et al.*, 2012; Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019)



**Figura A.21.** Diagrama esquemático mostrando la secuencia codificante (A) y proteica correspondiente al modelo de estructura en disolución (B) de la inmunotoxina IMTXA33furaSDI. Se destacan los diferentes componentes del cDNA de la inmunotoxina. De izquierda a derecha, el factor  $\alpha$ , el dominio marcador scFvA33, el sitio de reconocimiento y corte de la furina, el dominio tóxico correspondiente a la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica y el tag de histidinas para la posterior purificación. En cuanto a los dominios estructurales de la inmunotoxina, se muestra el dominio marcador scFvA33 y el dominio tóxico constituido por  $\alpha$ SDI.

#### 3.1 Obtención del vector de expresión pPICZ $\alpha$ A33furaSDI.

A partir del plásmido previamente obtenido en el laboratorio pPICZ $\alpha$ AA33furaS se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*, obteniéndose el fragmento *EcoRI*-A33fur-*NotI*. A la vez, se digirió el plásmido pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI con las mismas enzimas, obteniendo el fragmento grande *EcoRI*-pPICZ $\alpha$ A33 $\alpha$ SDI-*NotI*, sin el DNA correspondiente a la secuencia codificante de A33. Se llevó a cabo una ligación entre el fragmento pequeño *EcoRI*-A33fur-*NotI* y el fragmento grande, obteniéndose el vector de expresión pPICZ $\alpha$ AA33furaSDI. El nuevo plásmido se secuenció con el fin de comprobar que presentaba la secuencia correcta. (**Figura A.21**).

#### 3.2 Producción y purificación de IMTXA33furaSDI

La producción de IMTXA33furaSDI se llevó a cabo en la cepa KM71H de *Pichia pastoris*, siguiendo la misma metodología empleada con la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ SDI.

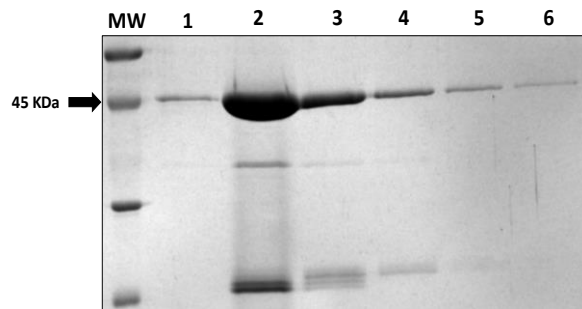
Así, nuevamente, tras la electroporación, y posterior selección de colonias súper productoras de la inmunotoxina mediante la realización de pruebas de expresión, se llevó

## Resultados Bloque A

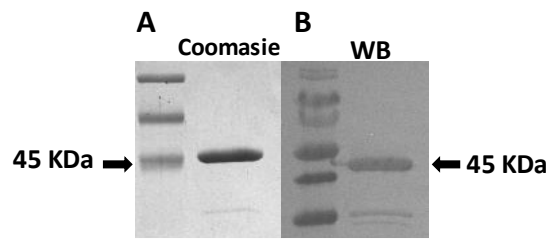
a cabo la producción y purificación de IMTXA33furaSDI, a partir de 1 L de BMMY, tras inducción durante 24 horas a 25°C.

El análisis electroforético de las alícuotas obtenidas en las diferentes etapas de la purificación mediante cromatografía de afinidad se muestra en la **Figura A.22**. Del mismo modo que con IMTXA33αSDI se observó un patrón de bandas de menor tamaño, correspondiente a una posible degradación de la inmunotoxina por el *linker* de unión entre los dos dominios. Las fracciones conteniendo IMTXA33furaSDI se juntaron y dializaron para eliminar el imidazol y los productos de degradación observados.

Así, se purificó a homogeneidad la nueva inmunotoxina IMTXA33furaSDI con un tamaño esperado de 45 KDa y un rendimiento final de 0.9 mg/L de medio de inducción. Asimismo, se confirmó su identidad molecular por inmunodetección (**Figura A.23**).



**Figura A.22.** Análisis electroforético en PAGE-SDS de las distintas alícuotas de la purificación de IMTXA33furaSDI. Se muestra el patrón de masas moleculares, y a continuación las fracciones obtenidas tras la elución con 250 mM de imidazol en la cromatografía de afinidad.



**Figura A.23.** Análisis electroforético mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie (A) y **Western Blot** (WB) utilizando un anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina y revelado mediante DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) de la fracción final purificada de IMTXA33furaSDI (1 µg).

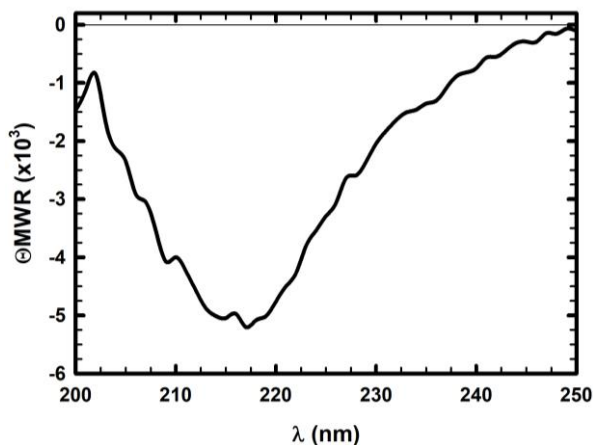
### 3.3 Caracterización estructural de IMTXA33furaSDI.

En primer lugar, se determinó el coeficiente de extinción al 0,1% ( $E^{0.1\%}$ ) de IMTXA33furaSDI mediante el software ProtParam, obteniéndose un valor de  $E^{0.1\%}$  de 1,6 (cm.mg/ml)<sup>-1</sup>.

Para la caracterización estructural de la nueva inmunotoxina IMTXA33furaSDI se llevó a cabo espectroscopía de dicroísmo circular en el UV-lejano. Se observa en la **Figura A.24** que IMTXA33furaSDI presentó un plegamiento coherente con el de una proteína globular en disolución, con un predominio de estructura  $\beta$ , lo cual es coherente con la estructura

## Resultados Bloque A

secundaria de sus 2 dominios por separado (Martínez del Pozo *et al.*, 1988; Wilkinson *et al.*, 2009). Además, se confirma que la introducción del sitio de restricción de furina no modificó ni el plegamiento ni la estructura de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.



**Figura A.24.** Espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano de IMTXA33fura $\alpha$ SDI (0,2 mg/ml).  $\Theta_{MWR}$  representa la elipticidad media por residuo, expresada como grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ .

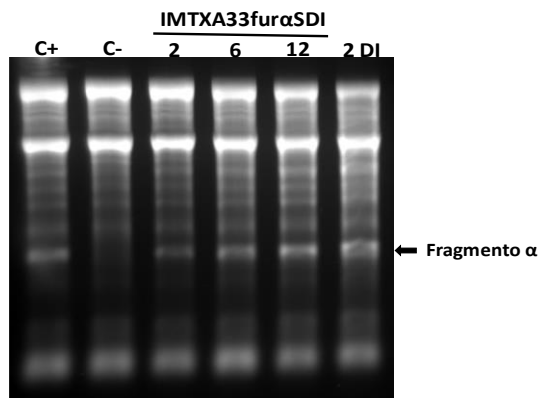
### 3.4 Caracterización funcional de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.

Para llevar a cabo la caracterización funcional de la nueva inmunotoxina IMTXA33fura $\alpha$ SDI se analizó la funcionalidad de sus dos dominios por separado, mediante el ensayo de actividad ribonucleolítica específica, para el dominio tóxico y mediante un ensayo de unión a células SW1222 (GPA33+) por citometría de flujo, para el dominio marcador. Posteriormente se analizó la eficacia del procesamiento proteolítico de IMTXA33fura $\alpha$ SDI en presencia de la enzima furina. Por último, se analizó la eficacia citotóxica *in vitro* de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.

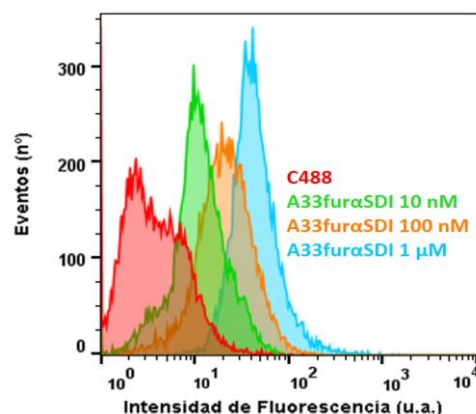
#### 3.4.1. Caracterización del dominio tóxico de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.

Para la caracterización del dominio tóxico de IMTXA33fura $\alpha$ SDI, se llevó a cabo el ensayo de reticulocitos, descrito previamente.

Así, se observa en la **Figura A.25** que IMTXA33fura $\alpha$ SDI mantenía la actividad ribonucleolítica propia de la  $\alpha$ -sarcina, como se observa por la liberación del fragmento  $\alpha$  tras la incubación con el lisado de reticulocitos, siendo esta actividad mayor a medida que se aumentó la cantidad de inmunotoxina ensayada. En el ensayo también se incluyó una muestra con 2 pmoles de la previamente caracterizada IMTXA33 $\alpha$ SDI, observándose que, en igualdad de cantidad, la actividad ribonucleolítica era semejante en ambas inmunotoxinas.



**Figura A.25. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica** comparando la actividad de IMTXA33furaSDI con la de IMTXA33αSDI. En la imagen se muestra el gel de agarosa del ensayo. Como control negativo (C-) se usó tampón y como control positivo (C+) se usó αSWT. Se ensayaron 2, 6 y 12 pmoles de IMTXA33furaSDI y 2 pmoles de IMTXA33αSDI (2 DI). La flecha indica la posición del fragmento α.



**Figura A.26. Ensayo de unión mediante citometría de flujo de IMTXA33furaSDI** sobre las células SW1222. Se analizaron distintas concentraciones de inmunotoxina: 10 nM (verde), 100 nM (naranja) y 1 μM (azul). En rojo se muestra el control de segunda capa.

### 3.4.2. Caracterización del dominio marcador de IMTXA33furaSDI.

Para evaluar la capacidad de unión de la nueva IMTXA33furaSDI a células de cáncer colorrectal GPA33+, se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo frente a células SW1222, tal y como se llevó a cabo con IMTXA33αSDI.

Se observa en la **Figura A.26** que IMTXA33furaSDI fue capaz de unirse a las células SW1222, y que la intensidad de fluorescencia fue mayor a medida que se incrementaba la concentración de inmunotoxina, lo cual se relaciona con un mayor número de moléculas unidas por célula. Por otro lado, no se observó saturación de la unión a ninguna de las concentraciones empleadas.

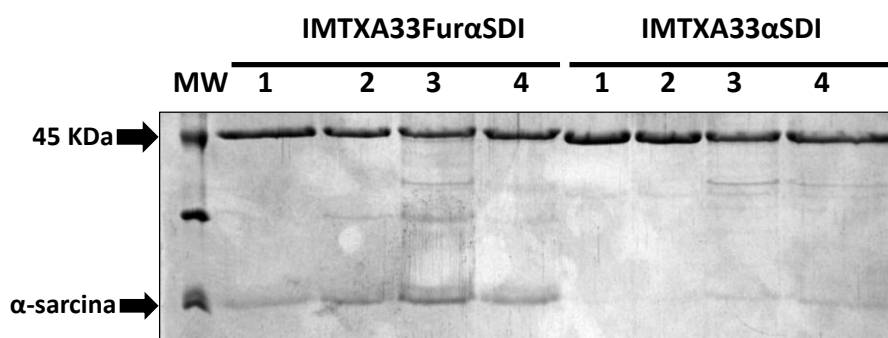
### 3.4.3 Caracterización del sitio de corte de furina de IMTXA33furaSDI

Uno de los principales aspectos que condicionan la eficacia de las inmunotoxinas para su aplicación terapéutica es la tasa de liberación al citosol del dominio tóxico desde los endosomas tempranos en los que se encuentra la inmunotoxina tras su internación en la célula. En caso de no liberarse al citosol, la inmunotoxina presente en los endosomas sería degradada en los lisosomas o secretada al medio extracelular al reciclarse el receptor (Tortorella *et al.*, 2012; Weldon *et al.*, 2015; Antignani *et al.*, 2020).

## Resultados Bloque A

Con este fin, se ha incorporado el sitio de reconocimiento de furina entre los dominios marcador y tóxico de IMTXA33fura $\alpha$ SDI. Así, tras la internación y compartimentación de IMTXA33fura $\alpha$ SDI en los endosomas tempranos, la enzima furina presente en la membrana de estos endosomas liberaría el dominio tóxico, la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica, que debido a su capacidad de interactuar con lípidos de membrana podría translocarse libremente al citosol, ejerciendo su acción citotóxica (Thomas, 2002; Tomé-Amat *et al.*, 2015a; Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019).

Con el fin de comprobar si el sitio de restricción de furina, situado entre el dominio marcador y tóxico de IMTXA33fura $\alpha$ SDI podía ser escindido por la enzima furina, se llevó a cabo un ensayo de digestión proteolítica por furina (ver apartado Materiales y Métodos).

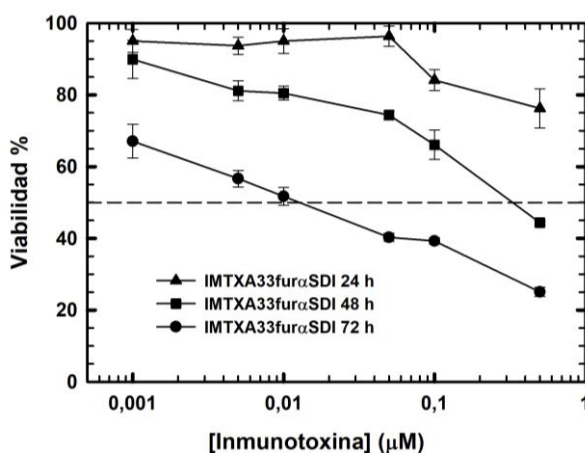


**Figura A.27. Análisis electroforético** mediante PAGE-SDS y posterior tinción por Coomassie **del procesamiento proteolítico por parte de la furina de IMTXA33fura $\alpha$ SDI e IMTXA33 $\alpha$ SDI** (utilizada como control negativo). Las distintas condiciones de incubación para ambas inmunotoxinas fueron: **1.** Ausencia de enzima; **2.** En presencia de furina, a 37°C durante 3 horas; **3.** En presencia de furina, a 37°C durante 24 horas. **4.** Ausencia de enzima, a 37°C durante 24 h.

Como se observa en la **Figura A.27**, la incubación de IMTXA33 $\alpha$ SDI con furina no liberó significativamente la  $\alpha$ -sarcina incluida como el dominio tóxico, en ninguna de las condiciones ensayadas, debido a que IMTXA33 $\alpha$ SDI no presenta el sitio de reconocimiento de furina. Sin embargo, en el caso de IMTXA33fura $\alpha$ SDI, si bien se observó cierta degradación y liberación inespecífica de la  $\alpha$ -sarcina en ausencia de la enzima (carriles 1 y 4), esta aumentó significativamente en presencia de la enzima furina, siendo esta liberación dependiente del tiempo de incubación, y máxima a las 24 horas (carriles 2 y 3), indicando que IMTXA33fura $\alpha$ SDI efectivamente ha incorporado la secuencia de reconocimiento y corte por furina y que en presencia de esta enzima se produce la liberación del dominio tóxico.

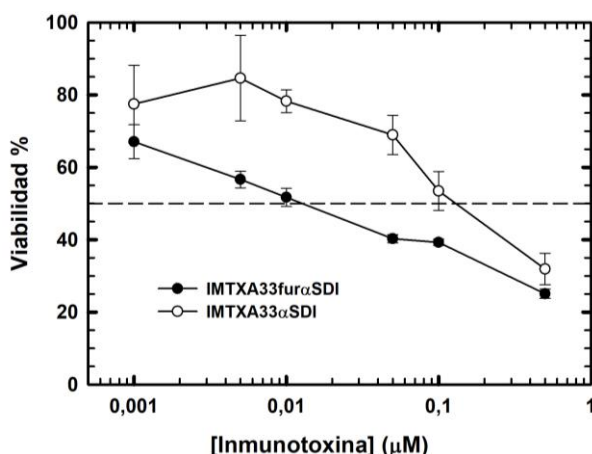
### 3.4.4. Caracterización de la actividad citotóxica de IMTXA33furaSDI

Una vez comprobada la correcta funcionalidad por separado de ambos dominios de IMTXA33furaSDI, y de que en presencia de la enzima furina se producía un procesamiento proteolítico que conducía a la liberación del dominio tóxico, se procedió a la caracterización de la actividad citotóxica de IMTXA33furaSDI *in vitro*, tal y como se llevó a cabo para IMTXA33αSDI. Se llevaron a cabo ensayos clásicos de viabilidad celular por MTT, y de inhibición de la biosíntesis de proteínas analizando la menor incorporación celular de Leu- $H^3$ .



**Figura A.28. Ensayo de viabilidad mediante MTT.** Se muestran las viabilidades a las 24, 48 y 72 horas de incubación de las células SW1222 con distintas concentraciones de IMTXA33furaSDI. La línea discontinua representa el 50% de viabilidad celular.

Así, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad por MTT sobre células SW1222 (GPA33+) y se ensayaron distintas concentraciones de IMTXA33furaSDI a distintos tiempos. Así se observa en la **Figura A.28** que IMTXA33furaSDI presenta actividad citotóxica frente a las células tumorales GPA33+, siendo esta actividad citotóxica dependiente del tiempo, y de la concentración de inmunotoxina ensayada.

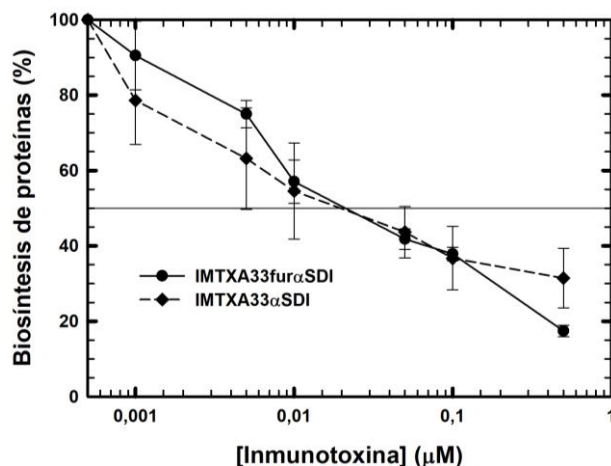


**Figura A.29. Ensayo de viabilidad por MTT,** analizándose la actividad citotóxica a 72 horas de IMTXA33αSDI (círculos blancos) y de IMTXA33furaSDI (círculos negros) sobre células SW1222. La línea discontinua representa el 50% de viabilidad celular.

En la **Figura A.29** se compara el efecto citotóxico de IMTXA33αSDI y de IMTXA33furaSDI por MTT a las 72 horas, obteniéndose una  $IC_{50}$  de 12 nM para IMTXA33furaSDI, frente a la  $IC_{50}$  de IMTXA33αSDI, de aproximadamente 0,15 μM, siendo la eficacia citotóxica sobre la viabilidad celular de IMTXA33furaSDI aproximadamente 10 veces superior a la de IMTXA33αSDI. Este aumento de

## Resultados Bloque A

eficacia citotóxica de IMTXA33fura $\alpha$ SDI respecto a IMTXA33 $\alpha$ SDI solo puede ser explicado debido a la escisión de la inmunotoxina tras su internación en los endosomas tempranos por la furina y una mayor liberación de  $\alpha$ SDI al citosol, donde llevaría a cabo su acción tóxica.

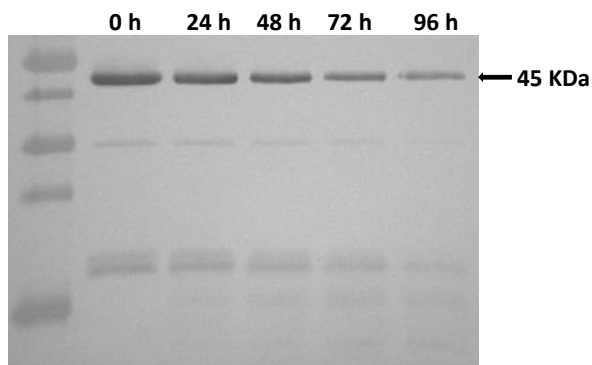


**Figura A.30. Ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas.** Se analiza la inhibición de la biosíntesis sobre células SW1222 de IMTXA33fura $\alpha$ SDI (línea continua) o de IMTXA33 $\alpha$ SDI (línea discontinua) a las 72 horas. La línea horizontal indica el 50% de viabilidad celular.

Además, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la biosíntesis de proteínas por IMTXA33fura $\alpha$ SDI frente a células SW1222 (GPA33+), cuantificado mediante la incorporación de Leu- $H^3$ . El ensayo se llevó a cabo en idénticas condiciones al efectuado con IMTXA33 $\alpha$ SDI durante 72 horas. Así, se observa en la **Figura A.30** que el efecto inhibitor de la biosíntesis de proteínas de IMTXA33fura $\alpha$ SDI es similar al descrito para IMTXA33 $\alpha$ SDI, con una  $IC_{50}$  de aproximadamente 0,02  $\mu$ M en ambos casos.

### 3.4.5 Caracterización de la estabilidad de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.

Con el fin de analizar la estabilidad de IMTXA33fura $\alpha$ SDI en condiciones fisiológicas (37°C, presencia e interacción con otras proteínas en el plasma sanguíneo) así como paso previo al análisis antitumoral *in vivo*, se incubaron alícuotas de proteína IMTXA33fura $\alpha$ SDI purificada con medio de cultivo o PBS, durante 24, 48, 72 y 96 horas a 37°C; y posteriormente se analizó el mantenimiento estructural y funcional de la inmunotoxina.



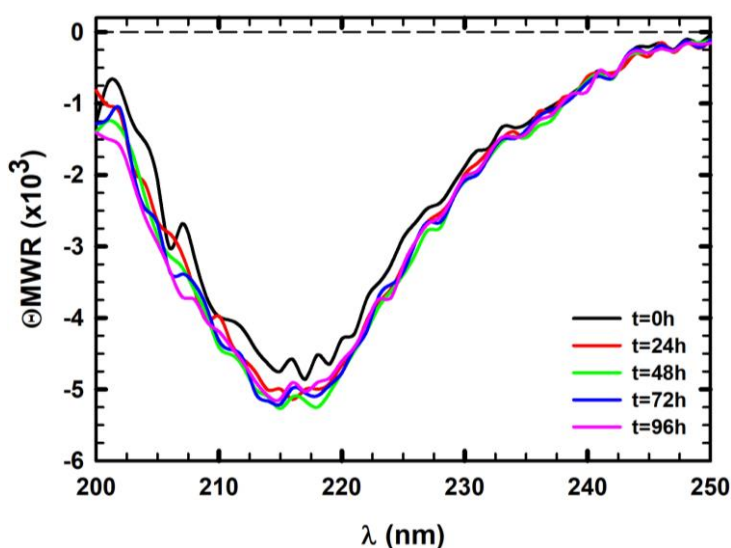
**Figura A.31. Ensayo de estabilidad.** Análisis de la integridad molecular mediante *Western Blot* de las alícuotas de IMTXA33fura $\alpha$ SDI incubadas en PBS a 37°C durante distintos tiempos. Se utilizó un anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina.

La integridad de la proteína y su degradación se analizó mediante *Western Blot* de las distintas alícuotas incubadas en PBS, observándose en la **Figura A.31** que la banda correspondiente a la inmunotoxina completa se mantiene en todos los tiempos hasta las

## Resultados Bloque A

96 horas, si bien a partir de 72 horas la intensidad de la banda de 45 KDa va siendo cada vez menor.

Debido a la ligera degradación observada en el *Western Blot* a las 96 horas, así como a la posible modificación de estructura secundaria a lo largo tiempo por la inclusión del *linker* de furina, se analizó la estabilidad de la conformación estructural de IMTXA33furaSDI mediante espectroscopía de dicroísmo circular en el UV-lejano. Tal como se ha indicado anteriormente, las alícuotas se incubaron con PBS para evitar las distorsiones que las proteínas presentes en el medio de incubación pudiesen ocasionar en el espectro.



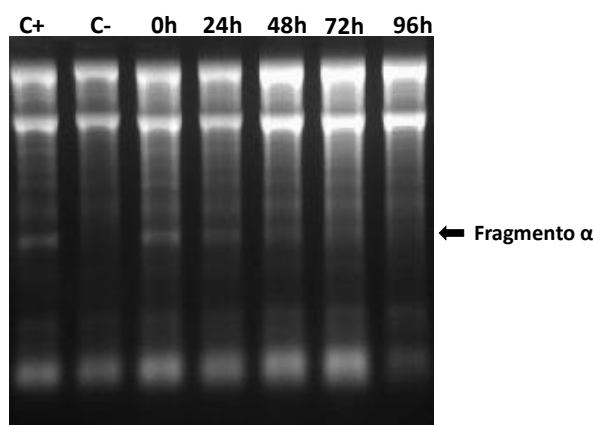
**Figura A.32. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de los distintos tiempos de incubación de IMTXA33furaSDI (1  $\mu$ M).** ( $\Theta_{MWR}$  equivale a la elipticidad molar por residuo, expresada como grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ).

Se observa en la **Figura A.32** que el plegamiento estructural de IMTXA33furaSDI, así como su conformación estructural con predominio de estructura  $\beta$  se mantuvo en todos los tiempos de incubación ensayados sin que se aprecie en ningún caso desnaturalización.

Tras comprobar que no se produce degradación ni desnaturalización de IMTXA33furaSDI, se procedió a evaluar si se mantenía la funcionalidad de sus dominios. Para ello, se llevó a cabo el ensayo de actividad ribonucleolítica específica (ver apartado Materiales y Métodos) para estudiar la actividad ribonucleolítica del dominio tóxico. No se analizó la estabilidad de la función del dominio marcador, pues ya se había descrito previamente que el *linker* de furina no modificaba la estabilidad de la capacidad de unión del dominio marcador scFvA33 frente a células SW1222 (Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019), y las mutaciones llevadas a cabo para obtener la inmunotoxina IMTXA33furaSDI no afectan al dominio marcador.

## Resultados Bloque A

Los resultados del ensayo de actividad ribonucleolítica específica (**Figura A.33**) mostraron que IMTXA33fura $\alpha$ SDI mantiene la actividad ribonucleolítica sobre el ribosoma, observándose la presencia del fragmento  $\alpha$  en todos los tiempos ensayados. No obstante, la intensidad de la banda del fragmento  $\alpha$  fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de incubación, lo cual es coherente con el resultado obtenido en el *Western Blot* (Figura A.31), en el que a 96 horas se observaba que la banda de IMTXA33fura $\alpha$ SDI es menor.



**Figura A.33. Ensayo de estabilidad de la actividad ribonucleolítica específica de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.** En la imagen se muestra el gel de agarosa del ensayo; usando un C+ ( $\alpha$ -sarcina), un C- (tampón) y las diferentes alícuotas a distintos tiempos. La flecha indica la posición del fragmento  $\alpha$ .

### 3.4.6. Caracterización inmunológica de IMTXA33fura $\alpha$ SDI.

Para la caracterización inmunológica de IMTXA33fura $\alpha$ SDI se llevó a cabo en primer lugar un ensayo de activación de las células THP-1XBlue, con el fin de analizar si la nueva inmunotoxina provocaba activación de monocitos y, por tanto, podía desencadenar una respuesta inmune innata (Chanput *et al.*, 2014; Roth-Walter *et al.*, 2014).

Además, se llevó a cabo un análisis mediante ELISA del perfil de citoquinas secretadas al medio extracelular por activación inmunológica de PBMCs extraídos a partir de sangre de donantes en presencia de las tres inmunotoxinas con las que se ha trabajado hasta ahora: IMTXA33 $\alpha$ S, y las variantes no inmunogénicas: IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33fura $\alpha$ SDI. Las citoquinas que se analizaron fueron IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$ , por ser las citoquinas frecuentemente cuantificadas en los estudios de inmunogenicidad (Tordesillas *et al.*, 2008; Palomares *et al.*, 2019).

Así, se llevó a cabo en primer lugar el ensayo sobre las células THP1-XBlue, de manera idéntica a lo descrito con IMTXA33 $\alpha$ SDI. Como control positivo de activación, se utilizaron 100 ng de LPS, de tal manera que la inmunotoxina se consideraría inmunogénica si produce una respuesta similar a la de este. Se observa en la **Figura A.34** que IMTXA33fura $\alpha$ SDI no provocó activación de las células THP1-XBlue, pues el valor de activación está muy por debajo del valor obtenido con el LPS. Además, el valor de absorbancia se mantuvo bajo independientemente de la concentración de

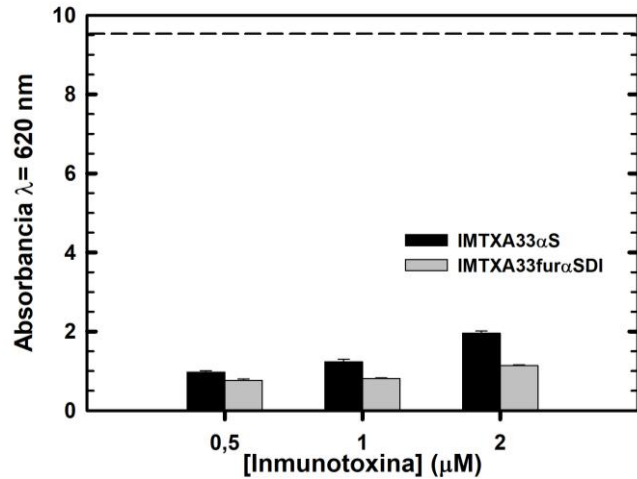
## Resultados Bloque A

IMTXA33furaSDI utilizada, mientras que en el caso de IMTXA33 $\alpha$ S sí que se observó un aumento de la respuesta dependiente de la concentración.

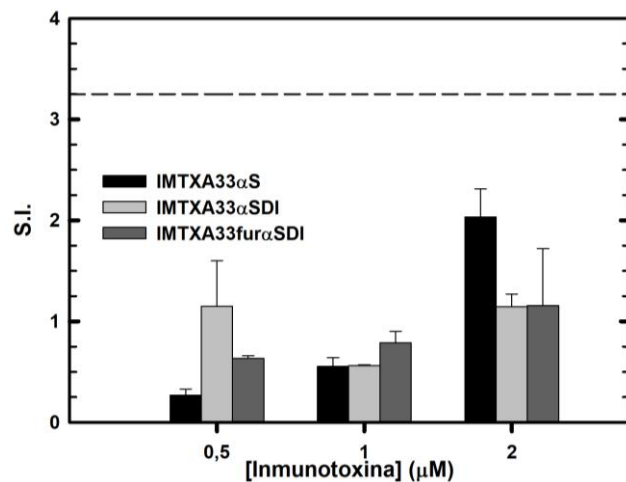
A continuación, se analizó el perfil de citoquinas de la activación inmunológica de PBMCs extraídos de sangre de donante, cuando estos se incubaban con diferentes inmunotoxinas. Así, se incubaron PBMCs con las 3 inmunotoxinas descritas hasta ahora (IMTXA33 $\alpha$ S, IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33furaSDI),

a concentraciones de 0,5; 1 y 2  $\mu$ M, siendo estas las concentraciones utilizadas en el presente trabajo para los análisis inmunológicos. A las 48 horas de incubación de los PBMCs con las inmunotoxinas, se cuantificaron los PBMCs, mediante recuento celular con la cámara de Neubauer, pues la proliferación de estas células es una medida de su activación inmunológica (Tordesillas *et al.*, 2008). Posteriormente, se centrifugaron las muestras separando el sedimento celular, y el sobrenadante donde se encontrarían las citoquinas.

Así, en la **Figura A.35** se muestra el Índice de Estimulación, o S.I. (*Stimulation Index*) de los PBMCs en respuestas a las tres inmunotoxinas ensayadas, a diferentes concentraciones. Se observa que en ningún caso, se alcanza la estimulación provocada por el Control +, y que solamente en el caso de IMTXA33 $\alpha$ S se daría un aumento de la activación inmunológica dependiente de la concentración.



**Figura A.34.** Ensayo de activación de células THP1-XBlue por IMTXA33 $\alpha$ SWT (negro) y IMTXA33fura $\alpha$ SDI (gris) a distintas concentraciones. La línea discontinua horizontal indica la absorbancia obtenida con LPS 100 ng (Control positivo de activación).



**Figura A.35.** Ensayo de proliferación de PBMCs en respuesta a IMTXA33 $\alpha$ S, y las variantes no inmunogénicas: IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33fura $\alpha$ SDI. La línea discontinua horizontal indica el Índice de Estimulación del control +, LPS 100 ng. El Índice de Estimulación (S.I.) se calculó como el n $^{\circ}$  de PBMCs de cada muestra dividido entre el n $^{\circ}$  de PBMCs del control -, PBS.

## Resultados Bloque A

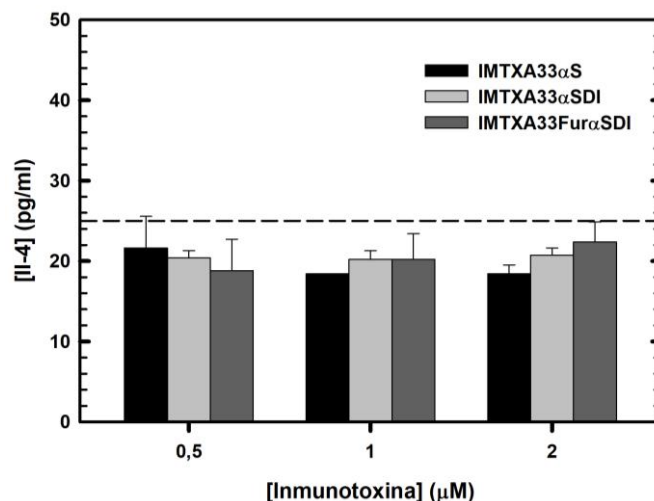
Una vez obtenidos los sobrenadantes celulares donde se encontraban todas las citoquinas secretadas por los PBMCs, se procedió a la cuantificación de IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$  como marcadores principales de distintos momentos y procesos de la activación inmunológica. Así, para cada una de las citoquinas, se siguió el protocolo descrito (ver apartado Materiales y Métodos). En cada caso, se realizó una recta patrón, con

cantidades de citoquina conocidas con el fin de calcular la concentración de citoquina de cada muestra a partir de su absorbancia en el ELISA.

IL-4 es una citoquina inflamatoria secretada principalmente por linfocitos T CD4 $^{+}$  (Th2), y en menor medida por basófilos y mastocitos. IL-4 está implicada en el aumento de la ratio de linfocitos Th2/Th1, disminuyendo la inmunidad mediada por células; en la maduración de linfocitos B, promoviendo el cambio de isotipo de IgM a IgG1 y IgE. Suele estar implicada en infecciones por parásitos gastrointestinales (Choi *et al.*, 1998).

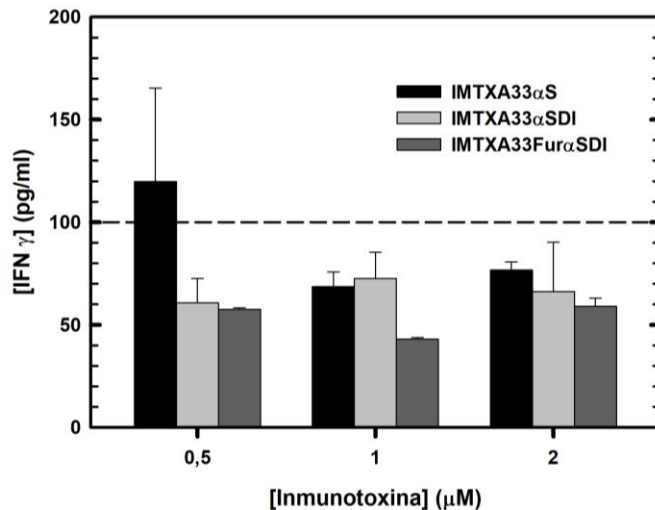
Como se observa en la **Figura A.36**, ninguna de las inmunotoxinas analizadas provocó liberación de IL-4 por encima del control de activación inmunológica, indicando que no provocarían activación de linfocitos T CD4 $^{+}$  (Th2).

IFN $\gamma$  es una citoquina proinflamatoria, siendo el único representante de la familia de los interferones de tipo II. Es producida principalmente por linfocitos T CD4 $^{+}$  (Th1), y también por linfocitos T CD8 $^{+}$ , células NK y células mieloides, como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Su principal función es potenciar la respuesta inmune mediada por células (Mata-Espinosa *et al.*, 2008).



**Figura A.36.** Cuantificación de IL-4 por ELISA de PBMCs estimulados por distintas inmunotoxinas: IMTXA33 $\alpha$ S y las variantes no inmunogénicas: IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33Fura $\alpha$ SDI. La línea discontinua horizontal muestra los niveles de IL-4 con LPS 100 ng.

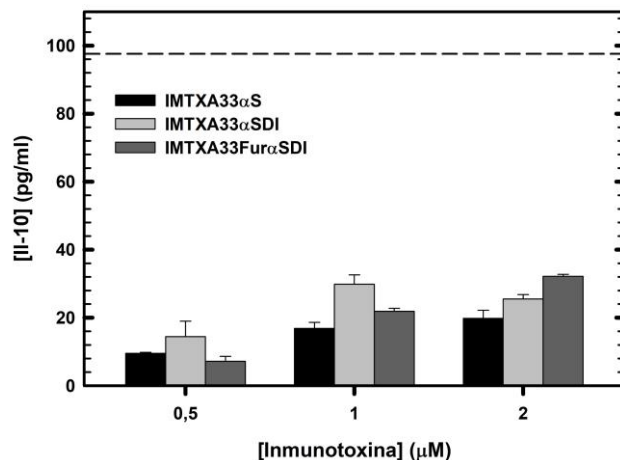
## Resultados Bloque A



**Figura A.37. Cuantificación de IFN $\gamma$  por ELISA de PBMCs estimulados por distintas inmunotoxinas: IMTXA33 $\alpha$ S y las variantes no inmunogénicas: IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33furaSDI. La línea discontinua horizontal muestra los niveles de IFN $\gamma$  con LPS 100 ng.**

Como se observa en la **Figura A.37**, solo IMTXA33 $\alpha$ S a una concentración de 0,5  $\mu$ M produjo secreción de IFN $\gamma$  por encima del valor del LPS 100 ng, mientras que a mayores concentraciones no se observan dichos incrementos. Por el contrario, ni la incubación con IMTXA33 $\alpha$ SDI ni IMTXA33furaSDI implicaron la liberación de IFN $\gamma$  por encima del valor de activación a ninguna concentración.

IL-10 es una potente citoquina anti-inflamatoria producida en multitud de tipos celulares (linfocitos T y B, células NK, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y queratinocitos). Su principal función es la supresión de la inflamación y de los procesos autoinmunes. Inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la presentación de antígenos y la proliferación celular a través de la inhibición de la traslocación del Nf- $\kappa$ B y la consiguiente activación génica (Saxena *et al.*, 2015).



En la **Figura A.38** se observa que las 3 inmunotoxinas dieron lugar a una baja estimulación de la liberación de IL-10, cuyos valores permanecieron muy por debajo del umbral de activación inmunogénica.

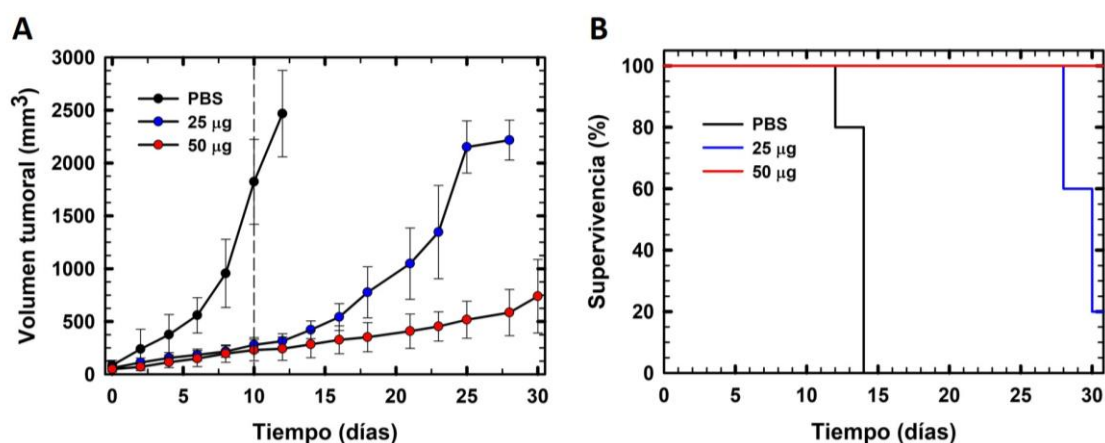
**Figura A.38. Cuantificación de IL-10 por ELISA de PBMCs estimulados por distintas inmunotoxinas: IMTXA33 $\alpha$ S y las variantes no inmunogénicas: IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33furaSDI. La línea discontinua horizontal muestra los niveles de IL-10 con LPS 100 ng.**

## Resultados Bloque A

### 3.4.7. Caracterización del efecto antitumoral *in vivo* de IMTXA33furaSDI

El mayor efecto citotóxico observado en el ensayo *in vitro*, junto con la estabilidad estructural y funcional de IMTXA33furaSDI, así como su baja inmunogenicidad justificaron la realización de un ensayo *in vivo* de inhibición tumoral en ratones xenoinjertados con células SW1222.

Se seleccionaron 3 grupos de 5 ratones cada uno: tratados con PBS como control negativo o tratados con 25 o 50  $\mu\text{g}$ /dosis de IMTXA33furaSDI. La administración de las dosis comenzó cuando el tumor alcanzó un volumen de 50  $\text{mm}^3$ , administrándose 6 dosis cada 48 horas. El seguimiento del volumen tumoral se llevó a cabo desde el comienzo del tratamiento hasta 30 días después.



**Figura A.39. Actividad antitumoral *in vivo* de IMTXA33furaSDI en ratones xenoinjertados con células SW1222 (n=5).** A) Gráfica con la evolución del crecimiento tumoral de los 3 grupos experimentales: tratados con PBS (negro), con 25  $\mu\text{g}$ /dosis (azul) o 50  $\mu\text{g}$ /dosis de IMTXA33furaSDI cada 48 horas. La línea vertical indica el final del tratamiento. B) Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de los distintos grupos experimentales: tratados con PBS (negro) o 25  $\mu\text{g}$  (azul) o 50  $\mu\text{g}$  (rojo) de IMTXA33furaSDI.

Los resultados (**Figura A.39**) mostraron que la administración de IMTXA33furaSDI produjo una disminución del volumen tumoral de 7 veces respecto al control, para el grupo de 25  $\mu\text{g}$ /dosis y de 9 veces para el de 50  $\mu\text{g}$ /dosis, tras la administración de las dosis (día 10). Es particularmente significativo que una vez finalizado el tratamiento, en el grupo de 25  $\mu\text{g}$  se observó una recuperación del crecimiento tumoral, superándose los 2000  $\text{mm}^3$  a partir del día 25, mientras que en el grupo de 50  $\mu\text{g}$ /dosis la inhibición del crecimiento tumoral, se mantuvo, sin superar los 700  $\text{mm}^3$  al final del ensayo. Estos datos de volúmenes tumorales traducidos en datos de supervivencia (**Figura A.39B**), mediante representación de Kaplan-Meier, mostraron una supervivencia a los 30 días del 20 % de los ratones

## Resultados Bloque A

tratados con 25 µg/ dosis de IMTXA33furaSDI, y un 100% de supervivencia para el grupo tratado con 50 µg/ dosis.

Todo ello evidenció que la inclusión de un sitio de reconocimiento de furina, facilita no solo un procesamiento intracelular más eficiente, y una mayor liberación del dominio tóxico al citosol, sino que se traduce, *in vivo*, en una mayor inhibición del crecimiento tumoral, llegando a anular el crecimiento exponencial del tumor, con una mortalidad del 0% para la administración de 50 µg/dosis de inmunotoxina.

## Resultados Bloque A

### Bloque B

#### Producción y caracterización de nanoimmunotoxinas basadas en un *nanobody* (VHH) frente a EGFR.

En este segundo bloque, se muestran los resultados relativos al diseño, producción y caracterización de diferentes nanoimmunotoxinas, basadas en el *nanobody* o anticuerpo de dominio único (VHH) 7D12 (Gainkam *et al.*, 2008) frente al antígeno EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) que aparece sobreexpresado en diversos tumores epiteliales, como en cáncer colorrectal.

**1. VHHEGFR $\alpha$ S.** Nanoimmunotoxina cuyo dominio marcador es el VHH 7D12 frente a EGFR, y cuyo dominio tóxico es la ribotoxina fúngica  $\alpha$ -sarcina. Tras la construcción del vector de expresión y su producción en *P. pastoris*, se llevó a cabo su purificación y caracterización estructural y funcional, tanto *in vitro* como *in vivo*.

**2. TriVHHEGFR $\alpha$ S.** Nanoimmunotoxina, cuyo dominio marcador es el VHH 7D12 frente a EGFR, cuyo dominio tóxico es la ribotoxina fúngica  $\alpha$ -sarcina, incluyendo el dominio de trimerización del colágeno XVIII (TIE<sup>XVIII</sup>), dando como resultado una nanoimmunotoxina con formato trimérico en disolución. Se procedió a su caracterización estructural y funcional, comparándola con el formato monomérico original, VHHEGFR $\alpha$ S, indicado anteriormente.

**3. VHHEGFR-scFvA33- $\alpha$ SDI.** Inmunotoxina biespecífica que presenta como dominios marcadores el VHH 7D12 frente a EGFR, y el scFv frente a GPA33, y como dominio tóxico la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI). Se llevó a cabo su producción heteróloga, purificación y posterior caracterización estructural y funcional. Para referirnos a esta nanoimmunotoxina en adelante, la denominaremos: Biesp- $\alpha$ SDI.

## Resultados Bloque B

### 1. DISEÑO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VHHEGFR $\alpha$ S.

#### 1.1 Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ AVHHEGFR $\alpha$ S.

A partir del vector de expresión pPICZ $\alpha$ A33 $\alpha$ S, utilizando los oligos 5 y 6 (Ver Materiales y Métodos), se amplificó mediante PCR el fragmento de DNA: L5- $\alpha$ S-Histag, correspondiente al linker de 5 aminoácidos, la  $\alpha$ -sarcina y el tag de histidinas. Dicho fragmento se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *SalI*, dando lugar al fragmento pequeño *NotI*-L5- $\alpha$ S-Histag-*SalI*. Simultáneamente se digirió el plásmido pPICZ $\alpha$ A-EGFR-CD3, cedido por el grupo de la Dra. Sanz Alcober del Hospital Puerta de Hierro de Madrid con las mismas enzimas de restricción, obteniendo el fragmento grande *NotI*-VHHEGFR-*SalI*. Ambos fragmentos se ligaron y el producto de ligación se transformó en células *E. coli* DH5 $\alpha$ F'. A partir de las colonias obtenidas se purificó el vector de expresión pPICZ $\alpha$ AVHHEGFR $\alpha$ S, comprobándose mediante secuenciación que la construcción (**Figura B.1**) presentaba la secuencia correcta.

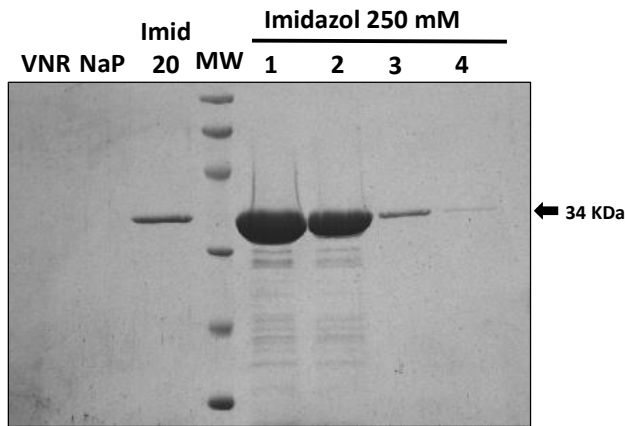


**Figura B.1. Diagrama esquemático mostrando la secuencia codificante (A) y proteica correspondiente al modelo de estructura en disolución (B) de la nanoimmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S.** Se destacan los diferentes componentes del cDNA de la nanoimmunotoxina (A). De izquierda a derecha, el péptido  $\alpha$ , el dominio marcador VHH 7D12 frente al EGFR, el dominio tóxico  $\alpha$ -sarcina y el tag de histinas para su purificación. EL dominio tóxico está separado del dominio marcador por el linker de 5 aa (L5). En cuanto a los dominios estructurales de VHHEGFR $\alpha$ S (B) se muestra el dominio marcador VHHEGFR y el dominio tóxico constituido por la  $\alpha$ -sarcina.

#### 1.2 Producción y purificación de VHHEGFR $\alpha$ S.

El vector de expresión pPICZ $\alpha$ AVHHEGFR $\alpha$ S, se linealizó con la enzima de restricción *PmeI* y se electroporó en la cepa KM71H de *Pichia pastoris*. Siguiendo una metodología similar a la descrita en el bloque anterior, se llevó a cabo una prueba de expresión a pequeña escala, para determinar las condiciones óptimas de producción y secreción, así como para identificar aquellas colonias con mayor expresión de nanoimmunotoxina. Para ello, se seleccionaron diferentes colonias, y se indujo la expresión por incubación en BMMY, a diferentes temperaturas, tomándose alícuotas cada 24 horas. El resultado de la prueba de expresión se analizó mediante *Western Blot* utilizando un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina, concluyendo que las condiciones óptimas de inducción implicaban incubación en BMMY a 25°C durante 24 horas.

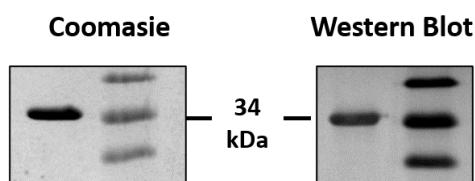
## Resultados Bloque B



**Figura B.2. Análisis electroforético por PAGE-SDS**, y posterior tinción con azul de Coomasie de las distintas alícuotas obtenidas durante el proceso de purificación de VHHEGFR $\alpha$ S. De izquierda a derecha se indica: VNR, volumen no retenido; NaP, lavado con tampón fosfato sódico; Imid20, lavado con tampón fosfato sódico imidazol 20 mM; MW, patrón de pesos moleculares; 1-4, las fracciones eluidas con tampón fosfato sódico imidazol 250 mM.

VHHEGFR $\alpha$ S se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa (**Figura B.2**).

Tal y como se observa en la **Figura B.2**, se detectaron grandes cantidades de VHHEGFR $\alpha$ S, tanto en el lavado con 20 mM de imidazol, como en las diferentes fracciones recogidas de la elución con imidazol 250 mM. Además, y de acuerdo con la cantidad de proteína aplicada en el gel, no se detectó prácticamente degradación de la inmunotoxina.



**Figura B.3. Análisis electroforético** mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomasie y **Western Blot** utilizando un anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina y revelado mediante DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la fracción final purificada de VHHEGFR $\alpha$ S (1  $\mu$ g).

A continuación, para la producción de VHHEGFR $\alpha$ S se seleccionó la colonia con mayor nivel de expresión, y se siguió la metodología descrita anteriormente y recogida en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos. Tras 24 horas de inducción se recogió el medio extracelular, y se dializó frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,1M, pH 7,5; en bolsas con un tamaño de diámetro poro de 6-8 kDa.

Se juntaron las fracciones conteniendo VHHEGFR $\alpha$ S y se dializaron frente al tampón de cromatografía, con el fin de retirar el imidazol. La identidad y pureza de la nanoimmunotoxina aislada se analizó mediante

electroforesis e inmunodetección (**Figura B.3**), obteniéndose un rendimiento final de 4 mg/L de medio de inducción de nanoimmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S, purificada a homogeneidad que presentaba el tamaño esperado de aproximadamente 34 kDa.

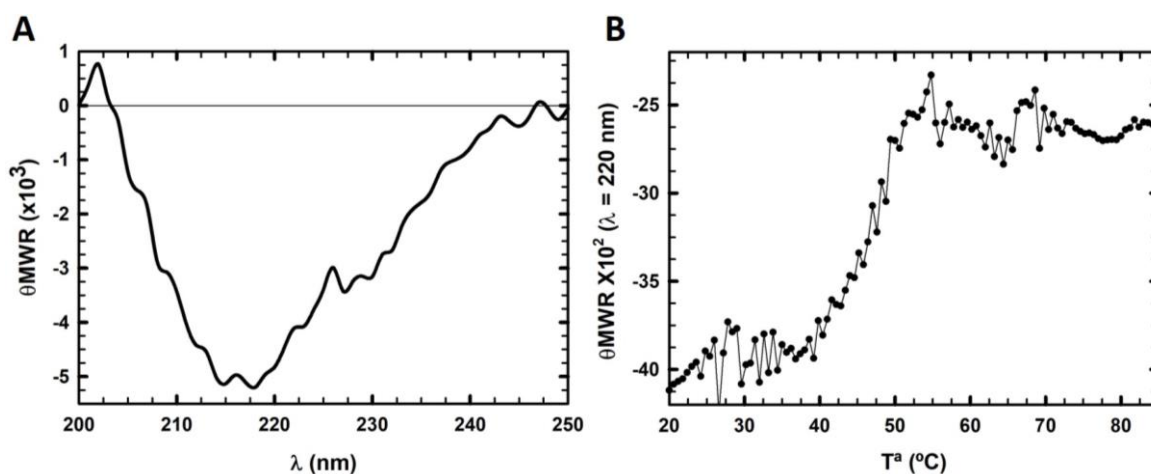
## Resultados Bloque B

### 1.3. Caracterización estructural de VHHEGFR $\alpha$ S.

Tras la purificación de la nanoimmunotoxina, se calculó su coeficiente de extinción al 0,1% ( $E^{0,1\%}$ ), utilizándose el software ProtParam y obteniéndose un valor de  $1,718 \text{ (cm.mg/ml)}^{-1}$ .

El espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano registrado para VHHEGFR $\alpha$ S (**Figura B.4A**) fue compatible con el de una proteína que presenta un plegamiento globular en disolución, con un alto contenido de estructura secundaria en lámina  $\beta$  y una pequeña contribución de hélice  $\alpha$ , y por tanto coherente con lo descrito para las contribuciones estructurales nativas de sus dominios (Campos-Olivas *et al.*, 1996; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2013; Harmsen *et al.*, 2007).

Por otro lado, se llevó a cabo el cálculo de la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de VHHEGFR $\alpha$ S, registrando la variación de elipticidad molar por residuo a 220 nm en función de la temperatura (**Figura B.4B**). La determinación de la  $T_m$  se calculó mediante la derivada primera del registro de la  $\theta_{MRW}/\Delta T$ , obteniéndose un valor de  $50^\circ\text{C}$ , frente a las temperaturas de  $80\text{-}90^\circ\text{C}$  a los cuales los VHH aislados mantienen la capacidad de unirse a sus antígenos (Van der Linden *et al.*, 1999; Harmsen *et al.*, 2007).



**Figura B.4. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de VHHEGFR $\alpha$ S**  
A) Espectro de dicroísmo circular de VHHEGFR $\alpha$ S (0,2 mg/ml, en tampón fosfato sódico) en el UV lejano.  $\theta_{MWR}$  representa la elipticidad molar por residuo como grados  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ . B)  $T_m$  de VHHEGFR $\alpha$ S, a 0,2 mg/ml en tampón fosfato sódico. En el eje de ordenadas se representa la elipticidad molar por residuo a 220nm como grados  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ .

### 1.4 Caracterización funcional de VHHEGFR $\alpha$ S.

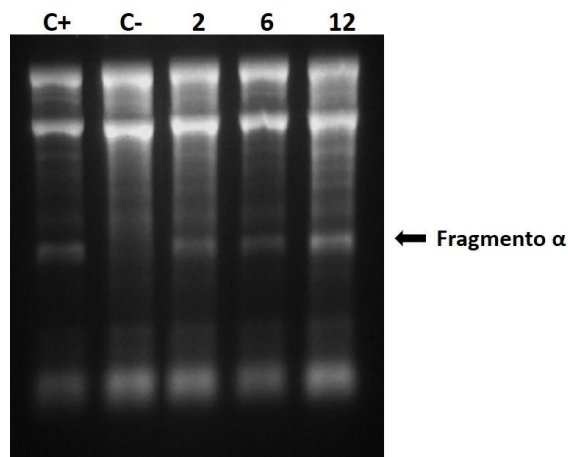
La caracterización funcional de VHHEGFR $\alpha$ S consistió, en primer lugar, en la caracterización de sus dominios por separado: el dominio tóxico y el dominio marcador, mediante el análisis de su actividad ribonucleolítica y capacidad de unión específica a EGFR, respectivamente. Además, se incluyeron estudios de estabilidad por incubación de

## Resultados Bloque B

la construcción en condiciones homólogas a las fisiológicas. Posteriormente, se caracterizó la eficacia citotóxica específica sobre células EGFR-positivas, así como su eficacia antitumoral *in vivo* en ratones xenoinjertados. La metodología empleada, descrita en Materiales y Métodos, fue similar a la empleada con las inmunotoxinas descritas en el bloque anterior.

### 1.4.1 Caracterización del dominio tóxico de VHHEGFR $\alpha$ S.

La actividad ribonucleolítica específica de la  $\alpha$ -sarcina incluida en VHHEGFR $\alpha$ S se evaluó mediante el ensayo de reticulocitos. Como se observa en la **Figura B.5** la nanoimmunotoxina mantenía la actividad ribonucleolítica del dominio tóxico, como se deduce por la liberación del fragmento  $\alpha$ , siendo la intensidad de la banda del fragmento  $\alpha$  mayor a medida que se incrementa la cantidad de nanoimmunotoxina ensayada. Así, VHHEGFR $\alpha$ S mantiene la funcionalidad de su dominio tóxico.



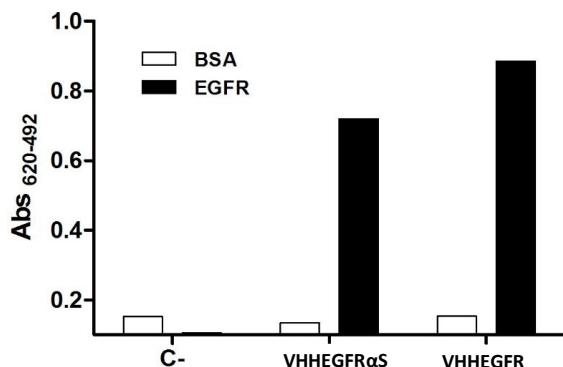
**Figura B.5. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica de VHHEGFR $\alpha$ S.** De izquierda a derecha: C+, Control positivo con  $\alpha$ -sarcina 2 pmol; C-, control negativo sin ribotoxina; 2, 6 y 12 corresponden a 2, 6 y 12 pmol de VHHEGFR $\alpha$ S. La flecha indica la posición del fragmento  $\alpha$ .

### 1.4.2 Caracterización del dominio marcador de VHHEGFR $\alpha$ S.

Para la caracterización del dominio marcador de la nanoimmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S, se realizaron dos tipos de ensayo de unión, frente al antígeno EGFR inmovilizado y frente a células EGFR-positivas. En primer lugar, como una primera aproximación de la unión, se llevó a cabo un ELISA con el antígeno EGFR inmovilizado en los pocillos, utilizando un VHHEGFR como control positivo (**Figura B.6**).

Como se observa en la figura, tanto VHHEGFR como VHHEGFR $\alpha$ S se unieron específicamente al antígeno EGFR, sin que se apreciase unión inespecífica a la albúmina de suero bovino (BSA) utilizada como control negativo. Además, el dominio tóxico no interfirió significativamente con la capacidad de unión, siendo ésta aproximadamente de un 80%, respecto al control.

## Resultados Bloque B

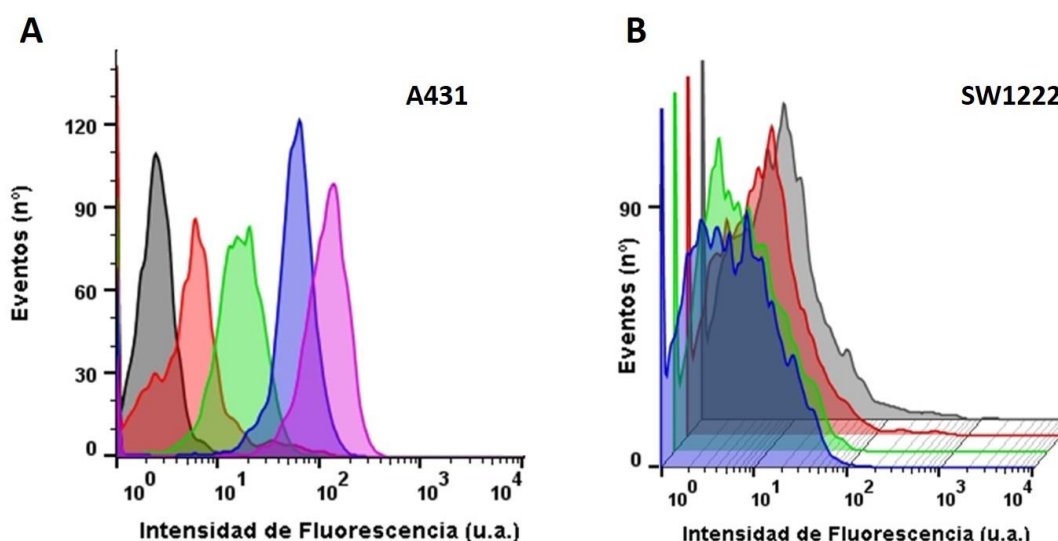


**Figura B.6. ELISA de unión de VHHEGFRαS a EGFR inmovilizado en placa.** Los pocillos fueron tapizados con EGFR o con BSA como control -. Como control positivo del ensayo, se utilizó un VHH frente a EGFR. Como control negativo de unión se utilizó tampón sin proteína.

Una vez evaluada la unión al antígeno inmovilizado por ELISA, se llevó a cabo un ensayo de unión mediante citometría de flujo sobre células EGFR+ y EGFR- (**Figura B.7**), de este modo, se tiene en cuenta la disposición en la membrana celular del EGFR en un contexto celular de interacción con otras proteínas, pudiendo modificarse los epítopos a los que se une el VHH.

Los resultados mostrados en la **Figura B.7** confirmaron la capacidad de reconocimiento específico y unión a las células A431, que presentan  $10^7$  moléculas de EGFR en su superficie por célula (Lee *et al.*, 2005), sin que se observe unión en el caso de las células SW1222, descritas como EGFR- (Lee *et al.*, 2005), de acuerdo con la variación en la intensidad de fluorescencia observada.

Por otro lado, con las células A431, se observó una mayor unión a medida que se aumentaba la concentración de VHHEGFRαS, sin detectar saturación a la concentración de  $5 \mu\text{M}$  de nanoinmunotoxina de los receptores en la superficie celular y por tanto de la unión.



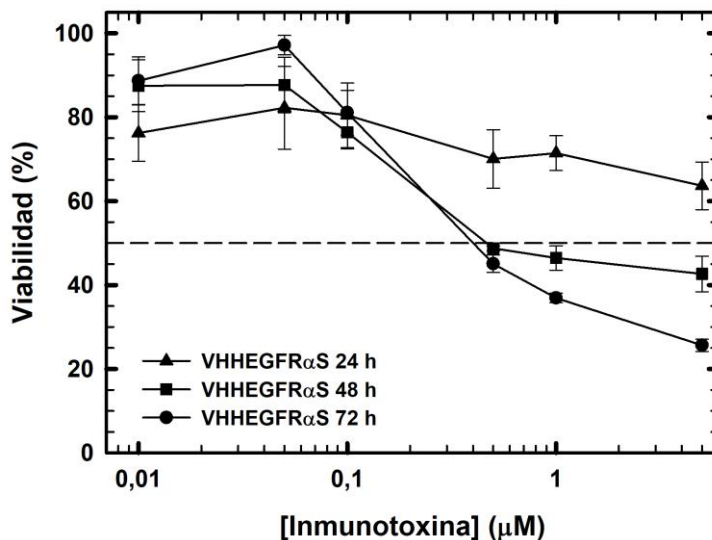
**Figura B.7. Ensayo de unión mediante citometría de flujo de VHHEGFRαS a células A431 (A) y SW1222 (B).** En ambos casos las concentraciones de nanoinmunotoxina empleada son 10 nM (rojo), 100 nM (verde) 1  $\mu\text{M}$  (azul) y 5  $\mu\text{M}$  (morado). En negro se representa el control de segunda capa.

## Resultados Bloque B

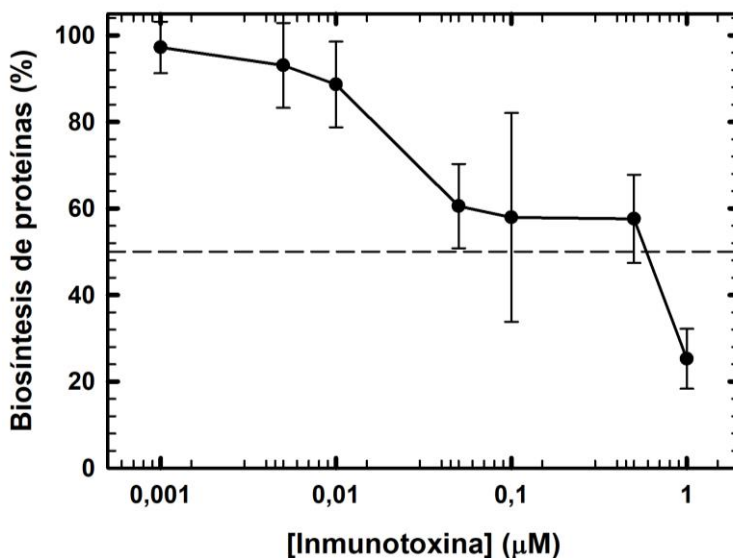
### 1.4.3. Caracterización de la capacidad citotóxica de VHHEGFR $\alpha$ S

Una vez demostrado que la nanoimmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S se unía al antígeno EGFR en la superficie de las células A431 y que no se producía unión a las células SW1222; se procedió a evaluar su eficacia citotóxica, utilizando como modelo las células A431, EGFR+.

Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular por MTT, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Debido a la



**Figura B.8** Ensayo de viabilidad clásico mediante MTT de la nanoimmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S, a las 24 (triángulos), 48 (cuadrados) y 72 horas (círculos) sobre células A431. La línea discontinua horizontal marca el 50% de viabilidad.



**Figura B.9.** Ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas de VHHEGFR $\alpha$ S, a las 72 horas de incubación sobre células A431. La línea discontinua horizontal marca el 50% de inhibición de la biosíntesis de proteínas.

elevada tasa de crecimiento de las células A431, respecto de las SW1222 utilizadas habitualmente con los otros diseños de inmunotoxinas frente a GPA33, se partió de un menor número de células por pocillo, concretamente 2.000 células/pocillo.

Los resultados, mostrados en la **Figura B.8**, mostraron una citotoxicidad específica de VHHEGFR $\alpha$ S sobre las células A431, siendo este efecto citotóxico mayor y dependiente del tiempo y la concentración de inmunotoxina. Así, VHHEGFR $\alpha$ S presentó una IC<sub>50</sub> de aproximadamente 300 nM a las 72 horas de incubación.

Por otro lado, se llevó a cabo el ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas, característico de las ribotoxinas, por incubación de VHHEGFR $\alpha$ S con las

## Resultados Bloque B

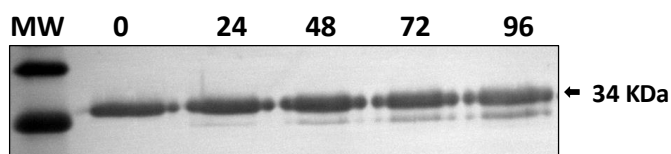
células A431 (Ver apartado Materiales y Métodos: Ensayos de citotoxicidad). Para ello se sembró el mismo número de células por pocillo que en el caso del MTT, y se incubaron con distintas concentraciones de VHHEGFR $\alpha$ S durante 72 horas (**Figura B.9**), obteniéndose un valor de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 200 nM.

### 1.4.4. Caracterización de la estabilidad de VHHEGFR $\alpha$ S.

Una vez evaluada la eficacia citotóxica de VHHEGFR $\alpha$ S, y la funcionalidad de cada uno de sus dominios integrantes, se procedió a la evaluación de su estabilidad en condiciones similares a las fisiológicas, tal y como se explicó en el bloque anterior.

Para ello, se tomaron alícuotas de VHHEGFR $\alpha$ S a 1 $\mu$ M, y se incubaron en PBS o medio durante 24, 48, 72 y 96 horas a 37°C, utilizando como control interno de los diversos ensayos una alícuota de proteína sin incubación previa. La integridad y estabilidad estructural, se evaluó mediante *Western Blot*, y registro de los espectros de dicroísmo circular de cada una de las alícuotas, evaluándose el mantenimiento de la función del dominio marcador (VHH) mediante un ensayo de unión a células A431 por citometría de flujo.

Como se observa en la **Figura B.10**, VHHEGFR $\alpha$ S mantuvo mayoritariamente su integridad estructural, sin que se observase una pérdida significativa de la misma a lo largo del tiempo. Únicamente, se observó la aparición de una segunda banda tenue por debajo de la banda correspondiente a la inmunotoxina, debido a una posible degradación.



**Figura B.10. Ensayo de estabilidad. Análisis de la integridad molecular mediante *Western Blot*** de alícuotas correspondientes a los distintos tiempos de incubación de VHHEGFR $\alpha$ S en PBS a 37°C. De izquierda a derecha: MW, patrón de pesos moleculares; y 0, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. Se utilizó un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina.

Por otro lado, el registro de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de VHHEGFR $\alpha$ S a los diferentes tiempos de incubación (**Figura B.11**) confirmó que la inmunotoxina mantiene la misma estructura secundaria, caracterizada por el predominio de estructura  $\beta$ , e

indicativo de un plegamiento adecuado para una proteína globular en disolución. Por tanto, la ligera degradación observada en el *Western Blot* no tiene efectos perceptibles a nivel de estructura secundaria.

## Resultados Bloque B

Respecto al dominio marcador de VHHEGFR $\alpha$ S, los resultados del ensayo de unión por citometría de flujo mostraron que la unión específica a las células A431, EGFR-positivas se mantenía, independientemente del tiempo de incubación en medio a 37°C (Figura B.12A), obteniéndose un porcentaje de células marcadas por VHHEGFR $\alpha$ S prácticamente constante, alrededor del 80% respecto al control a tiempo cero (Figura B.12B).

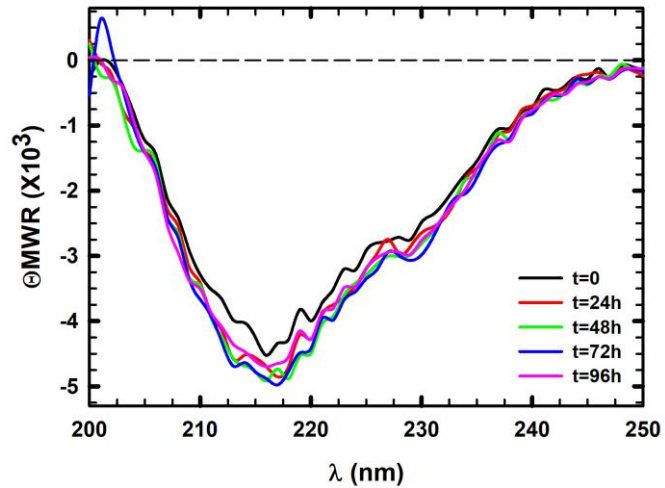


Figura B.11. Ensayo de estabilidad. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de alícuotas correspondientes a los distintos tiempos de incubación de VHHEGFR $\alpha$ S (1  $\mu$ M). ( $\theta_{MWR}$  equivale a la elipticidad molar por residuo, expresada como grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ).

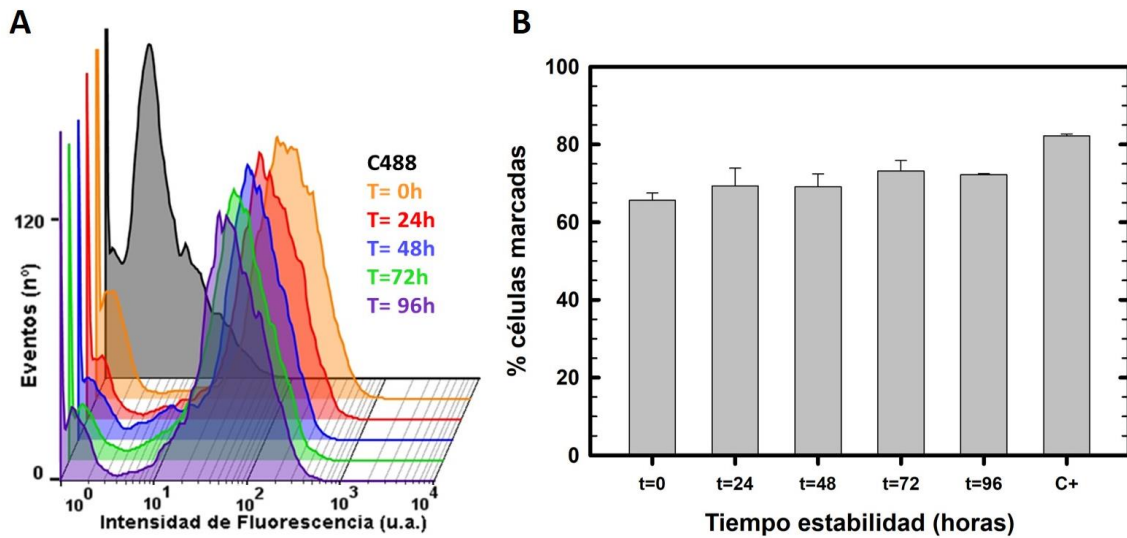


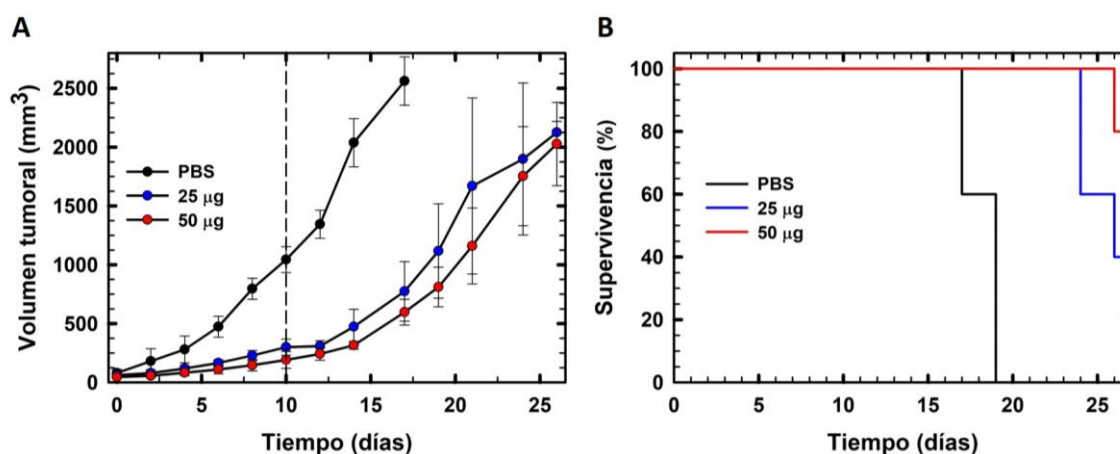
Figura B.12. Ensayo de estabilidad funcional del dominio marcador de VHHEGFR $\alpha$ S. A) Análisis de la intensidad de fluorescencia para cada una de las alícuotas de la estabilidad de VHHEGFR $\alpha$ S 1 $\mu$ M en citometría de flujo frente a células A431. En negro se representa el control de segunda capa. B) % de células marcadas por VHHEGFR $\alpha$ S 1 $\mu$ M para cada una de las alícuotas de estabilidad. El control + se trata de VHHEGFR $\alpha$ S 1 $\mu$ M en PBS.

## Resultados Bloque B

### 1.4.5. Caracterización del efecto antitumoral *in vivo* de VHHEGFR $\alpha$ S.

Tras la comprobación que VHHEGFR $\alpha$ S presentaba actividad citotóxica sobre células EGFR+ *in vitro*, y que mantenía su integridad estructural y funcional a lo largo del tiempo, se procedió a analizar su efecto antitumoral *in vivo* sobre ratones xenoinjertados con células A431.

Para ello, se diseñó un experimento *in vivo* con tres grupos experimentales de cinco ratones cada uno: grupo control tratado con PBS y dos grupos de tratamiento con 25 o 50  $\mu$ g/dosis de VHHEGFR $\alpha$ S. De manera similar a los ensayos *in vivo* del bloque anterior, se comenzó el tratamiento cuando el volumen del tumor xenoinjertado alcanzó los 50 mm<sup>3</sup>, se administraron 6 dosis cada 48 horas, y se monitorizó el volumen tumoral hasta los 27 días.



**Figura B.13. Actividad antitumoral *in vivo* de VHHEGFR $\alpha$ S en ratones xenoinjertados con células A431 (n=5).** A) Gráfica con la evolución del crecimiento tumoral de los 3 grupos experimentales: tratados con PBS (negro), con 25  $\mu$ g/dosis (azul) o 50  $\mu$ g/dosis (rojo) de VHHEGFR $\alpha$ S cada 48 horas. La línea vertical indica el final del tratamiento. B) Gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de los distintos grupos experimentales: tratados con PBS (negro) o 25  $\mu$ g (azul) o 50  $\mu$ g (rojo) de VHHEGFR $\alpha$ S.

Los resultados mostrados en la **Figura B.13A** indicaron un potente efecto inhibitor del crecimiento tumoral, con una reducción del volumen tumoral de 3 veces para el caso de la administración de 25  $\mu$ g y de 5 veces para el caso de la administración de 50  $\mu$ g respecto al control el último día de tratamiento. No obstante, tras el tratamiento, tanto el grupo de 25  $\mu$ g como el de 50  $\mu$ g mostraron una recurrencia del volumen tumoral alcanzando ambos grupos un volumen de 2000 mm<sup>3</sup> el día 27, sin que se observase diferencia entre ambos grupos al final del ensayo. No obstante, cuando se analiza la supervivencia (**Figura B.13B**), el grupo tratado con 50  $\mu$ g sí que mostró una mayor supervivencia que el grupo tratado con 25  $\mu$ g, mostrando una supervivencia del 80% y del 40% respectivamente a los 27 días.

**2. DISEÑO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TriVHHEGFRαS**

En este apartado se presentan los resultados correspondientes al diseño, producción, purificación y caracterización de una variante con formato trimérico de la nanoimmunotoxina VHHEGFRαS original, mediante la inclusión de un dominio de trimerización basado en el extremo amino terminal del dominio NC1 del colágeno XVIII (TIE<sup>XVIII</sup>) (**Figura B.14**)

**2.1 Construcción del vector de expresión pPICZαAVHHEGFRTriαS.**

Se partió del plásmido pPICZαAA33TriαS, previamente obtenido en nuestro grupo de investigación para la producción de la inmunotoxina con formato trimérico IMTXTriA33αS, el cual se digirió con la enzima *NotI*, obteniéndose un fragmento pequeño de extremos romos *NotI*-L21TriL21-*NotI*, incluyendo la secuencia codificante del dominio de trimerización y de los *linkers* flanqueantes. Paralelamente, se digirió el plásmido pPICZαAVHHEGFRαS con la misma enzima y se desfosforiló para evitar su religación (Ver Materiales y Métodos: Ligación de DNA). Posteriormente, se llevó a cabo la ligación del

fragmento grande desfosforilado

pPICZαAVHHEGFRαS-

*NotI* y el fragmento pequeño *NotI*-L21TriL21-

*NotI*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli*

DH5αF' obteniéndose el vector de expresión

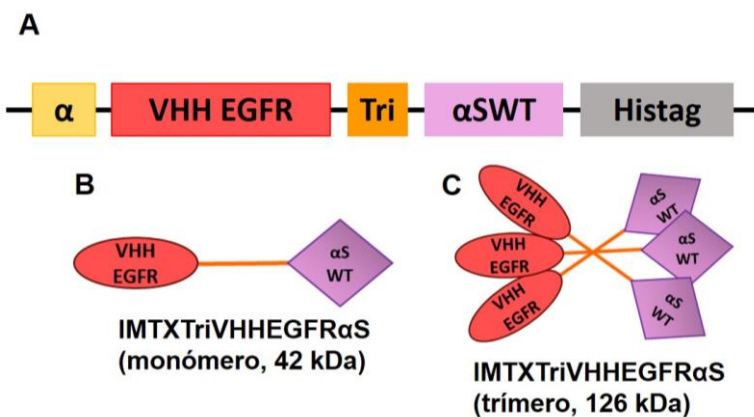
pPICZαAVHHEGFRTriαS

a partir de las colonias transformantes. Mediante

secuenciación se comprobó que se disponía

de la construcción génica con la secuencia correcta

(**Figura B.14**).



**Figura B.14. Diagrama esquemático mostrando la secuencia codificante (A) y proteica correspondiente al monómero (B) y a la estructura trimérica en disolución (C) de la nanoimmunotoxina TriVHHEGFRαS.** Se destacan los diferentes componentes del cDNA de la nanoimmunotoxina (A). De izquierda a derecha, el péptido α, el dominio marcador VHH 7D12 frente al EGFR, el dominio de trimerización, el dominio tóxico α-sarcina y el tag de histinas para su purificación. En cuanto a los dominios estructurales de TriVHHEGFRαS (B y C) se muestra el dominio marcador VHHEGFR y el dominio tóxico constituido por la α-sarcina. Se indica el tamaño molecular teórico del monómero y de la inmunotoxina trimérica en disolución.

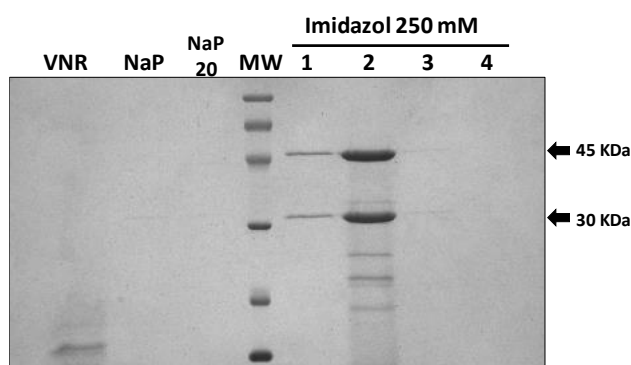
## Resultados Bloque B

### 2.2 Producción y purificación de TriVHHEGFR $\alpha$ S.

Una vez obtenido el vector de expresión pPICZ $\alpha$ AVHHEGFR $\alpha$ S, se digirió con la enzima de restricción *PmeI* para su linealización, y su posterior electroporación en la cepa KM71H de *P. pastoris*.

Tras el crecimiento y selección de colonias que habían incorporado el plásmido en placas de YPDS-zeocina se llevó a cabo una prueba de expresión con diferentes colonias, a diferentes tiempos y temperaturas de inducción, con el fin de determinar las condiciones óptimas de inducción, así como la colonia que expresaba mayor cantidad de TriVHHEGFR $\alpha$ S. Se seleccionó la colonia adecuada y se determinó que las condiciones óptimas de inducción eran, incubación en BMMY a 25°C durante 72 horas.

Una vez fijadas las condiciones, se realizó una expresión a gran escala, utilizando la colonia seleccionada. Se creció en medio BMGY durante 24 horas a 30°C, y se indujo la expresión de la proteína en medio BMMY durante 72 horas a 25°C. Tras el tiempo de inducción, se recogió el medio extracelular y se dializó frente a tampón fosfato sódico.

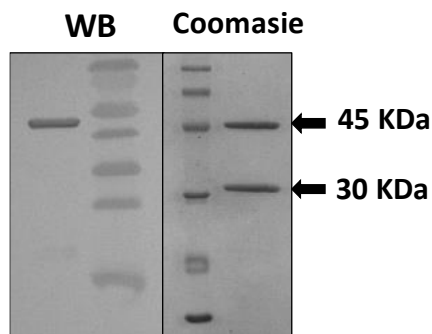


**Figura B.16. Análisis electroforético** mediante PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie **de la purificación de TriVHHEGFR $\alpha$ S.** De izquierda a derecha: VNR, volumen no retenido; NaP, lavado con tampón fosfato sódico; NaP 20, lavado con tampón fosfato sódico Imidazol 20 mM; MW, patrón de pesos moleculares; Imidazol 250 mM, las fracciones de la elución.

Siguiendo la metodología descrita para las otras construcciones de inmunotoxina, TriVHHEGFR $\alpha$ S se purificó a partir del medio extracelular mediante cromatografía de afinidad de Ni<sup>2+</sup>-NTA. El análisis electroforético, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, de la purificación (**Figura B.16**) mostró la presencia de 2 bandas de proteína en las fracciones de elución, una banda superior correspondiente a unos 45 KDa, que coincidiría con el tamaño molecular esperado para un monómero de TriVHHEGFR $\alpha$ S (42 KDa) y otra banda de menor tamaño correspondiente a 30 KDa.

Las fracciones conteniendo TriVHHEGFR $\alpha$ S se juntaron y dializaron frente a tampón fosfato sódico para eliminar el exceso de imidazol presente en la disolución, purificándose la nanoimmunotoxina con un rendimiento final de 0,4 mg/L de medio de inducción.

## Resultados Bloque B



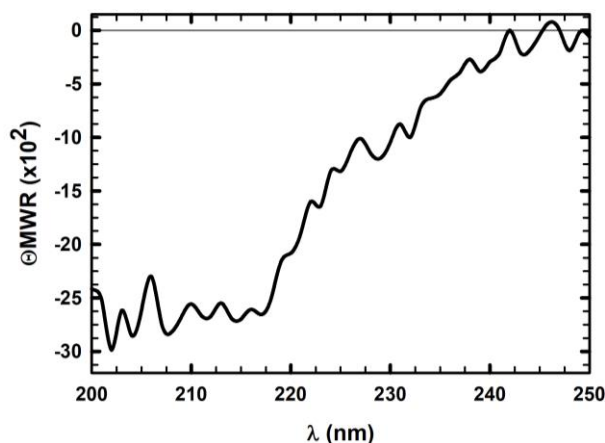
**Figura B.17.** Análisis electroforético por PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie (derecha) y **Western Blot** (izquierda) de TriVHHEGFR $\alpha$ S purificada de (1  $\mu$ g). Para el *Western Blot* se utilizó un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina.

Como se observa en la **Figura B.17**, de las 2 bandas que se observaban en la tinción por Coomassie, solamente la de 45 KDa presentaba el dominio tóxico  $\alpha$ -sarcina, de acuerdo con la inmunodetección realizada utilizando un Ab anti  $\alpha$ -sarcina, y que correspondería a un monómero de TriVHHEGFR $\alpha$ S. Sin embargo, la banda de 30 KDa, por tamaño, correspondería a un monómero de TriVHHEGFR sin el dominio tóxico. Este aspecto se desarrollará con mayor profundidad en el apartado de Discusión.

### 2.3. Caracterización estructural de TriVHHEGFR $\alpha$ S.

Tras la purificación de la nanoinmunotoxina, se calculó el coeficiente de extinción al 0,1% ( $E^{0,1\%}$ ) de la proteína, mediante el software ProtParam, obteniéndose un valor de  $E^{0,1\%}$  de  $1,67 \text{ (cm.mg/ml)}^{-1}$ .

La caracterización estructural de TriVHHEGFR $\alpha$ S implicó, en primer lugar, el registro del espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano, con el fin de determinar el correcto plegamiento de la proteína en disolución, así como el contenido de estructura secundaria mayoritario.



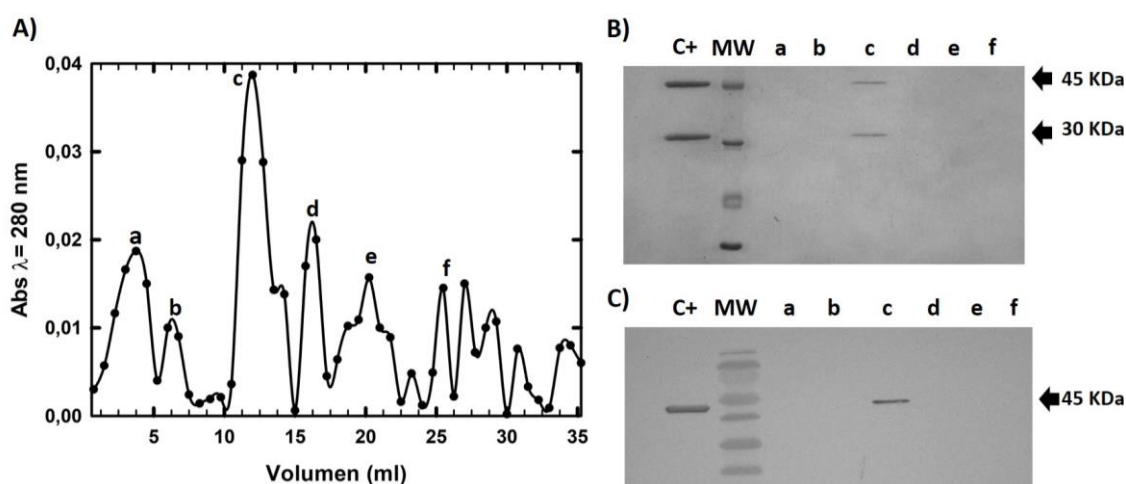
**Figura B.18.** Análisis conformacional mediante registro de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de TriVHHEGFR $\alpha$ S (0,2mg/ml), en tampón fosfato sódico.  $\Theta_{MWR}$  representa la elipticidad molar por residuo como grados  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$  a las distintas longitudes de onda.

En la **Figura B.18** se observa que TriVHHEGFR $\alpha$ S presentó un plegamiento adecuado, y un contenido de estructura secundaria mayoritario de lámina  $\beta$  y estructura no ordenada. El incremento observado en la contribución de estructura no ordenada se justifica por la presencia y flexibilidad de los *linkers* de 21 aminoácidos que flanquean el dominio de trimerización (Blanco-Toribio *et al.*, 2014; Lázaro-Gorines *et al.*, 2019).

## Resultados Bloque B

Una vez determinado el plegamiento adecuado de TriVHHEGFR $\alpha$ S, se procedió a comprobar si la nueva variante de nanoinmunotoxina se encontraba en disolución como una proteína trimérica en condiciones nativas, para lo cual se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en FPLC con una columna Superdex 200 10/300 GL.

El perfil de elución de la cromatografía (**Figura B.19A**) mostró un pico principal (c, en la figura) cuyo análisis electroforético por tinción con azul de Coomasie (**Figura B.19B**), así como por *Western Blot* con un anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina (**Figura B.19C**), mostró la presencia de TriVHHEGFR $\alpha$ S. Por otro lado, en el resto de los picos obtenidos no se detectó la presencia ni de TriVHHEGFR $\alpha$ S, ni de ninguna otra proteína. El volumen de elución de este pico corresponde con una masa molecular de aproximadamente 130 KDa, lo que corresponde con el peso molecular teórico de TriVHHEGFR $\alpha$ S en formato trimérico (126 KDa), confirmando que en condiciones nativas, TriVHHEGFR $\alpha$ S presentaba formato trimérico en disolución (Blanco-Toribio *et al.*, 2014; Lázaro-Gorines *et al.*, 2019).



**Figura B.19. Análisis de la cromatografía de penetrabilidad por FPLC.** A) Perfil cromatográfico de las distintas fracciones obtenidas durante la elución. B) Análisis electroforético mediante PAGE-SDS y posterior tinción por Coomasie de las distintas fracciones (a-f) de la cromatografía. C) *Western Blot* de las distintas fracciones (a-f) de la cromatografía. Se utilizó un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina y se reveló mediante DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tanto en B) como en C) se incluyó un C+ de TriVHHEGFR $\alpha$ S previo a cargar la proteína en la columna y un patrón de pesos moleculares (MW).

### 2.4. Caracterización funcional de TriVHHEGFR $\alpha$ S.

La caracterización funcional de TriVHHEGFR $\alpha$ S consistió en primer lugar en la caracterización de sus 2 dominios por separado: el dominio tóxico constituido por la  $\alpha$ -sarcina, y el dominio marcador consistente en el VHH frente al antígeno EGFR. Posteriormente se evaluó su eficacia citotóxica frente a células tumorales A431 (EGFR+) como indicativo de la acción conjunta de sus 2 dominios.

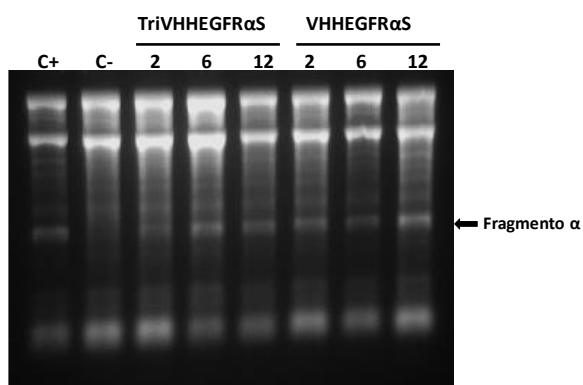
## Resultados Bloque B

A lo largo de toda la caracterización funcional de TriVHHEGFR $\alpha$ S, la concentración empleada en los ensayos fue la del monómero, para facilitar su comparación con VHHEGFR $\alpha$ S y evaluar la incidencia del formato trimérico sobre la eficacia antitumoral.

### 2.4.1. Caracterización del dominio tóxico de TriVHHEGFR $\alpha$ S.

Para la caracterización de la funcionalidad del dominio tóxico de TriVHHEGFR $\alpha$ S se llevó a cabo el ensayo de reticulocitos para evaluar la actividad ribonucleolítica específica.

Como se observa en la **Figura B.20** TriVHHEGFR $\alpha$ S mantenía la capacidad ribonucleolítica específica de su dominio tóxico, como queda de manifiesto por la presencia del fragmento  $\alpha$ , siendo esta actividad similar a la observada con la inmunotoxina monomérica VHHEGFR $\alpha$ S.



**Figura B.20. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica frente a ribosomas.** Se indican: C+,  $\alpha$ -sarcina 2 pmoles; C-, tampón; TriVHHEGFR $\alpha$ S 2, 6 y 12 p moles; VHHEGFR $\alpha$ S 2, 6 y 12 pmoles. La flecha indica la posición del fragmento  $\alpha$ .

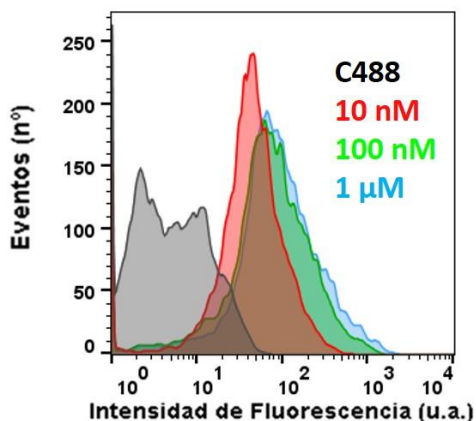
### 2.4.2. Caracterización del dominio marcador de TriVHHEGFR $\alpha$ S.

Al igual que para VHHEGFR $\alpha$ S, para la caracterización del dominio marcador de TriVHHEGFR $\alpha$ S, se llevó a cabo un ensayo de unión mediante citometría de flujo sobre células tumorales A431 (EGFR+).

En la **Figura B.21**, se recogen los resultados obtenidos tras la incubación de las células con diferentes concentraciones de TriVHHEGFR $\alpha$ S. Los resultados mostraron que la variante trimérica se unió específicamente a las células A431, alcanzándose la saturación en la unión incluso a la concentración más baja ensayada (10 nM).

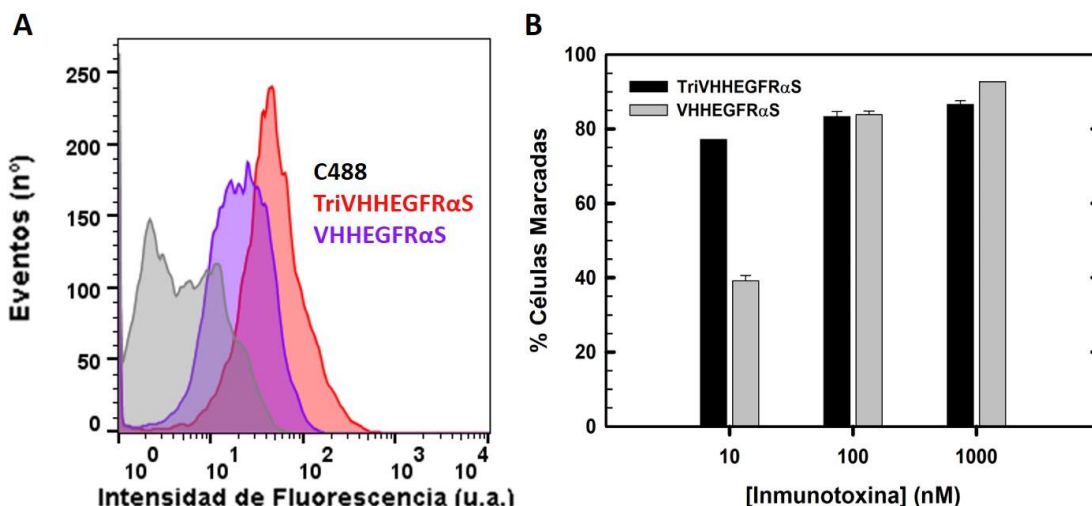
Cuando se comparó la capacidad de unión de TriVHHEGFR $\alpha$ S y VHHEGFR $\alpha$ S, a igualdad de concentración de monómero (**Figura B.22**), se observó que a 10 nM hay una mayor unión por parte de TriVHHEGFR $\alpha$ S a las células A431 que por parte de VHHEGFR $\alpha$ S,

## Resultados Bloque B



**Figura B.21.** Ensayo de unión mediante citometría de flujo de diferentes concentraciones de TriVHHEGFR $\alpha$ S sobre las células A431. Se utilizaron distintas concentraciones de TriVHHEGFR $\alpha$ S: 10 nM (rojo), 100 nM (verde) y 1  $\mu$ M (azul). En negro se muestra el control de segunda capa.

obteniéndose así un mayor porcentaje de células marcadas (**Figura B.22B**). Esto indicaría una mayor avidéz en la unión, confirmando lo descrito previamente en otra variante trimérica caracterizada en nuestro grupo (Lázaro-Gorines *et al.*, 2019), lo que sugeriría que la unión de uno de los dominios marcadores a su correspondiente antígeno facilitaría la unión del resto de dominios marcadores; posibilitado por la flexibilidad que le confieren a la molécula los *linkers* de 21 residuos. (Cuesta *et al.*, 2010).



**Figura B.22.** Ensayo de unión mediante citometría de flujo de TriVHHEGFR $\alpha$ S y VHHEGFR $\alpha$ S sobre células A431. En A) se muestra el histograma comparando la Intensidad de Fluorescencia de las células con TriVHHEGFR $\alpha$ S 10 nM (rojo) y VHHEGFR $\alpha$ S 10 nM (morado). En B) se indican el porcentaje de células marcadas por distintas concentraciones de TriVHHEGFR $\alpha$ S (negro) o VHHEGFR $\alpha$ S (gris).

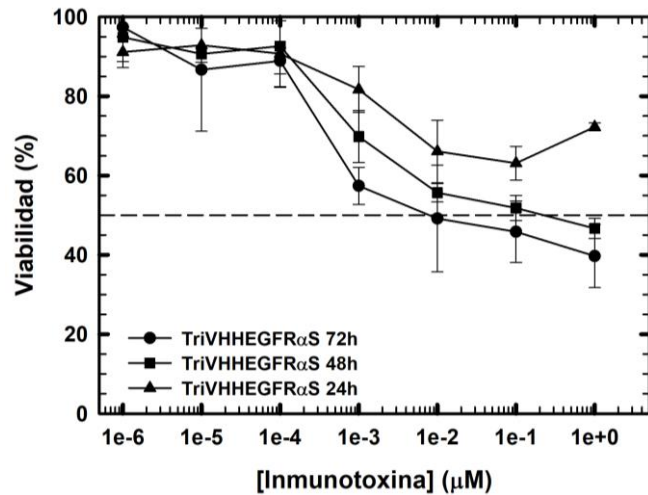
## Resultados Bloque B

### 2.4.3. Caracterización de la eficacia citotóxica de TriVHHEGFR $\alpha$ S.

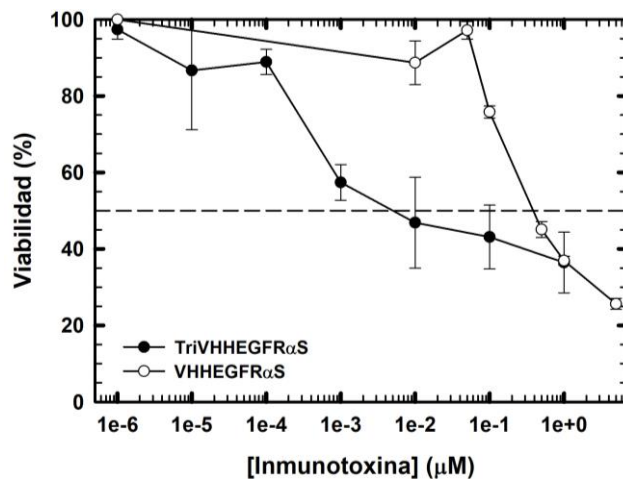
Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad, mediante un ensayo de viabilidad celular clásico por MTT sobre células tumorales A431, para evaluar la eficacia antitumoral de la nueva nanoimmunotoxina con formato trimérico.

Para ello, se sembraron 2.000 células/pocillo, y se añadieron diferentes concentraciones de TriVHHEGFR $\alpha$ S, que se incubaron a distintos tiempos. Los resultados, recogidos en la **Figura B.23**, demostraron la citotoxicidad específica sobre las células tumorales A431, disminuyendo su viabilidad a medida que se incrementó tanto la concentración de TriVHHEGFR $\alpha$ S como el tiempo de incubación, obteniéndose una IC<sub>50</sub> de 10 nM a las 72 horas de incubación.

Al comparar estos resultados con los obtenidos con la construcción monomérica original (**Figura B.24**) se observó un incremento significativo de la eficacia citotóxica, con una IC<sub>50</sub> 30 veces menor en el caso de la variante trimérica (IC<sub>50</sub> de 10 y 300 nM para TriVHHEGFR $\alpha$ S y VHHEGFR $\alpha$ S respectivamente).



**Figura B.23.** Ensayo de viabilidad celular mediante MTT de TriVHHEGFR $\alpha$ S sobre células A431 a diferentes tiempos. Se representan los resultados obtenidos a 24 horas (triángulos), 48 horas (cuadrados) y 72 horas (círculos). La línea discontinua horizontal indica el 50% de viabilidad celular



**Figura B.24.** Ensayo de viabilidad celular mediante MTT de TriVHHEGFR $\alpha$ S (negro) y VHHEGFR $\alpha$ S (blanco) sobre células A431 tras 72 horas de incubación. La línea discontinua horizontal indica el 50% de viabilidad celular.

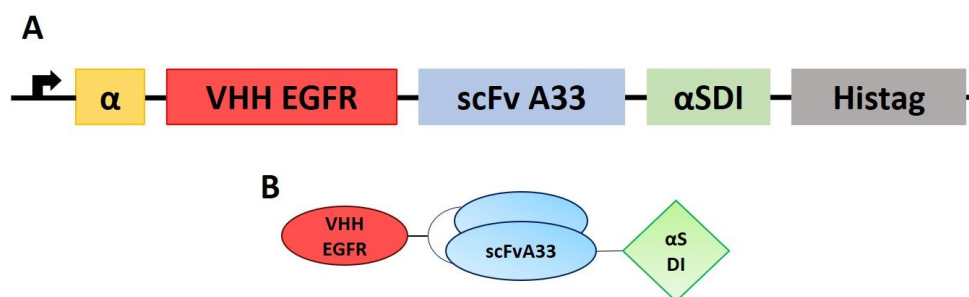
## Resultados Bloque B

### 3. DISEÑO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VHHEGFRA33 $\alpha$ SDI (Biesp- $\alpha$ SDI)

En este apartado se presentan los resultados correspondientes al diseño, producción, purificación y caracterización de un nuevo diseño de inmunotoxina biespecífica, que incluye como dominio marcador la combinación de VHHEGFR y scFvA33, y como dominio tóxico la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI) (**Figura B.25**).

#### 3.1. Construcción del vector de expresión pPICZ $\alpha$ ABiesp- $\alpha$ SDI.

Para la obtención del vector de expresión de la nueva construcción se siguió una metodología similar a la descrita en los apartados anteriores. Brevemente, se amplificó el fragmento de DNA *EcoRI*-VHHEGFRL5-*EcoRI* a partir del plásmido pPICZ $\alpha$ AVHHEGFR $\alpha$ S, descrito anteriormente, utilizando los oligos 7 y 8 como cebadores (Ver apartado Materiales y Métodos: Oligonucleótidos utilizados). Posteriormente, se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* tanto el fragmento pequeño obtenido como el plásmido pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI, obteniendo de esta manera el fragmento grande (*EcoRI*-pPICZ $\alpha$ AA33 $\alpha$ SDI). El fragmento grande se desfosforiló para evitar su religación, y se llevó a cabo la ligación con el fragmento pequeño *EcoRI*-VHHEGFRL5-*EcoRI*, obteniéndose el vector de expresión pPICZ $\alpha$ ABiesp- $\alpha$ SDI, a partir de las colonias transformadas. El plásmido obtenido se secuenció comprobándose que presentaba la secuencia correcta (**Figura B.25**).

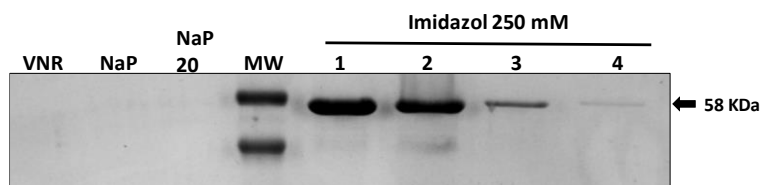


**Figura B.25.** Diagrama esquemático mostrando la secuencia codificante (A) y proteica correspondiente al modelo de estructura en disolución (B) de la inmunotoxina Biesp- $\alpha$ SDI. Se destacan los diferentes componentes del cDNA de la nanoinmunotoxina (A). De izquierda a derecha, el péptido  $\alpha$ , el dominio marcador VHH 7D12 frente al EGFR, el dominio marcador en formato scFv frente a GPA33, el dominio tóxico  $\alpha$ -sarcina-DI y el tag de histinas para su purificación. En cuanto a los dominios estructurales de Biesp- $\alpha$ SDI (B) se muestran los dominios marcadores VHHEGFR y scFvA33 y el dominio tóxico constituido por la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica.

## 3.2 Producción y purificación de Biesp- $\alpha$ SDI

Una vez obtenido el plásmido pPICZ $\alpha$ Biesp- $\alpha$ SDI se digirió con *PmeI* para linealizarlo y se llevó a cabo la electroporación en la cepa KM71H de *P. pastoris*. Tras la electroporación, se seleccionaron algunas de las colonias obtenidas y se llevó a cabo una prueba de expresión con el fin de determinar las condiciones óptimas para su producción, resultando en inducción a 25°C durante 24 horas, de acuerdo con el análisis mediante *Western Blot* de las diferentes alícuotas.

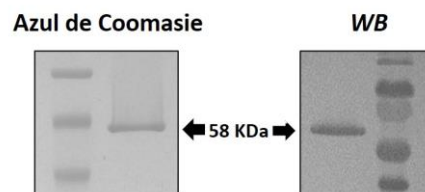
Siguiendo el protocolo correspondiente, la producción a gran escala se llevó a cabo a partir de la colonia seleccionada. Tras la inducción, se centrifugó el medio inducido para retirar



**Figura B.26. Análisis electroforético** por PAGE-SDS, y posterior tinción con azul de Coomasie **de las distintas alícuotas obtenidas durante el proceso de purificación de Biesp- $\alpha$ SDI.** De izquierda a derecha: VNR, volumen no retenido; NaP, lavado con tampón fosfato sódico; NaP20, lavado con tampón fosfato sódico imidazol 20mM; MW, patrón de pesos moleculares; 1-4 , las fracciones eluidas con tampón fosfato sódico imidazol 250 mM.

los restos celulares, y el sobrenadante se dializó repetidas veces frente a tampón de diálisis fosfato sódico. Biesp- $\alpha$ SDI se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA, eluyéndose la proteína con fosfato sódico conteniendo imidazol 250

mM. La presencia de Biesp- $\alpha$ SDI se determinó mediante análisis electroforético y posterior tinción con azul de Coomasie (**Figura B.26**), detectándose en las diferentes fracciones recogidas durante la elución con 250 mM de imidazol, sin que se observasen bandas de mayor movilidad, correspondientes a una posible degradación de la inmunotoxina biespecífica. Tras la electroforesis, se recogieron las fracciones en las que se detectó la presencia de Biesp- $\alpha$ SDI, y se dializaron frente a tampón de diálisis fosfato sódico, hasta retirar todo el imidazol presente en disolución. La identidad e integridad de la inmunotoxina se evaluó mediante análisis electroforético e inmunodetección (**Figura B.27**), comprobándose su purificación a homogeneidad, con una masa molecular de 58 KDa y un rendimiento final de 3 mg/L de medio de inducción.



**Figura B.27. Análisis electroforético** por PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomasie (izquierda) y **Western Blot** (derecha) de Biesp- $\alpha$ SDI purificada (1  $\mu$ g). Para el *Western Blot* se utilizó un anticuerpo primario anti  $\alpha$ -sarcina.

## Resultados Bloque B

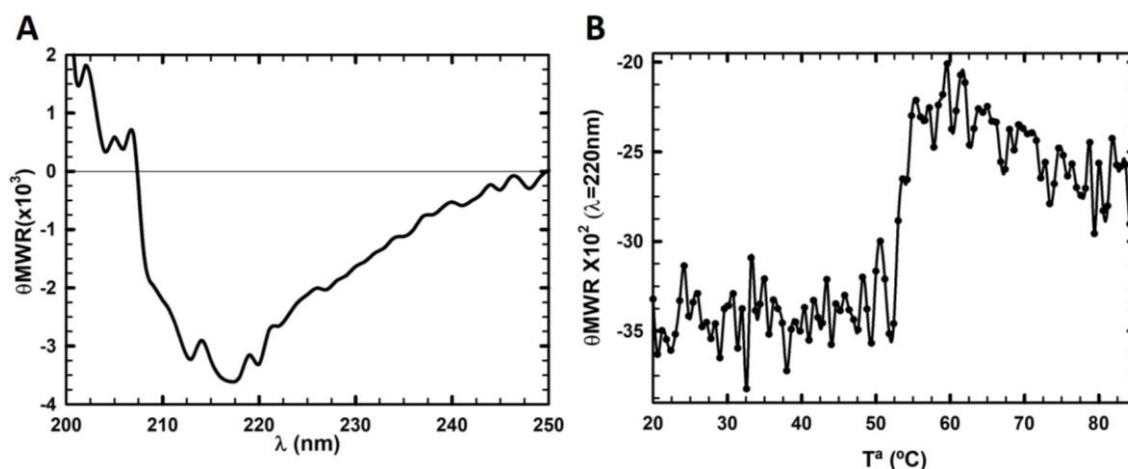
### 3.3 Caracterización estructural de Biesp- $\alpha$ SDI.

Tras la purificación, se procedió en primer lugar a la caracterización estructural de Biesp- $\alpha$ SDI, mediante espectroscopía de dicroísmo circular en el UV lejano, y análisis de su estabilidad térmica, mediante el cálculo de su  $T_m$ , a partir de la variación de la elipticidad molar por residuo a 220 nm en función de la temperatura.

Para ello, en primer lugar, se calculó el coeficiente de extinción teórico al 0,1% ( $E^{0,1\%}$ ) de la proteína, mediante el software ProtParam obteniéndose un valor de  $E^{0,1\%}$  de  $1,72 \text{ (cm.mg/ml)}^{-1}$ .

El espectro de CD obtenido (**Figura B.28A**) se correspondió con el de una proteína globular en disolución, con un predominio de estructura secundaria en lámina  $\beta$ , compatible con la estructura descrita para los componentes de sus diferentes dominios.

Por otro lado, se determinó un valor de  $T_m$  de Biesp- $\alpha$ SDI, correspondiente a  $55^\circ\text{C}$  aproximadamente (**Figura B.28B**), muy por encima de la temperatura fisiológica en la que llevaría a cabo su actuación terapéutica ( $37^\circ\text{C}$ ) indicando la termoestabilidad de la inmunotoxina recombinante en condiciones fisiológicas.



**Figura B.28. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano de Biesp- $\alpha$ SDI** A) Espectro de dicroísmo circular de Biesp- $\alpha$ SDI (0,2 mg/ml, en tampón fosfato sódico) en el UV lejano.  $\theta_{MWR}$  representa la elipticidad molar por residuo como grados  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ . B)  $T_m$  de Biesp- $\alpha$ SDI, a 0,2 mg/ml en tampón fosfato sódico. En el eje de ordenadas se representa la elipticidad molar por residuo a 220nm como grados  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$

### 3.4 Caracterización funcional de Biesp- $\alpha$ SDI.

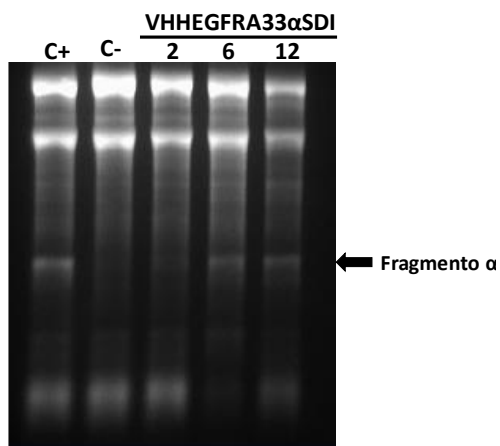
Tal como se ha llevado a cabo en la caracterización funcional de las inmunotoxinas anteriores, se analizó en primer lugar la función de cada uno de los dominios de Biesp- $\alpha$ SDI por separado: la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica como dominio tóxico y de VHHEGFR y

## Resultados Bloque B

scFvA33 como dominios marcadores. Finalmente, se analizó la eficacia citotóxica de Biesp- $\alpha$ SDI, sobre los dos tipos celulares diana, A431, como células EGFR+ y SW1222, como células GPA33+.

### 3.4.1. Caracterización del dominio tóxico de Biesp- $\alpha$ SDI.

Los resultados anteriores del bloque I, mostraron que la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica mantenía la actividad ribonucleolítica específica sobre ribosomas eucariotas, bien como



**Figura B.29. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica frente a ribosomas de Biesp- $\alpha$ SDI.** Se indican: C+,  $\alpha$ -sarcina 2 pmoles; C-, tampón; Biesp- $\alpha$ SDI 2, 6 y 12 pmoles. La flecha indica la posición del fragmento  $\alpha$ .

ribotoxina recombinante en disolución, bien formando parte de una inmunotoxina con el dominio marcador de scFvA33. Pese a ello, y debido al posible efecto del dominio marcador biespecífico sobre dicha actividad ribonucleolítica, se llevó a cabo el ensayo de reticulocitos, descrito anteriormente.

Como se observa (**Figura B.29**), Biesp- $\alpha$ SDI mantuvo la capacidad ribonucleolítica de la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica, como queda de manifiesto por la liberación del fragmento  $\alpha$  observada.

### 3.4.2 Caracterización del dominio marcador de Biesp- $\alpha$ SDI.

Si bien la capacidad de reconocimiento y unión a las células diana por parte de los dos dominios marcadores separados, VHHEGFR y scFvA33, ya se ha demostrado anteriormente y en trabajos previos del grupo de investigación, la presencia de ambos dominios juntos en este nuevo diseño de inmunotoxina biespecífica podría afectar a su funcionalidad. Por ello, se llevaron a cabo ensayos de unión mediante citometría de flujo sobre ambos tipos celulares.

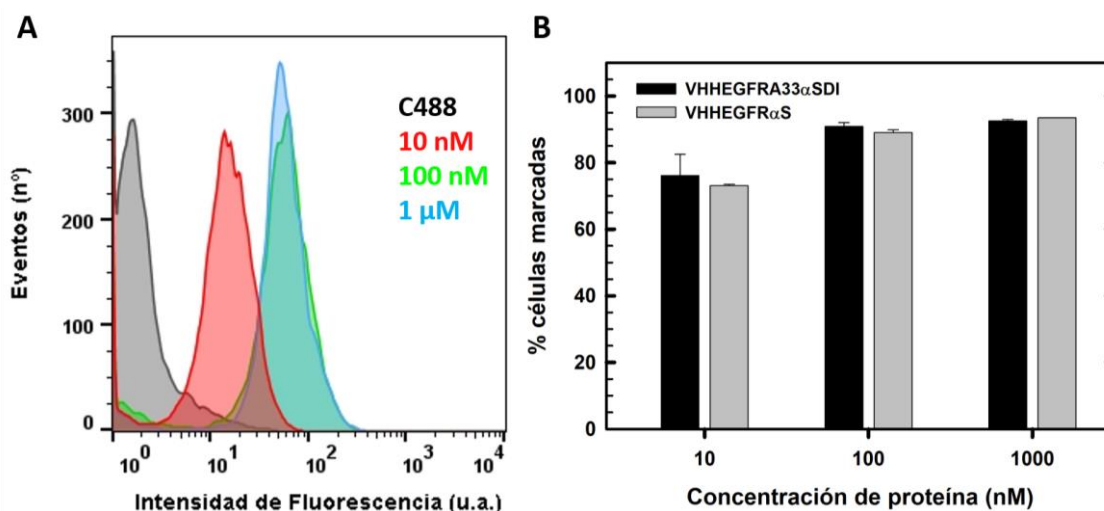
En primer lugar, se llevó a cabo la citometría de flujo sobre las células A431, para evaluar la función de reconocimiento y unión del dominio marcador VHHEGFR a su antígeno respectivo, el EGFR en la superficie de estas células.

Así, los resultados sobre las células A431, mostraron que se mantenía la capacidad de unión del dominio VHHEGFR, alcanzándose la saturación en dicha unión a partir de 100

## Resultados Bloque B

nM de inmunotoxina (**Figura B.30**). Como control + de unión a las células A431, se utilizó la nanoimmunotoxina previamente caracterizada, VHHEGFR $\alpha$ S.

Además, las características de esta interacción, de acuerdo con la cuantificación del porcentaje de células marcadas por Biesp- $\alpha$ SDI, fue idéntico al observado previamente con VHHEGFR $\alpha$ S para las células A431, siendo en ambos casos superior al 90% a partir de 10 nM de inmunotoxina ensayada.

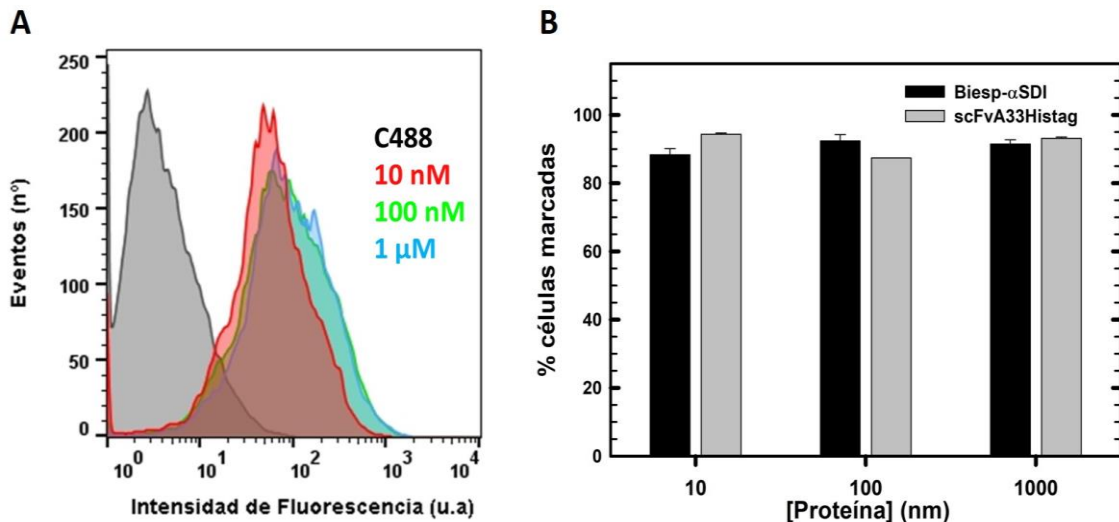


**Figura B.30.** Ensayo de unión mediante citometría de flujo de Biesp- $\alpha$ SDI frente a células A431. A) Histograma de la intensidad de fluorescencia para distintas concentraciones de Biesp- $\alpha$ SDI: 10 nM (rojo), 100 nM (verde), 1  $\mu$ M (azul) frente a células A431. B) % de células marcadas por Biesp- $\alpha$ SDI (negro) frente al control VHHEGFR $\alpha$ S (gris) a distintas concentraciones.

De manera similar, se procedió a la caracterización del dominio marcador scFvA33, utilizándose en este caso como control de unión el dominio marcador ya caracterizado scFvA33Histag (Tomé-Amat *et al.*, 2015a).

Nuevamente, se comprobó que el dominio scFvA33 presente en Biesp- $\alpha$ SDI mantenía la capacidad de unión a las células SW1222, alcanzándose la saturación de dicha unión con 10 nM de inmunotoxina (**Figura B.31**), y con un comportamiento idéntico al observado con la construcción scFvA33 libre, de acuerdo a la cuantificación del porcentaje de células marcadas.

## Resultados Bloque B



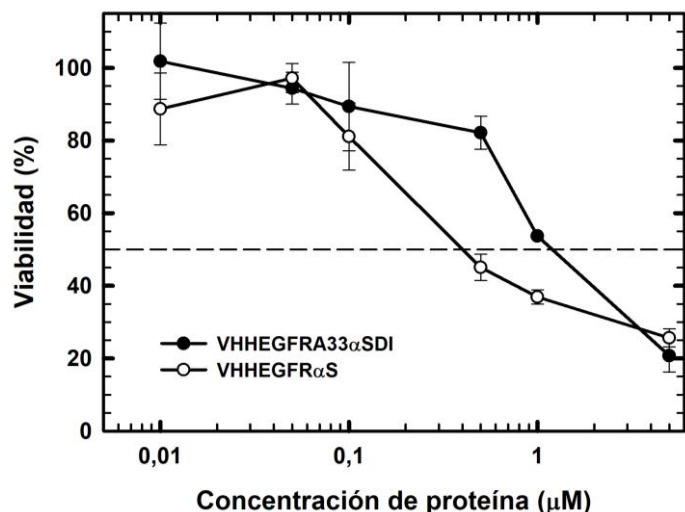
**Figura B.31. Ensayo de unión mediante citometría de flujo de Biesp- $\alpha$ SDI frente a células SW1222.** A) Histograma de la intensidad de fluorescencia para distintas concentraciones de Biesp- $\alpha$ SDI: 10 nM (rojo), 100 nM (verde), 1  $\mu$ M (azul) frente a células SW1222. B) % de células marcadas por Biesp- $\alpha$ SDI (negro) frente al control scFvA33Histag (gris) a distintas concentraciones.

### 3.4.3 Caracterización de la actividad citotóxica de Biesp- $\alpha$ SDI.

Una vez analizada y demostrada la correcta funcionalidad del dominio tóxico, y la de los dos componentes del dominio marcador en la inmunotoxina biespecífica, se procedió a la caracterización de su eficacia citotóxica sobre los dos tipos celulares diana, utilizados previamente, A431 (EGFR+) y SW1222 (GPA33+), utilizando como control positivo en cada ensayo, las construcciones descritas a lo largo de este trabajo, VHHEGFR $\alpha$ S e IMTXA33 $\alpha$ SDI, respectivamente.

En primer lugar, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad clásico con MTT sobre las células A431, incubando las células con distintas concentraciones de Biesp- $\alpha$ SDI y a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas).

Los resultados (Figura B.32) mostraron una citotoxicidad específica de Biesp- $\alpha$ SDI sobre las células A431 (EGFR+), a las 72 horas, con una IC<sub>50</sub> alrededor de 1  $\mu$ M, que sin embargo, es



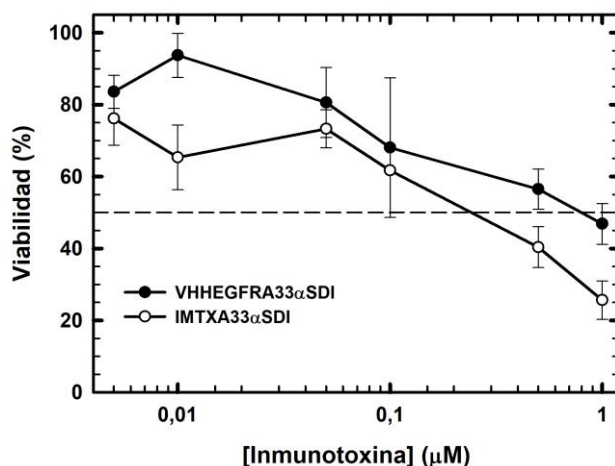
**Figura B.32. Ensayo de viabilidad clásico por MTT de Biesp- $\alpha$ SDI (negro) y VHHEGFR $\alpha$ S (blanco) sobre células A431 (EGFR+) a las 72 horas.** La línea discontinua horizontal indica el 50% de viabilidad celular.

## Resultados Bloque B

sensiblemente superior a la  $IC_{50}$  observada para VHHEGFR $\alpha$ S (0,3  $\mu$ M). Este resultado, no sería coherente con los resultados previos obtenidos en cuanto a la capacidad de unión y reconocimiento del antígeno en las células diana, lo que podría sugerir una menor eficacia de internación de la construcción en este tipo celular.

Por otro lado, y en cuanto a la eficacia citotóxica frente a las células SW1222 (GPA33+), los resultados obtenidos en las mismas condiciones de ensayo que las descritas anteriormente, confirmaron la citotoxicidad específica de Biesp- $\alpha$ SDI (**Figura B.33**), con un valor de  $IC_{50}$  a las 72 horas de 0,7  $\mu$ M, superior al observado con IMTXA33 $\alpha$ SDI (0,2  $\mu$ M).

Por tanto, si bien queda demostrada la eficacia citotóxica de la nueva inmunotoxina biespecífica, sobre las dos líneas celulares diana, en ambos casos la eficacia citotóxica es menor que la obtenida con las correspondientes inmunotoxinas conteniendo únicamente uno de los dos dominios marcadores incorporados en la construcción biespecífica. Estas diferencias podrían estar relacionadas con un efecto sobre la capacidad de internación y eficacia en el procesamiento intracelular de la inmunotoxina biespecífica.



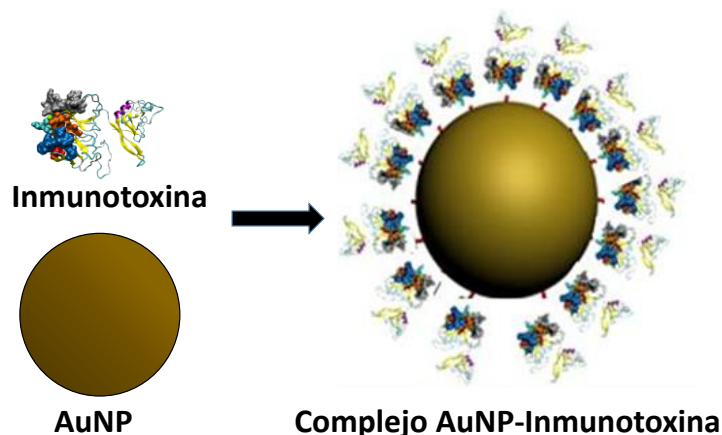
**Figura B.33. Ensayo de viabilidad por MTT de Biesp- $\alpha$ SDI (negro) e IMTXA33 $\alpha$ SDI (blanco) sobre las células SW1222 (GPA33+) a las 72 horas. La línea discontinua horizontal indica el 50% de viabilidad celular.**

## Bloque C

## Vehiculización de inmunotoxinas mediante nanopartículas de oro.

En este apartado, se muestran los resultados relativos a la obtención y caracterización de complejos nanopartícula-inmunotoxina. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de nanoestrellas de oro (AuNS) funcionalizadas gracias a la incorporación de un grupo ANTA $\text{Co}^{\text{II}}$ , lo cual le permite interactuar con proteínas que contengan en su estructura un tag de histidinas. Posteriormente se utilizaron el dominio marcador scFvA33 y la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S, descritas previamente (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012; Tomé-Amat *et al.*, 2015a), conteniendo ambas un tag de histidinas en su extremo C-terminal para llevar a cabo su unión a las AuNS, formando los complejos AuNS-proteína (**Figura C.1**). De este modo, el dominio marcador de la inmunotoxina dirigirá específicamente la nanopartícula a las células tumorales GPA33+, donde se producirá la muerte celular por el efecto tóxico de la  $\alpha$ -sarcina, combinado con el efecto térmico, asociado a la nanopartícula, tras la irradiación con luz del infrarrojo cercano (NIR).

Finalmente, se incluyen asimismo los resultados preliminares de la caracterización de los complejos AuNS-proteína, el estudio del mantenimiento de la función biológica de la inmunotoxina, así como una aproximación preliminar al potencial antitumoral de este complejo AuNS-proteína.

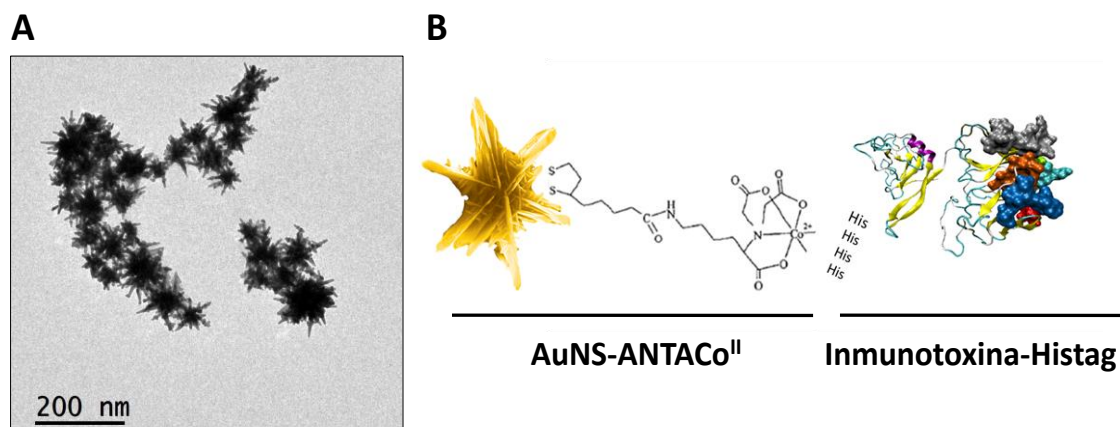


**Figura C.1. Esquema de formación del complejo AuNP-Inmunotoxina**, mediante la unión del tag de histidinas de las proteínas (inmunotoxina o sólo dominio marcador) al complejo ANTA- $\text{Co}^{\text{II}}$  de las nanopartículas de oro.

## Resultados Bloque C

### 1. Síntesis de AuNS.

Se llevó a cabo la síntesis de las AuNS en colaboración con el grupo del Dr. Andrés Guerrero del Departamento de Química Física de la Universidad Complutense de Madrid. De entre la diversidad de formas que pueden obtenerse en la síntesis de nanopartículas de oro, se seleccionaron las nanoestrellas, debido a su menor citotoxicidad, mayor internación celular y mayor eficacia en la generación de calor al ser irradiadas con radiación infrarroja (Pakravan *et al.*, 2021). La síntesis se llevó a cabo tal y como aparece descrito en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos (Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro). Tras su síntesis, las AuNS se estabilizaron mediante la adición de polietilenglicol (PEG) y se funcionalizaron mediante la adición del grupo ANTACo<sup>II</sup>, para la posterior unión de las proteínas de interés (**Figura C.2**).



**Figura C.2.** A) Imagen obtenida mediante TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) de las nanoestrellas de oro obtenidas. B) Esquema de la naturaleza química de la unión entre el cobalto de las AuNS con el tag de histidinas de la inmunotoxina IMTXA33αS.

### 2. Formación del complejo AuNS-Proteína.

Tras la síntesis de las AuNS, se llevaron a cabo distintos experimentos para seleccionar las condiciones óptimas de unión a las proteínas. En primer lugar, se estudió la unión de las AuNS con el dominio marcador scFvA33 (complejo AuNS-scFvA33), y tras la selección de las condiciones óptimas, se evaluó la unión con IMTXA33αS (complejo AuNS-IMTXA33αS).

Para ello, se siguió la metodología descrita en el apartado de Materiales y Métodos (Caracterización de la unión AuNS-proteína). Brevemente, se incubaron las AuNS con las proteínas en distintas condiciones, variando la ratio AuNS: proteína y a distintos tiempos.

## Resultados Bloque C

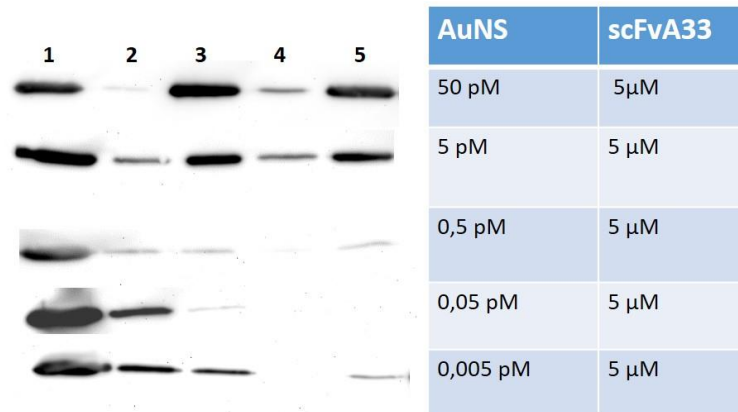
Posteriormente, se centrifugaron las muestras, separándose el sobrenadante tras la unión. El sedimento, que debería incluir los complejos AuNS-proteína se resuspendió en tampón fosfato sódico, y se realizó una nueva centrifugación para eliminar posibles uniones inespecíficas. Finalmente, el sedimento se sometió a distintas condiciones para favorecer la liberación del componente proteico de la AuNS, y evaluar la presencia del contenido proteico mediante análisis electroforético.

Así, y siguiendo el esquema indicado, inicialmente se estudiaron distintas *ratios* AuNS:proteína para determinar en cuál se daba una mayor unión. Los resultados (Figura C.3) mostraron que tras la incubación la presencia del complejo "AuNS-scFvA33 aumentó significativamente para

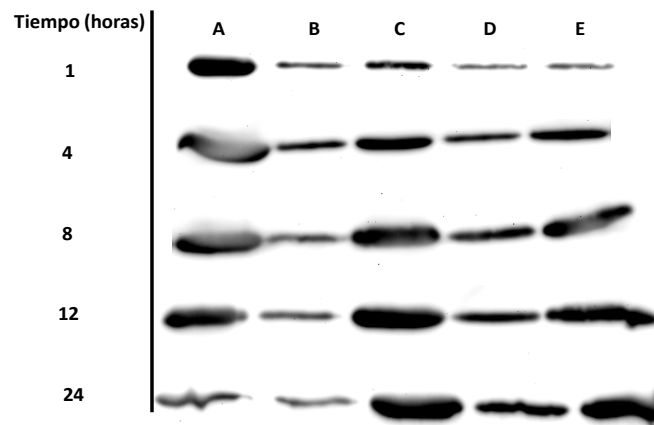
una *ratio* entre  $1:10^6$  y  $1:10^5$ , de acuerdo con la intensidad de la banda observada en el sedimento inicial (Carril C3.3). Además, la adición de EDTA 6 mM, como agente quelante de cationes divalentes, permitió la liberación del scFvA33 unido a AuNS de forma más efectiva para la *ratio* de  $1:10^6$  (Carril C3.4).

A la vista de estos resultados se mantuvo esta *ratio* AuNS:scFvA33 y se estudió el efecto del tiempo de incubación inicial sobre la unión de scFvA33 a AuNS, cuyos resultados se muestran en la Figura C.4.

Como se observa en la figura, a medida que se incrementó el tiempo de incubación, se detectó una mayor intensidad de la



**Figura C.3. Análisis mediante Western Blot de las distintas fracciones del proceso de caracterización del complejo AuNS-scFvA33 a distintas *ratios* de concentración AuNS:scFvA33.** Las fracciones representan: 1. Sobrenadante tras la unión; 2. Lavado inespecífico; 3. AuNS-scFvA33 unida; 4. Sobrenadante tras la liberación; 5. Pellet tras la liberación. Se utilizó un anticuerpo anti-HistagHRP, y se reveló mediante ECL.

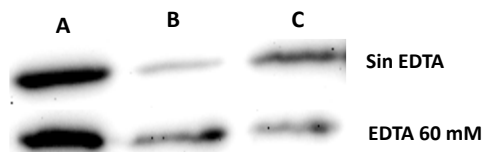


**Figura C.4. Análisis mediante Western Blot de las distintas fracciones del proceso de caracterización del complejo AuNS-proteína a distintos tiempos de incubación entre AuNS (5pM) y scFvA33 (5μM).** Las fracciones representan: A. Sobrenadante tras la unión; B. Lavado inespecífico; C. AuNS-proteína unida; D. Sobrenadante tras la liberación; E. Pellet tras la liberación. Se utilizó un anticuerpo anti-HistagHRP, y se reveló mediante ECL.

## Resultados Bloque C

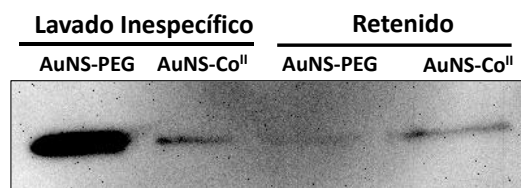
banda correspondiente a scFvA33 en la fracción "AuNS-scFvA33 unida", indicándose que se da una mayor unión. Debido a que la intensidad de la banda a las 24 horas fue prácticamente la misma que a las 12 horas, se fijó en 12 horas el tiempo de incubación entre AuNS y scFvA33. Así, se determinaron las condiciones de unión en una ratio AuNS-proteína de 1 pM-1  $\mu$ M (1:10<sup>6</sup>) y un tiempo de incubación entre ambos componentes de 12 horas.

Posteriormente, se analizó la capacidad de liberación de scFvA33, una vez que la proteína ya estaba unida a AuNS mediante la adición de EDTA, que competiría en la unión con los grupos cobalto de AuNS, provocando la liberación de scFvA33. Como se observa en la **Figura C.5** la adición de EDTA sobre el complejo AuNS-scFvA33 provocó la liberación de scFvA33, aumentando la detección de este tras la centrifugación (Carril C.5.B), mientras que en ausencia de EDTA, scFvA33 se localizó principalmente en el sedimento tras la centrifugación, permaneciendo unido a AuNS (Carril C5.C).



**Figura C.5.** Análisis mediante *Western Blot* de las distintas fracciones del proceso de caracterización del complejo AuNS-proteína. Las fracciones representan: A. AuNS-proteína antes de liberación; B. Sobrenadante tras la liberación; C. Pellet tras la liberación. Se utilizó un anticuerpo anti-HistagHRP, y se reveló mediante ECL.

Con el fin de confirmar que la unión de scFvA33 a AuNS era debida a la interacción del tag de histidinas de scFvA33<sub>Histag</sub> con el Cobalto de AuNS-ANTACo<sup>II</sup>, y no se trataba de una unión inespecífica, se sintetizaron AuNS sin funcionalizar con ANTACo<sup>II</sup>, solamente recubiertas de PEG con el fin de estabilizarlas (AuNS-PEG). Así, se analizó la capacidad de unión de scFvA33 a AuNS-ANTACo<sup>II</sup> o AuNS-PEG. Los resultados mostraron (**Figura C.6**) que AuNSPEG no tiene capacidad de unir scFvA33, encontrándose la mayor parte del dominio marcador en el sobrenadante del lavado inespecífico, y estando prácticamente ausente en el pellet retenido. Por el contrario, AuNS-ANTACo<sup>II</sup> sí unió de forma específica scFvA33, siendo significativamente menor la cantidad de proteína liberada en el lavado.

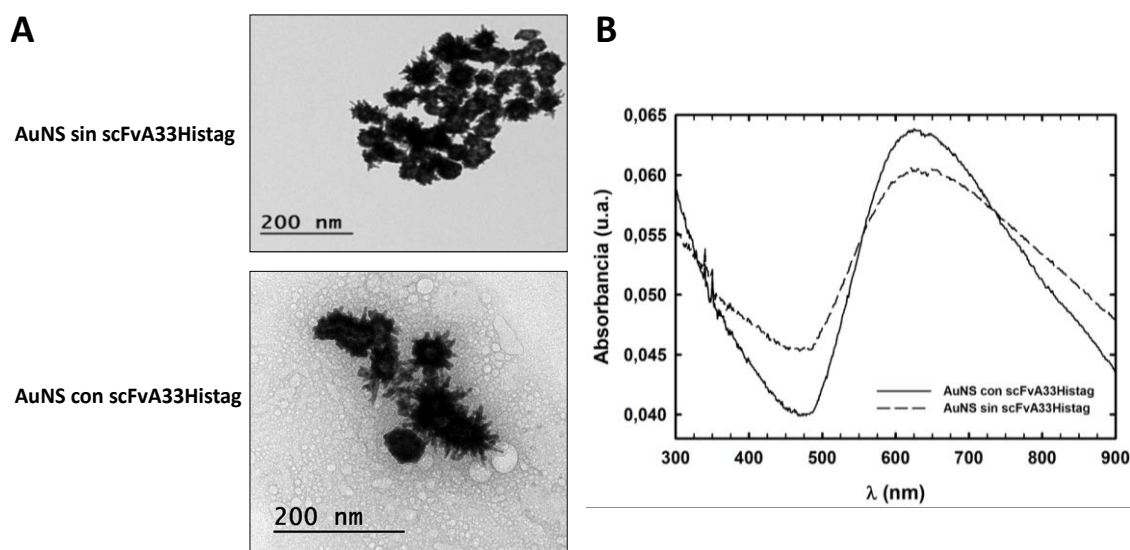


**Figura C.6.** Análisis mediante *Western Blot* de las fracciones del lavado inespecífico y de AuNS-Proteína retenida según se utilicen AuNSANTACo<sup>II</sup> o AuNSPEG. Se utilizó un anticuerpo anti-HistagHRP y se reveló mediante ECL.

Por otro lado, se quiso estudiar si la unión de scFvA33 provocaba algún cambio morfológico en la estructura de las AuNS. Para ello, se llevó a cabo observación directa por TEM y se

## Resultados Bloque C

registraron los espectros de absorción entre 300 nm-900 nm de las AuNS en ausencia y presencia de scFvA33. Los resultados, recogidos en la **Figura C.7** mostraron que la morfología de las AuNS era idéntica, independientemente de la unión de scFvA33, con un diámetro medio de 55 nm, y espículas de 15 nm de longitud media, sin que además se apreciase una mayor agregación de nanopartículas en el caso de presentar scFvA33 adsorbidas en su superficie. El espectro de absorción tampoco sufrió cambios sustanciales, presentando un máximo de absorción a los 650 nm tanto si existía unión o no de scFvA33, siendo este pico en torno a 655 nm característico de la absorbancia de las nanoestrellas (Xie *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020). El incremento de absorbancia se correspondió con la resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR), extendiéndose a lo largo de la región infrarroja (700-900 nm), lo cual es necesario para el efecto fototérmico y la generación de calor, al irradiar con luz infrarroja.



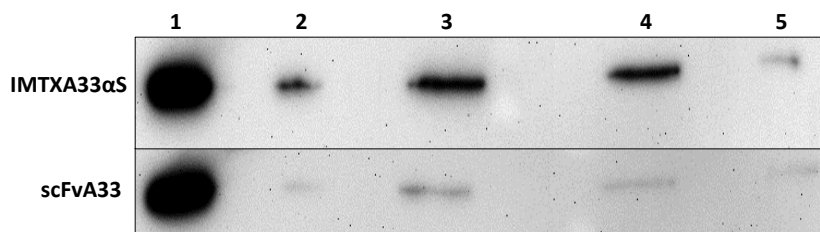
**Figura C.7.** A) Imágenes obtenidas mediante TEM de las AuNS (2,5 pM) en ausencia de scFvA33 (superior) o con el dominio marcador unido (2,5 pM-2,5  $\mu$ M) (inferior). B) Espectro de absorción obtenido de AuNS (2,5 pM) con (línea continua) o sin (línea discontinua) dominio marcador scFvA33 unido.

Una vez caracterizada la unión de scFvA33 a la superficie de las AuNS, se trasladaron las condiciones de unión y liberación (condiciones de ratio de concentración y tiempo de unión) al estudio de la unión de IMTXA33 $\alpha$ S a la superficie de AuNS. IMTXA33 $\alpha$ S comparte el mismo dominio marcador que scFvA33, y tiene como dominio tóxico la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, incluyendo en su extremo C-terminal el *tag* de histidinas.

Como se observa en la **Figura C.8**, los resultados del ensayo de unión y liberación de IMTXA33 $\alpha$ S en las mismas condiciones de ratio AuNS:proteína y tiempo de unión, mostraron un comportamiento idéntico, confirmándose la formación del complejo AuNS-

## Resultados Bloque C

IMTXA33 $\alpha$ S y la posterior liberación de la inmunotoxina por adición de EDTA (**Figura C.8**). Sin embargo, se observó una mayor capacidad de unión, y consecuentemente mayor cantidad de IMTXA33 $\alpha$ S tras la liberación de acuerdo con la intensidad de las bandas detectadas tras el análisis electroforético e inmunodetección, respecto a lo observado con scFvA33.



**Figura C.8. Análisis mediante *Western Blot* de las distintas fracciones del proceso de caracterización del complejo AuNS-proteína** según se una IMTXA33 $\alpha$ S 5  $\mu$ M (arriba) o scFvA33 5  $\mu$ M (abajo) a AuNS (5 pM). Las fracciones representan: 1. Sobrenadante tras la unión; 2. Lavado inespecífico; 3. AuNS-proteína unida; 4. Sobrenadante tras la liberación; 5. Pellet tras la liberación. Se utilizó un anticuerpo anti-HistagHRP, y se reveló mediante ECL.

### 3. Caracterización del complejo AuNS-proteína.

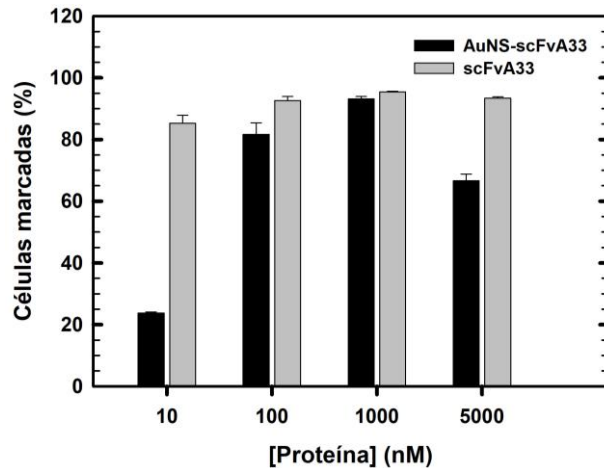
Cuando las proteínas quedan adsorbidas en la superficie de las nanopartículas de oro, tienden a formar coronas proteicas, dotando a las nanopartículas de una nueva identidad (Mahmoudi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). No obstante, en ocasiones, las proteínas que constituyen la corona proteica pueden sufrir cambios estructurales, perdiendo su funcionalidad y dando lugar a la agregación de nanopartículas. Estos cambios estructurales en las proteínas parecen ser mayores cuanto más irregular sea la forma de las nanopartículas a las que están adsorbidas (Wang *et al.*, 2020).

Por ello, una vez obtenido el complejo AuNS-proteína, se procedió a caracterizar la correcta funcionalidad de las proteínas, en primer lugar, del dominio marcador scFvA33, y posteriormente de la inmunotoxina completa IMTXA33 $\alpha$ S. En todos casos, las concentraciones indicadas se refieren a su concentración durante la incubación para formar el complejo AuNS-proteína.

Así, para comprobar la correcta funcionalidad del complejo AuNS-scFvA33, se llevó a cabo un ensayo de unión mediante citometría de flujo tras incubación de AuNS-scFvA33 con células SW1222 (GPA33+) (Ver apartado Materiales y Métodos).

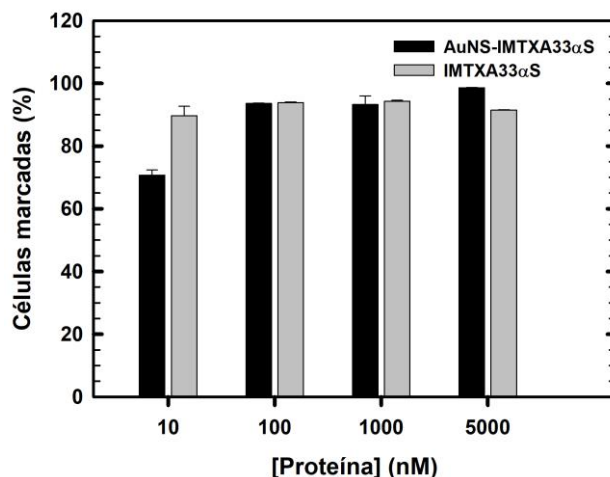
## Resultados Bloque C

Los resultados mostraron (Figura C.9) que scFvA33 mantenía la capacidad de unión específica a células GPA33+ cuando se encontraba formando parte del complejo AuNS-proteína. La unión a las células aumentó en función de la concentración del complejo AuNS-scFvA33 hasta una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , si bien a partir de 5  $\mu\text{M}$  se produjo una disminución de la unión. Por otro lado, en todos los casos, la capacidad de unión del complejo AuNS-scFvA33 fue menor que el control utilizando scFvA33 libre, en el que no hay ningún tipo de impedimento en la unión al antígeno GPA33.



**Figura C.9. Ensayo de unión mediante citometría de flujo de AuNS-scFvA33 sobre células SW1222.** Representación del % de células SW1222 marcadas en la citometría de flujo por scFvA33 libre (gris) o por el complejo AuNS-scFvA33 (1:10<sup>6</sup>) (negro) a distintas concentraciones.

Posteriormente, se procedió a analizar el mantenimiento de la funcionalidad de IMTXA33 $\alpha$ S, cuando se encontraba unida a las AuNS formando el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos habituales para la caracterización de cada uno de sus dominios, tal y como se han descrito previamente en los apartados anteriores.



**Figura C.10. Ensayo de unión mediante citometría de flujo de AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S sobre células SW1222.** Representación del % de células SW1222 marcadas por IMTXA33 $\alpha$ S libre (gris) o por el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S (1:10<sup>6</sup>) (negro).

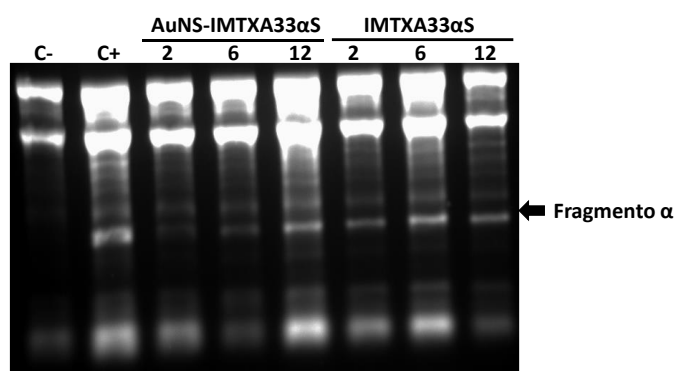
La capacidad de unión de AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S a células SW1222 (GPA33+) se mantuvo, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo (Figura C.10). Así, el porcentaje de células marcadas al utilizar IMTXA33 $\alpha$ S como control, fue superior al 90% para todas las concentraciones ensayadas. En el caso del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, este alcanzó el 70 % a una concentración de 10 nM de inmunotoxina, aumentando y obteniéndose el mismo porcentaje de

## Resultados Bloque C

células marcadas, y por tanto de unión, que en el caso de IMTXA33 $\alpha$ S libre, al ensayar concentraciones superiores.

Comparando la capacidad de unión de AuNS-scFvA33 (**Figura C.9**) y de AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S (**Figura C.10**), se observó que el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S presentaba una mayor capacidad de reconocimiento y unión, uniéndose a una mayor cantidad de células GPA33 positivas en todas las concentraciones analizadas, así como mostrando datos de unión más similares a los obtenidos con la proteína libre.

Una vez evaluada la capacidad de unión del dominio marcador del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, se evaluó la actividad ribonucleolítica específica de la  $\alpha$ -sarcina, mediante el ensayo de reticulocitos, modificándose ligeramente el ensayo (Ver apartado Materiales y Métodos: Caracterización de la actividad ribonucleolítica), debido a la presencia de EDTA en el tampón A, que produciría la liberación de IMTXA33 $\alpha$ S de AuNS, y por tanto distorsionaría la interpretación de los resultados sobre la actividad de la  $\alpha$ -sarcina incluida en el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S intacto.



**Figura C.11. Ensayo de actividad ribonucleolítica específica frente a ribosomas del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S.** Se indican: C-, tampón C+,  $\alpha$ -sarcina 2 pmoles; AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S: 2, 6 y 12 pmoles de proteína; IMTXA33 $\alpha$ S: 2, 6 y 12 pmoles. La flecha indica la posición del fragmento  $\alpha$ .

Como se observa (**Figura C.11**), el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S mostró la actividad ribonucleolítica característica de la  $\alpha$ -sarcina, detectándose la liberación del fragmento  $\alpha$ , si bien esta actividad es menor en el complejo en comparación con la de IMTXA33 $\alpha$ S libre, como pone de manifiesto la menor intensidad de la banda correspondiente al fragmento  $\alpha$ .

#### 4. Caracterización de la internación del complejo AuNS-Proteína.

Tras comprobar que tanto el dominio marcador scFvA33, como la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S mantenían su funcionalidad unidas a la superficie de las AuNS, se procedió a estudiar la internación del complejo AuNS-proteína en las células diana ensayadas. Para ello, en primer lugar, se analizó mediante microscopía de fluorescencia la internación del dominio marcador scFvA33, y su variación al estar unido a AuNS. Posteriormente, se analizó mediante TEM si la presencia del dominio marcador scFvA33, o de la inmunotoxina

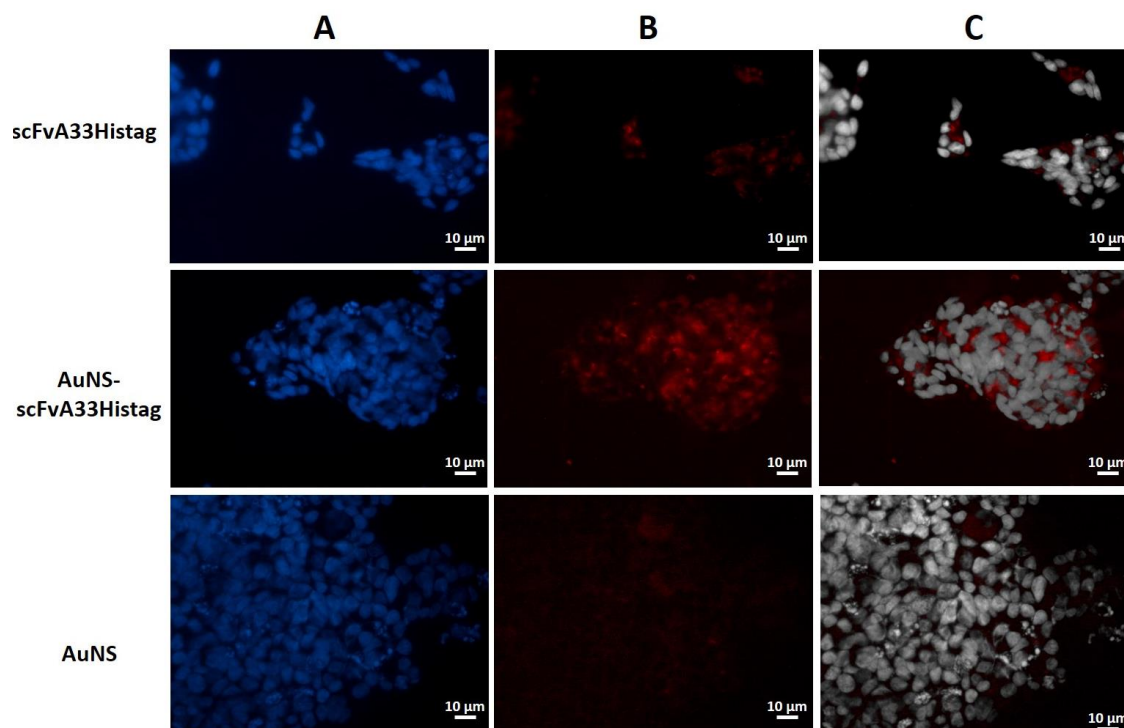
## Resultados Bloque C

IMTXA33 $\alpha$ S provocaban un aumento de la endocitosis e internación de las AuNS por parte de las células.

En primer lugar, se analizó mediante microscopía de fluorescencia la internación en las células SW1222 de scFvA33 libre o unido a las AuNS. Para ello, se llevó a cabo el marcaje de scFvA33 (ver apartado Materiales y Métodos Métodos: Microscopía de fluorescencia) con el fluoróforo Alexa555, obteniéndose una DOL de 0,385 y una concentración final de scFvA33Alexa555 de 16  $\mu$ M.

Posteriormente, las células SW1222 (GPA33+) se incubaron con scFvA33Alexa555 libre (1 $\mu$ M), con el complejo AuNS-scFvA33Alexa555 (1pM:1 $\mu$ M) o con AuNS (1pM), de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos (Microscopía de fluorescencia).

Se observó (**Figura C.12**) la presencia de scFvA33 en el interior de las células SW1222 (detectable en color rojo por Alexa555), tanto en el tratamiento con scFvA33Alexa555 libre como con AuNS-scFvA33, por lo que la unión del dominio marcador a las nanoestrellas de oro no dificulta la internación de este. De hecho, se observó una mayor intensidad de fluorescencia correspondiente a scFvA33Alexa555, en el caso de AuNS-scFvA33Alexa555, sugiriendo que las AuNS podrían actuar como plataformas de vehiculización permitiendo la unión de compuestos terapéuticos, y facilitando su suministro e internación celular.

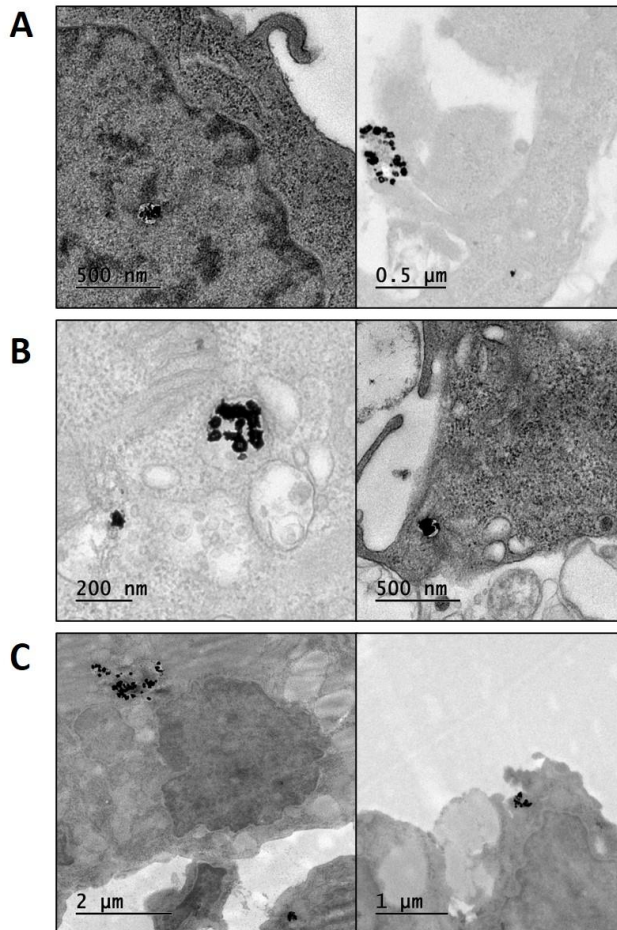


**Figura C.12.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células SW1222 incubadas con scFvA33Alexa 555 1  $\mu$ M (fila superior), AuNS-scFvA33Alexa555 1pM:1 $\mu$ M (fila del medio) y AuNS 1 pM (fila inferior). Se observa en A) los núcleos en azul, en B) Alexa555 en rojo y en c) las imágenes correspondientes a la mezcla de canales (los núcleos en azul pasan a ser grises).

## Resultados Bloque C

Tras comprobar que el dominio marcador no solo mantenía la capacidad de internación formando parte del complejo AuNS-proteína, sino que este complejo permitiría una mayor internación de moléculas, se analizó la internación de las AuNS en el interior de las células SW1222 mediante TEM, con el fin de determinar si los dominios marcadores (scFvA33Histag, o el dominio marcador de IMTXA33 $\alpha$ S) eran capaces de dirigir específicamente a las AuNS hacia el antígeno tumoral GPA33, dando como resultado una mayor endocitosis e internación de estos complejos AuNS-proteínas, acumulándose las AuNS en el citoplasma celular. Para ello, se incubaron AuNS solas (0,5pM), AuNS-scFvA33 (0,5pM:0,5 $\mu$ M) y AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S (0,5pM:0,5 $\mu$ M) con las células tumorales SW1222, y se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Microscopía Electrónica de Transmisión).

En la figura (**Figura C.13**) se muestran los resultados de la caracterización de la internación mediante TEM. Las nanoestrellas de oro aparecen densas a los electrones, de color negro, agrupadas en el interior de endosomas, posiblemente debido a la endocitosis de las células en las 3 condiciones de incubación. Debido a las condiciones del protocolo, resultó imposible delinear los bordes de las membranas celulares, por lo que la cuantificación de las AuNS internadas por célula en cada una de las condiciones no resulta concluyente. En cualquier caso, no se apreció una diferencia significativa en el número de AuNS internadas causada por la unión en su superficie del dominio marcador scFvA33, o de la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S, indicando que las AuNS tendrían por sí solas una elevada tasa de fagocitosis e internación (Pakravan *et al.*, 2021).



**Figura C.13. Caracterización mediante TEM de células SW1222 a distintas magnificaciones incubadas con AuNS 0,5 pM (A); AuNS-scFvA33Histag 0,5pM-0,5 $\mu$ M (B) y AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S 0,5pM-0,5 $\mu$ M (C). Se indican las barras de tamaño en cada micrografía.**

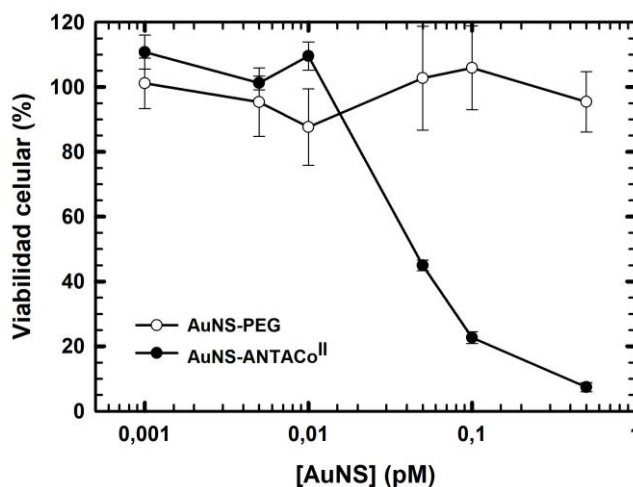
### 5. Potencial antitumoral del complejo AuNS-Proteína.

Entre las principales aplicaciones biotecnológicas de las nanopartículas de oro, se encuentran su capacidad de vehiculización de distintos agentes y drogas terapéuticas en su superficie, facilitando la administración y la liberación en el tejido de destino (Yang *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2014) y el efecto fototérmico al ser irradiadas con luz infrarroja (Kennedy *et al.*, 2011).

En nuestro caso, buscamos un doble efecto: 1) La unión de IMTXA33 $\alpha$ S a las AuNS, formando el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, constituiría una plataforma de vehiculización de la ribotoxina fúngica  $\alpha$ -sarcina específicamente dirigido a las células tumorales, ocasionando con ello un aumento de su potencial citotóxico. 2) Determinar si la unión del dominio marcador scFvA33 a las AuNS las dirige específicamente a las células SW1222, ocasionando con ello un aumento de eficacia fototérmica, que llevaría a cabo una acción sinérgica con la toxicidad de la  $\alpha$ -sarcina.

Así, se estudió en primer lugar el potencial citotóxico de las AuNSAntaCo<sup>II</sup> sobre células SW1222 (GPA33+), mediante un ensayo clásico de viabilidad por MTT a las 72 horas, de manera análoga a los ensayos realizados para la caracterización de inmunotoxinas.

En la **Figura C14** se muestra el ensayo de viabilidad celular por MTT sobre células SW1222, al añadir AuNS recubiertas con PEG, y posteriormente funcionalizadas o no con el complejo ANTACo<sup>II</sup>. Se observó que AuNS recubiertas con PEG no resultaron citotóxicas para las células, permaneciendo la viabilidad por encima del 80% para todas las concentraciones



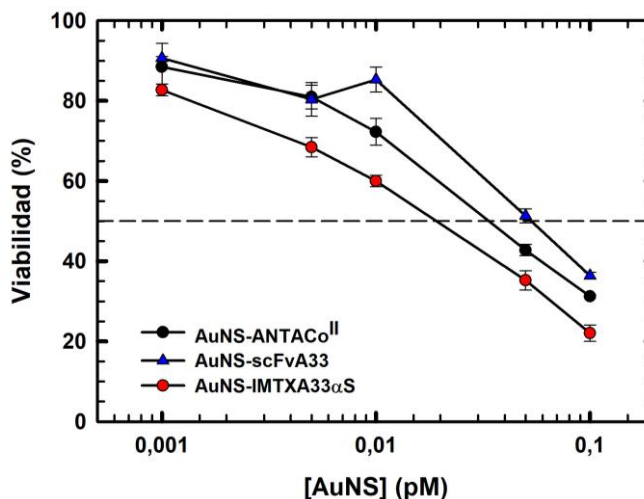
**Figura C.14.** Ensayo de viabilidad celular por MTT a las 72 horas sobre células SW1222, utilizando AuNS recubiertas solo por PEG (círculos blancos) y AuNS funcionalizadas con el complejo ANTACo<sup>II</sup> (círculos negros).

ensayadas. Por el contrario, cuando se ensayaron las mismas AuNS recubiertas con PEG pero funcionalizadas con ANTACo<sup>II</sup> resultaron citotóxicas para las células, con viabilidades inferiores al 50% incluso a concentraciones tan bajas como 0,05 pM. Este descenso brusco de la viabilidad se explicaría por la toxicidad de los grupos cobalto constituyentes del complejo ANTACo<sup>II</sup>, y necesarios para la unión de proteínas a través del *tag* de histidinas (Koga *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2021).

## Resultados Bloque C

Por tanto, fue necesario modificar las condiciones del ensayo, disminuyendo el tiempo de incubación a 48 horas, con el fin de encontrar la ventana farmacológica adecuada, en la cual el efecto de AuNSANTACo<sup>II</sup> no fuese tóxico *per se*, pero en la cual sí se observase el efecto citotóxico del dominio tóxico de IMTXA33 $\alpha$ S, cuando ésta se encuentra formando el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S.

Así, los resultados del ensayo de viabilidad por MTT de SW1222 con 48 horas de incubación con AuNS-scFvA33 o AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S (Figura C.15) mostraron que AuNS continuaba siendo citotóxico, si bien esta citotoxicidad era menor que a las 72 horas, con una IC<sub>50</sub> de 0,04 pM. El complejo AuNS-scFvA33 presentó una menor citotoxicidad, con una IC<sub>50</sub> de 0,07 pM. Esta ligera disminución de la citotoxicidad podría ser debido a que la unión del *tag* de histidinas



**Figura C.15. Ensayo de viabilidad celular por MTT a las 48 horas sobre células SW1222**, utilizando AuNS (círculo negro), AuNS-scFvA33 1:10<sup>6</sup> (triángulos azules) y AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S 1:10<sup>6</sup> (círculos rojos). La línea discontinua horizontal representa el 50% de viabilidad.

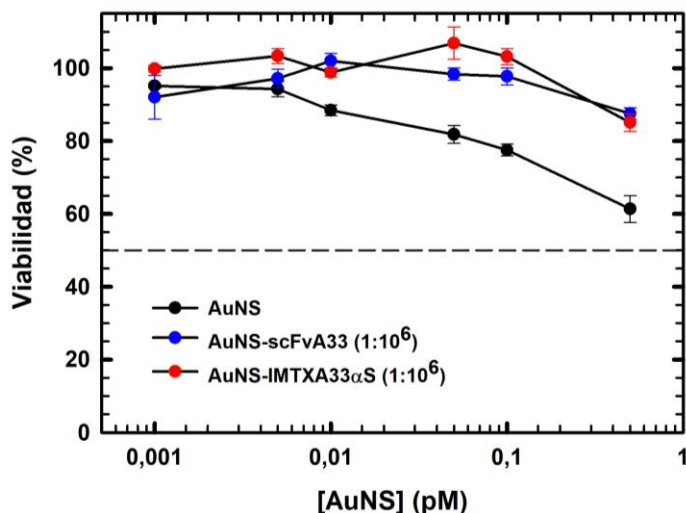
del dominio marcador unido al cobalto de las nanoestrellas, disminuye la cantidad de cobalto libre, potencialmente tóxico, dispuesto en la superficie de las AuNS. El complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S presenta una mayor citotoxicidad, tanto respecto a las AuNS solas, como unidas al dominio marcador, debido a la internalización del complejo, y a la acción tóxica de la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, con una IC<sub>50</sub> de 0,02 pM.

Con el fin de cerciorarse que la toxicidad de la  $\alpha$ -sarcina ejercida por el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S estaba determinada por la especificidad del dominio marcador scFvA33, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad por MTT sobre células HeLa (GPA33-) a las 48 horas.

En la **Figura C.16**, se observa que las células HeLa fueron menos sensibles a la citotoxicidad ejercida por el cobalto de las nanoestrellas que las células SW1222, pues, aunque la viabilidad celular disminuye con la concentración de AuNS, la viabilidad es superior al 50% para todas las concentraciones.

Tanto el complejo AuNS-scFvA33 como el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S presentan viabilidades del 100% para todas las concentraciones. Ello indica que el tag de histidinas tanto del scFvA33 como de IMTXA33 $\alpha$ S, al estar unido al cobalto de AuNS disminuye la

## Resultados Bloque C



**Figura C.16. Ensayo de viabilidad celular por MTT a las 48 horas sobre células HeLa**, utilizando AuNS (círculo negro), AuNS-scFvA33 1:10<sup>6</sup> (círculos azules) y AuNS-IMTXA33αS 1:10<sup>6</sup> (círculos rojos). La línea discontinua horizontal representa el 50% de viabilidad.

citotoxicidad de este. Por otra parte, al carecer las células HeLa del GPA33, ni el dominio marcador scFvA33 ni la inmunotoxina IMTXA33αS dirigirían el complejo AuNS-IMTXA33αS hacia las células, por lo que no se aprecia el efecto tóxico de la α-sarcina, ni la toxicidad inespecífica del cobalto.

Una de las principales características de las nanopartículas de oro, (o nanoestrellas en este caso) es

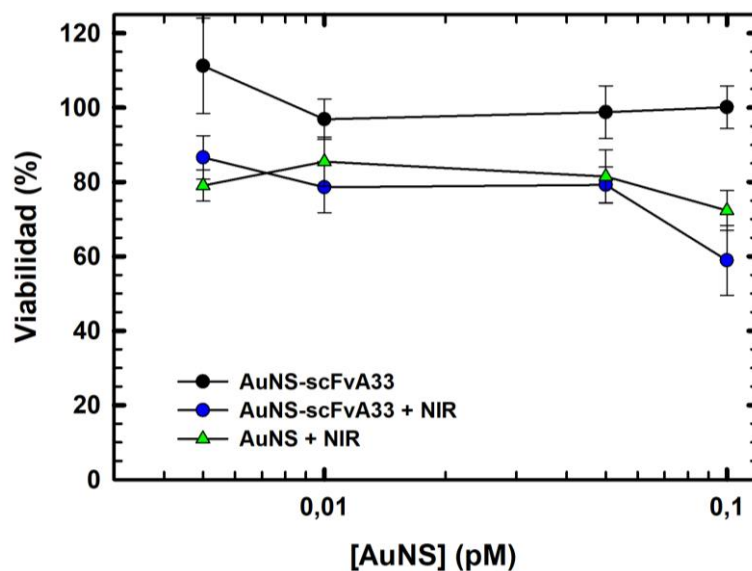
el efecto fototérmico o capacidad que presentan de transformar energía lumínica infrarroja en energía calorífica, aumentando la temperatura del ambiente circundante y provocando la muerte de las células tumorales. (Liu *et al.*, 2019).

Por ello, se llevó a cabo un experimento de viabilidad tras irradiación infrarroja, con el fin de determinar, en primer lugar, si el calor producido por las AuNS al ser irradiadas provocaba muerte celular en las células SW1222, y en segundo lugar si esta muerte celular causada por el efecto fototérmico se veía aumentada para el caso del complejo AuNS-scFvA33, al dirigir el dominio marcador el complejo al interior de las células, siendo posteriormente irradiadas con luz infrarroja. El láser utilizado fue un láser de haz continuo a 808 nm (López de Pablo *et al.*, 2014), con lo que la longitud de onda emitida solaparía con el pico de absorbancia de las AuNS sintetizadas, siendo esta una condición necesaria para la transducción fototérmica. La utilización de un láser de haz continuo en vez de un láser de pulsos en nano o femto segundos radica en que esta última irradiación causa necrosis, mientras que la muerte celular con haz continuo es por apoptosis (Huang *et al.*, 2010).

Así, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Potencial citotóxico del complejo AuNS-scFvA33 con efecto fototérmico) se sembraron las células SW1222, a razón de 10.000 células/well, y se incubaron con AuNS y con AuNS-scFvA33 a distintas concentraciones. Pasadas 24 horas, se irradiaron los pocillos con el láser de haz continuo a 808 nm durante 2 minutos, y se midió la viabilidad celular mediante MTT.

## Resultados Bloque C

En la **Figura C.17** se muestra el resultado de la viabilidad de las células SW1222 a las 24 horas. La incubación con el complejo AuNS-scFvA33 no resultó citotóxico a las 24 horas, permaneciendo la viabilidad en torno al 100% para todas las concentraciones, debido como ya se ha indicado a que el cobalto está unido al tag de histidinas de scFvA33, en vez de permaneciendo libre y potencialmente tóxico. No obstante, cuando tras la incubación con AuNS-scFvA33 se irradiaron los pocillos con luz infrarroja, la viabilidad disminuyó hasta el 80%, alcanzándose el 60% a los 0,1 pM, indicando efectivamente que se estaba dando muerte celular por el efecto fototérmico. Esta muerte celular térmica es prácticamente idéntica a la provocada cuando las células son incubadas con AuNS, sin dominio marcador, y posterior irradiadas con luz infrarroja, reduciéndose la viabilidad al 80%. No obstante, a partir de 0,1 pM de AuNS, comienza a darse una mayor muerte térmica con AuNS-scFvA33 (60% viabilidad) respecto a AuNS (80%) que sí podría ser debida a la dirección específica de las AuNS hacia las células tumorales, llevada a cabo por el dominio marcador.



**Figura C.17.** Ensayo de viabilidad celular por MTT de células SW1222 tras ser incubadas con AuNS-scFvA33 sin irradiación (círculos negros); o con AuNS (triángulos verdes) o AuNS-scFvA33 (círculos azules) durante 24 horas y posterior irradiación infrarroja a 808 nm.

# DISCUSIÓN

## Discusión

El aumento en la incidencia y la mortalidad del cáncer, y la relación de algunos tipos con la riqueza económica y estilo de vida occidental, como es el caso del cáncer colorrectal, ha llevado a una búsqueda global de tratamientos y nuevas estrategias terapéuticas para hacerle frente. En este sentido, el campo de la inmunoterapia y las inmunotoxinas ha experimentado un notable avance desde el concepto de “bala mágica” propuesto por Paul Ehrlich en 1856, hasta el desarrollo clínico de inmunotoxinas frente a diversos tipos de cáncer. No obstante, la aparición de problemas de inmunogenicidad, de toxicidades inespecíficas, de escasa penetración tumoral en cánceres sólidos, así como una elevada degradación intracelular en los lisosomas, han puesto de manifiesto la necesidad de optimizar los diseños actuales de inmunotoxinas.

Nuestro grupo de investigación lleva más de 30 años dedicados a la investigación de inmunotoxinas basadas en ribonucleasas fúngicas, siendo la  $\alpha$ -sarcina la más utilizada por su elevada eficacia catalítica, su exquisita especificidad y su elevada estabilidad. La presente Tesis Doctoral se ha centrado en investigar el desarrollo de optimizaciones de inmunotoxinas tomando como molde la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S, ya caracterizada *in vitro* e *in vivo* (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012; Tomé-Amat *et al.*, 2015c), construyendo nuevos diseños más eficientes y seguros, así como combinando los ya existentes para constituir potentes herramientas nanobiotecnológicas que permitan una aproximación más completa para erradicar esta enfermedad.

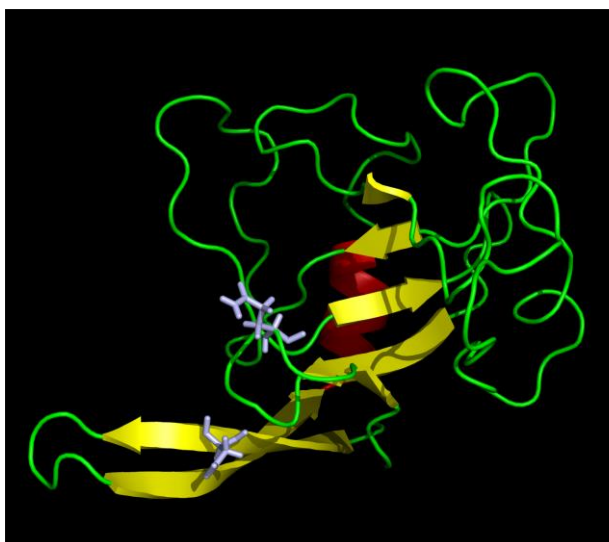
### **D1. Producción y caracterización de toxinas e inmunotoxinas no inmunogénicas.**

Pese al prometedor potencial terapéutico de las inmunotoxinas, el uso de componentes de origen bacteriano o de plantas, incluidos en su dominio tóxico, conlleva la aparición de una serie de efectos adversos, fundamentalmente por su carácter inmunogénico, que implica una disminución de su eficacia terapéutica (Mazor *et al.*, 2018; Mazor & Pastan 2020). Por un lado, la generación de anticuerpos anti-droga (ADAs) y de anticuerpos neutralizantes por parte del sistema inmune del paciente disminuye la concentración de agente terapéutico, obligando a repetidas administraciones a lo largo del tiempo. Además, la circulación repetida y sistémica de estos complejos antígeno-anticuerpo, así como los propios ADAs puede producir efectos adversos en el paciente, como reacciones autoinmunes, reacciones de hipersensibilidad o hepatotoxicidad, entre otros (Appelbaum & Bernstein, 2017). Por ello, una de las principales estrategias desarrolladas actualmente en el diseño de inmunotoxinas va dirigida a la humanización de las inmunotoxinas, tanto en su dominio marcador como tóxico.

## Discusión

Las inmunotoxinas desarrolladas en nuestro grupo de investigación, basadas en el dominio marcador frente al antígeno GPA33 y presentadas en el bloque A de resultados de esta Tesis Doctoral, incluyen un scFvA33 humanizado, por lo que no provocaría una respuesta inmune. En el caso de la  $\alpha$ -sarcina, se ha descrito el carácter poco inmunogénico de las ribotoxinas fúngicas (Rathore & Bathra 1996; Goyal & Bathra, 2000). Sin embargo, parece obvio que considerando una aplicación terapéutica de las inmunotoxinas basadas en ellas, la eliminación completa de su inmunogenicidad es absolutamente necesaria.

Se han identificado 2 epítomos principales de linfocitos T en la ribotoxina fúngica  $\alpha$ -sarcina, el epítomo 1 (aminoácidos 9-18) y el epítomo 2 (aminoácidos 134-142) (Jones *et al.*, 2016). Pese a que son epítomos débiles, pues las ribotoxinas son poco inmunogénicas (Rathore & Bathra 1996; Goyal & Bathra 2000; Lacadena *et al.*, 2007), el doble mutante de la  $\alpha$ -sarcina D9T/Q142T ( $\alpha$ SDI) no provoca activación, ni proliferación de linfocitos T cuando estos son estimulados por aquella, concluyéndose que es una variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina (**Figura D.1**).



**Figura D.1. Representación tridimensional de la  $\alpha$ -sarcina** con los 2 aminoácidos (gris) que se han mutado para eliminar los epítomos de células T. Los distintos componentes de estructura secundaria se representan en diferentes colores: lámina  $\beta$  (amarillo),  $\alpha$ -hélice (rojo) y los loops con estructura aleatoria (verde).

No obstante, y debido a que las mutaciones puntuales pueden alterar la estructura y función de una proteína, se llevó a cabo una caracterización estructural y funcional de  $\alpha$ SDI, con el fin de determinar si mantenía la misma estructura y función que la  $\alpha$ -sarcina “wild type” ( $\alpha$ SWT).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que  $\alpha$ SDI se expresó como una proteína recombinante en cepas de *E. coli* RB791, purificándose a homogeneidad con un rendimiento final de 2 g/L de inducción.

La caracterización estructural mostró que  $\alpha$ SDI estaba correctamente plegada en disolución, con un predominio de estructura secundaria  $\beta$ , y una estabilidad térmica y emisión de fluorescencia idénticos a los de  $\alpha$ SWT, con lo que ningún aspecto estructural se ve modificado por las mutaciones D9T/Q142T (Martínez-del-Pozo *et al.*, 1988; Lacadena, 1997).

La caracterización funcional se basó en la evaluación de la actividad ribonucleolítica de la  $\alpha$ -sarcina frente al RNA ribosomal, y en su capacidad para interactuar con membranas lipídicas. El análisis de la capacidad ribonucleolítica mostró, a partir de los tres ensayos llevados a cabo, que  $\alpha$ SDI presentaba una actividad ribonucleolítica similar o incluso algo superior que  $\alpha$ SWT.

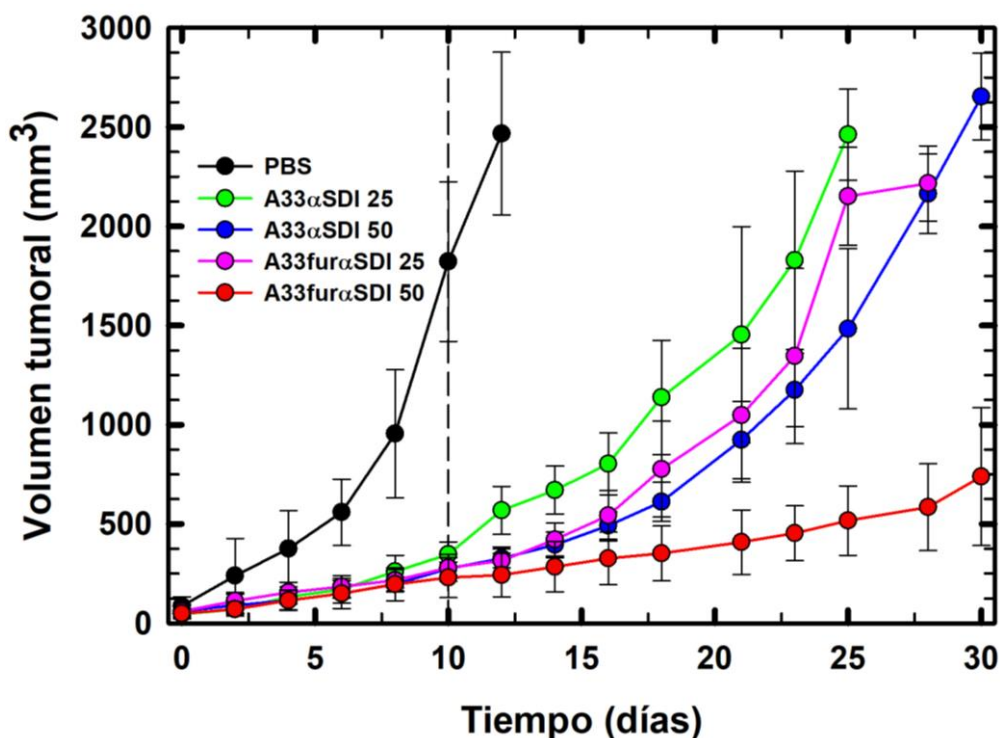
Este aumento de eficacia ribonucleolítica no sería debida, o al menos no exclusivamente, a una mayor interacción de  $\alpha$ SDI con el ribosoma, o con alguno de sus componentes, pues en el ensayo de SRL y en el zimograma, en los que no hay ribosomas, también se observó esta mayor actividad. Es posible que la cercanía de la mutación Q142T, con el residuo His137, perteneciente al centro activo de la  $\alpha$ -sarcina, modifique su actividad enzimática, incrementándola. En concreto, el epítipo 2 se localiza en el *loop* 5 de la  $\alpha$ -sarcina, estando este *loop* en contacto con otras partes de la proteína a través de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces salinos, lo que podría explicar este pequeño aumento de eficacia catalítica (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2016).

Respecto a la interacción con lípidos,  $\alpha$ SDI muestra la misma actividad de interacción con lípidos, y agregación de vesículas que la  $\alpha$ SWT, por lo que ninguna de las mutaciones está implicada en la interacción, ni en la capacidad de atravesar membranas lipídicas, pese a que el epítipo 1 está localizado en la horquilla  $\beta$  terminal, estructura implicada en la interacción con lípidos (García-Ortega *et al.*, 2002)

Debido al mantenimiento de las funciones propias de la  $\alpha$ -sarcina, y a su carácter no inmunogénico,  $\alpha$ SDI resulta óptima como componente del dominio tóxico en el diseño de inmunotoxinas. Así, se ha diseñado la inmunotoxina no inmunogénica, IMTXA33 $\alpha$ SDI, cuyo dominio marcador es un scFv humanizado frente a GPA33, y cuyo dominio tóxico es la  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica ( $\alpha$ SDI). Esta nueva inmunotoxina, IMTXA33 $\alpha$ SDI, se ha expresado en la levadura *P. pastoris*, con un rendimiento final de 1 mg/L de inducción. La caracterización *in vitro* realizada mostró que IMTXA33 $\alpha$ SDI mantiene las mismas características estructurales, de actividad ribonucleolítica, de unión específica y acción citotóxica frente a células tumorales que su variante inmunogénica, la inmunotoxina ya caracterizada IMTXA33 $\alpha$ S (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012), mostrando que las diferencias de incremento de actividad ribonucleolítica detectadas para  $\alpha$ SDI son indiferentes cuando se encuentra formando parte del dominio tóxico de una inmunotoxina. La caracterización *in vivo* mostró que IMTXA33 $\alpha$ SDI era capaz de disminuir el volumen tumoral de ratones xenoinjertados con células tumorales SW1222, pasando de 2.000 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral en los ratones tratados con PBS a los 300 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral en los ratones tratados con IMTXA33 $\alpha$ SDI. Este efecto antitumoral es idéntico al observado para la inmunotoxina

## Discusión

IMTXA33 $\alpha$ S, para la cual en el día 10 de tratamiento el volumen tumoral no superó los 400 mm<sup>3</sup> (Tomé-Amat *et al.*, 2015c). El análisis prolongado en el tiempo del crecimiento tumoral tras la administración de IMTXA33 $\alpha$ SDI, mostró una recurrencia del tumor, aumentando el volumen tumoral y alcanzándose los 2500 mm<sup>3</sup> a los 25 días con 25  $\mu$ g de IMTXA33 $\alpha$ SDI, y a los 30 días con 50  $\mu$ g de IMTXA33 $\alpha$ SDI (**Figura D.2**). Por tanto, si bien IMTXA33 $\alpha$ SDI no eliminó completamente el tumor, sí que aumentó de forma significativa el tiempo de supervivencia.



**Figura D.2.** Evolución del crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados con células SW1222 tras el tratamiento con las distintas inmunotoxinas. Las curvas representan al grupo tratado con PBS (negro), con IMTXA33 $\alpha$ SDI 25  $\mu$ g (verde) y 50  $\mu$ g (azul) y con IMTXA33fur $\alpha$ SDI 25  $\mu$ g (rosa) y 50  $\mu$ g (rojo). La línea discontinua vertical marca el tiempo a partir del cual se dejó de administrar el tratamiento.

Por otro lado, considerando que la eficacia de una inmunotoxina está determinada de manera crítica por su procesamiento intracelular, en función de la ruta intracelular seguida, fundamentalmente por el dominio tóxico, hasta su liberación al citosol (Tortorella *et al.*, 2012; Tomé-Amat *et al.*, 2015a; Ruiz de la Herrán *et al.*, 2019) se diseñó la inmunotoxina no inmunogénica IMTXA33fur $\alpha$ SDI, que al igual que IMTXA33 $\alpha$ SDI presentaba un scFv frente al GPA33 como dominio marcador, y  $\alpha$ SDI como dominio tóxico, pero incluyendo una secuencia de reconocimiento de la enzima furina. La actividad proteolítica de la furina tiene lugar sobre el aminoácido posterior a la secuencia de reconocimiento, siendo Arg-X-(Arg/Lys)-Arg la secuencia de mayor afinidad, y Arg-X-X-Arg la secuencia mínima de

reconocimiento (Van de Ven *et al.*, 1991; Ruiz-de-la-Herrán *et al.*, 2019). Para el diseño de IMTXA33fura $\alpha$ SDI se utilizó la secuencia mínima, al basarse la expresión de la inmunotoxina en la eliminación del factor  $\alpha$  y la consiguiente secreción al medio extracelular por la proteasa de la levadura Kex2. Al ser Kex2 de la familia de serín-porteasa del tipo subtilisina, como la furina, se incorporó la secuencia mínima, pues con esta secuencia la eficacia catalítica de Kex2 por la secuencia de reconocimiento de la furina es muy reducida (Rockwell *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2008). Este menor reconocimiento de la enzima furina por la secuencia mínima explica que en el ensayo de furina, la liberación del dominio tóxico, la  $\alpha$ SDI, no sea completa, y tras 24 horas de reacción enzimática, la mayor parte de la inmunotoxina aún no esté escindida.

La caracterización estructural y funcional *in vitro* de IMTXA33fura $\alpha$ SDI mostró que mantenía su actividad ribonucleolítica y de unión específica a las células tumorales SW1222, siendo la eficacia citotóxica de IMTXA33fura $\alpha$ SDI (IC<sub>50</sub> de 12 nM) en el ensayo de MTT superior a la de IMTXA33 $\alpha$ SDI (IC<sub>50</sub> de 150 nM) (**Tabla D.1**), debido al procesamiento de la inmunotoxina por la enzima furina presente en la membrana de los endosomas tempranos y del retículo endoplasmático, la liberación de  $\alpha$ SDI y su traslocación más rápida al citoplasma. No obstante, en el ensayo de Leu-H<sup>3</sup>, no se observó ninguna mejora significativa de la citotoxicidad de IMTXA33fura $\alpha$ SDI respecto a IMTXA33 $\alpha$ SDI. Ello puede ser debido a que el ensayo de Leu-H<sup>3</sup> detecta la inhibición de la biosíntesis de proteínas, que en un tiempo posterior dará lugar a la muerte celular, detectada por el ensayo de MTT, por lo que puede que la detección de la mayor eficacia citotóxica por parte de A33fura $\alpha$ SDI requiera tiempos menores para el ensayo de Leu-H<sup>3</sup>.

Inmunotoxina	IC50 72h (MTT)	IC50 72 h (Leu-H <sup>3</sup> )
IMTXA33 $\alpha$ SDI	150 nM	20 nM
IMTXA33fura $\alpha$ SDI	12 nM	20 nM

**Tabla D.1:** Resumen de las IC<sub>50</sub> para los 2 ensayos de citotoxicidad llevados a cabo (MTT y Leu-H<sup>3</sup>) de las 2 inmunotoxinas no inmunogénicas analizadas (IMTXA33 $\alpha$ SDI y IMTXA33fura $\alpha$ SDI).

La inclusión de un sitio de restricción de furina mejora la eficacia citotóxica de las inmunotoxinas con distintos dominios tóxicos, como la toxina de *Pseudomonas* (Weldon *et al.*, 2015) o ribotoxinas, como la restrictocina (Goyal & Batra, 2000) o la  $\alpha$ -sarcina (Ruiz-de-la Herrán *et al.*, 2019) cuando estas son analizadas *in vitro*. No obstante, hay pocos estudios que analicen su eficacia antitumoral *in vivo*.

## Discusión

En el caso de IMTXA33fura $\alpha$ SDI, cuando se administró a ratones *nude* con xenoinjertos de cáncer colorrectal produjo una disminución de volumen tumoral idéntico al llevado a cabo por la administración de IMTXA33 $\alpha$ SDI. Sin embargo, sí se observaron diferencias en la duración de su eficacia tras la administración de la inmunotoxina. Así, mientras que el volumen de los tumores tratados con 50  $\mu$ g de IMTXA33 $\alpha$ SDI aumentó hasta los 2.500 mm<sup>3</sup> (volumen a partir del cual son sacrificados) a los 30 días, el volumen de los tumores tratados con 50  $\mu$ g de IMTXA33fura $\alpha$ SDI se mantiene en torno a los 700 mm<sup>3</sup> hasta los 30 días (**Figura D.2**). Estos resultados indicarían que la inclusión del sitio de corte por furina no sólo conduce a un procesamiento más óptimo de la inmunotoxina, permitiendo una liberación más rápida al citosol, sino que este procesamiento se traduce *in vivo* en una disminución del volumen tumoral, un retraso en su recurrencia y recuperación y una mayor supervivencia, pues ningún ratón tratado con IMTXA33fura $\alpha$ SDI 50  $\mu$ g tuvo que ser sacrificado por alcanzar un alto volumen tumoral en el tiempo de duración del ensayo.

Tanto IMTXA33 $\alpha$ SDI como IMTXA33fura $\alpha$ SDI seguirían una ruta intracelular que implicaría a los endosomas tempranos-aparato de Golgi-retículo endoplasmático, y concluiría con la liberación en última instancia de  $\alpha$ SDI al citosol de las células tumorales (Ruiz de la Herrán *et al.*, 2019; Ruiz de la Herrán, 2021). No obstante, la presencia de un sitio de furina permitiría que la enzima furina presente en las membranas de los endosomas tempranos y del aparato de Golgi (Thomas, 2002) liberase el dominio tóxico de IMTXA33fura $\alpha$ SDI. Esta  $\alpha$ SDI libre, debido a su capacidad de interactuar con fosfolípidos ácidos presentes en las membranas internas de estos endosomas (Gruenberg, 2003; Zhao *et al.*, 2013), alcanzaría el citosol de las células tumorales más rápido y en mayor número respecto al dominio tóxico de la variante sin furina, en la que parte de las moléculas de  $\alpha$ SDI sería degradada en los lisosomas o alcanzaría el citosol más lentamente a través de la vía retrógrada. De esta manera IMTXA33fura $\alpha$ SDI alcanzaría y eliminaría más células tumorales y a mayor velocidad, lo que explicaría la ausencia de recurrencia en el crecimiento tumoral para la dosis de 50  $\mu$ g. Las diferencias observadas para las dosis de 25  $\mu$ g o 50  $\mu$ g de IMTXA33fura $\alpha$ SDI suministrada plantean la realización de nuevos ensayos para determinar la dosis óptima en relación con su eficacia a largo plazo.

Como ya ha sido indicado, uno de los principales problemas a la hora de administrar múltiples dosis de inmunotoxinas como agentes terapéuticos es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes por parte del paciente, que además de reducir la eficacia de la inmunotoxina, puede provocar efectos secundarios adversos. Por ello, se llevó a cabo la caracterización inmunológica de las dos inmunotoxinas que incluían la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina (IMTXA33 $\alpha$ SDI y IMTXA33fura $\alpha$ SDI) en comparación con la inmunotoxina incluyendo la forma *wild type* de la  $\alpha$ -sarcina (IMTXA33 $\alpha$ S).

El rechazo inmunológico de una inmunotoxina comprende tanto al sistema inmune innato como al sistema inmune adquirido. El sistema inmune innato comprende monocitos, macrófagos, células dendríticas... cuyas principales funciones son el reconocimiento de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) presentes en bacterias, hongos..., el reclutamiento de células inmunes, la liberación de citoquinas proinflamatorias, y la fagocitosis de los patógenos, y su procesamiento como péptidos antigénicos para la posterior presentación y activación de linfocitos B y T (Si-Tahar *et al.*, 2009). Por tanto, la activación inmune innata es un elemento clave y temprano en el reconocimiento de las inmunotoxinas como agentes inmunogénicos. La utilización de las células THP-1 como modelo de monocito y activación del sistema inmune innato es un método frecuentemente utilizado para estudios de enfermedades inflamatorias (Pandur *et al.*, 2021) y administración de agentes terapéuticos (Sun *et al.*, 2020). Para el caso de las inmunotoxinas estudiadas, no se produjo activación de monocitos en ningún caso, indicando que ninguna de las inmunotoxinas no inmunogénicas, ni la inmunotoxina *wild type* era reconocido por los monocitos.

Para la generación de ADAs, se precisa la activación de linfocitos B, para que cambien su fenotipo a células plasmáticas productoras de anticuerpos. En este proceso intervienen las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T CD4+, siendo estas células componentes del sistema inmune adquirido. Debido al papel necesario de los linfocitos T en la activación de los linfocitos B, al intervenir en los procesos de maduración de la afinidad y de *class switching*, y a la invariabilidad de las especificidades de los linfocitos T (frente a la variabilidad de los linfocitos B), la eliminación de los epítomos de las células T es una estrategia más eficaz que la eliminación de los epítomos de las células B para la reducción de la inmunogenicidad (Yeung *et al.*, 2004; Mazor *et al.*, 2017).

Para la evaluación de la activación inmunológica de los linfocitos por parte de las inmunotoxinas, se analizó la activación y proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), así como la secreción de citoquinas. La proliferación de PBMCs es un método adecuado para medir la activación de linfocitos, al ser la composición de los PBMCs aislados un 5% de monocitos, 10% linfocitos NK, 15 % linfocitos B y 70% linfocitos T, de los cuales el 70% son linfocitos T CD4+ (Corkum *et al.*, 2015). Los resultados de la proliferación de PBMCs estimulados con las inmunotoxinas no inmunogénicas o con la inmunotoxina original, tanto por contaje con hemocitómetro como por disminución de la señal de la sonda fluorescente intracelular CFSE al dividirse los PBMCs, mostraron que ninguna de las inmunotoxinas analizadas provocaba activación de linfocitos, mientras que IMTXA33 $\alpha$ S sí producía un aumento de proliferación de PBMCs al aumentar la concentración, si bien no llegaba a superar el umbral de activación inmunológica.

## Discusión

Estos datos fueron corroborados con la cuantificación de la secreción de citoquinas. Así, para el caso de IL-4, como modelo de citoquina producida por linfocitos Th2 en respuesta a parásitos y procesos alérgicos, ninguna concentración de ninguna inmunotoxina provocó secreción por encima del umbral de activación inmunológica. En el caso del IFN $\gamma$ , como modelo de citoquina producida por linfocitos Th1 en respuesta a virus y bacterias, así como de activación de linfocitos T estimulados por antígenos (Tassignon *et al.*, 2005) sólo la inmunotoxina original a la concentración más baja mostró activación por encima del umbral inmunológico, mientras que las inmunotoxinas no inmunogénicas no mostraron activación a ninguna concentración. La activación de IMTXA33 $\alpha$ S a 0,5  $\mu$ M podría deberse a un error experimental en ese punto pues a mayores concentraciones de IMTXA33 $\alpha$ S no se observó activación, o algún efecto derivado de su citotoxicidad sobre los linfocitos, pese a que en los ensayos de proliferación de PBMCs en ningún momento se muestra una disminución de la viabilidad. Más bien se produce un incremento en la proliferación al aumentar la concentración de IMTXA33 $\alpha$ S que en ningún caso sobrepasaba el umbral de activación inmunológica. Recientemente se está utilizando IL-2 como modelo de activación, diferenciación y memoria de células T, al ser más específico de estas, por lo que analizar la secreción de esta citoquina por parte de los PBMCs podría aportar más información (Mazor & Pastan, 2020).

En los ensayos realizados para el estudio de la secreción de IL-10, ninguna inmunotoxina a ninguna concentración superó el umbral de activación inmunológica, con niveles muy por debajo de dicho umbral. No obstante, la IL-10 es una citoquina producida por muy diversos tipos células (células de línea linfoide, mieloide, células epiteliales y tumorales) con efectos muy diversos. Aunque tiene un papel clásico antiinflamatorio e inmunosupresor, inhibiendo la respuesta de linfocitos T limitando la presentación de antígenos por macrófagos y células dendríticas también se han descrito efectos estimuladores sobre los linfocitos T CD8+, aumentando su proliferación y la secreción de IFN $\gamma$  (Saraiva *et al.*, 2019). Por ello, sería necesario contextualizar con distintos tipos celulares los efectos biológicos concretos de la baja secreción de esta citoquina.

Queda por tanto corroborado que, pese a que la  $\alpha$ -sarcina provoca activación de linfocitos y es posible reducir su inmunogenicidad (Jones *et al.*, 2016), cuando esta ribotoxina forma parte del dominio tóxico de una inmunotoxina, en general se comporta como no inmunogénica, con mínimas diferencias de inmunogenicidad entre variantes de inmunotoxinas inmunogénicas (IMTXA33 $\alpha$ S) y no inmunogénicas (IMTXA33 $\alpha$ SDI y IMTXA33fur $\alpha$ SDI) (Rathore & Bathra 1996; Lacadena *et al.*, 2007). Ello puede ser debido a que, a causa del pequeño tamaño de las ribotoxinas, sus epítomos débilmente inmunogénicos queden enmascarados por el dominio marcador, que en nuestro caso

consiste en un scFv humanizado de mayor tamaño (25 KDa) que el dominio tóxico (17 KDa).

### **D2. Producción y caracterización de nanoimmunotoxinas basadas en un nanobody (VHH) frente a EGFR.**

El segundo de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral implicaba el diseño, producción y caracterización de nanoimmunotoxinas, incluyendo como dominio marcador un *nanobody* frente a EGFR, el VHH 7D12. Así, se plantearon tres diseños, la nanoimmunotoxina (VHHEGFR $\alpha$ S); esta misma construcción, pero con formato trimérico (TriVHHEGFR $\alpha$ S), debido a la incorporación de un dominio de trimerización del colágeno XVIII a VHHEGFR $\alpha$ S; y finalmente una nanoimmunotoxina biespecífica no inmunogénica (Biesp- $\alpha$ SDI), que además del dominio marcador VHHEGFR frente al EGFR presenta el dominio marcador scFvA33, frente a GPA33, incorporando además la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI).

EGFR está sobreexpresado en un elevado número de cánceres de origen epitelial, por lo que constituye una diana terapéutica apropiada para el desarrollo de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas (Biteghe *et al.*, 2020). En la actualidad, la administración del anticuerpo monoclonal cetuximab, dirigido frente a este marcador tumoral, está aprobado como terapia dirigida ampliamente empleada para el tratamiento de cánceres colorrectales con sobreexpresión de EGFR, habiéndose desarrollado diferentes inmunotoxinas basadas en cetuximab como dominio marcador, con efecto antitumoral *in vitro* (Niesen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020). Sin embargo, al utilizarse anticuerpos completos, las inmunotoxinas presentan un elevado tamaño que dificulta la penetración en tumores sólidos, limitándose la acción citotóxica a la periferia del tumor, por lo que se han desarrollado también inmunotoxinas cuyos dominios marcadores son scFv de cetuximab, presentando efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Azemar *et al.*, 2000; Bruell *et al.*, 2005)

La aparición de los *nanobodies* ha supuesto un avance significativo en el diseño de inmunotoxinas debido entre otros a su menor tamaño, lo que les permite una mayor penetración en tumores sólidos (Allegra *et al.*, 2018), así como a través de la barrera hematoencefálica (Abulrob *et al.*, 2005), su elevada estabilidad, su baja inmunogenicidad, así como un rápido aclaramiento renal, reduciendo toxicidades inespecíficas. Por ello, diseñar y producir nanoimmunotoxinas, con *nanobodies* como dominio marcador y un menor tamaño facilitaría la penetración tumoral, y la eliminación de células tumorales en el

## Discusión

interior del tumor, donde se encuentran mayoritariamente las células madre del cáncer, responsables en última instancia de la recurrencia. Los resultados obtenidos con nuestras construcciones basadas en VHHEGFR suponen una confirmación de su potencial terapéutico.

En primer lugar, VHHEGFR $\alpha$ S, se expresó en *P. pastoris*, con un rendimiento final de 4 mg/L de inducción, rendimiento muy superior al obtenido para inmunotoxinas con scFv como dominio marcador (1mg/L), debido al menor tamaño de la construcción, lo que favorecería una mayor y mejor secreción al medio extracelular. La caracterización estructural mostró que VHHEGFR $\alpha$ S estaba correctamente plegada, con un predominio de estructura  $\beta$ , al ser esta la estructura secundaria mayoritaria tanto de los VHH como de la  $\alpha$ -sarcina, con una  $T_m$  de 50°C. Si bien esta es menor que la descrita para los VHH solos (Harmsen *et al.*, 2007; Moradi *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021), sugiriendo que la incorporación del dominio tóxico de la  $\alpha$ -sarcina disminuiría su estabilidad, sin embargo sigue siendo una construcción con una alta termoestabilidad, en cualquier caso por encima de la temperatura fisiológica a la que debe actuar como agente terapéutico. VHHEGFR $\alpha$ S mantiene la capacidad ribonucleolítica específica de su dominio tóxico y mostró capacidad de unión específica a las células EGFR+ (A431), mientras que no se unió a células EGFR- (SW1222). Coherentemente, VHHEGFR $\alpha$ S sólo presentó actividad citotóxica específica frente a las células A431, con una  $IC_{50}$  de 500 nM en el ensayo de viabilidad celular por MTT tras 72 horas de incubación, y de 200 nM para el ensayo de inhibición de biosíntesis de proteínas. La menor  $IC_{50}$  en el ensayo de Leu-H<sup>3</sup> respecto al de MTT, también observable en el resto de inmunotoxinas estudiadas, puede deberse como se ha indicado a que la inhibición de la biosíntesis de proteínas, medida por el ensayo de Leu-H<sup>3</sup>, es un proceso que ocurre previamente a la muerte celular, medida por el ensayo de MTT. En cualquier caso, los valores obtenidos de  $IC_{50}$  son más elevados que los obtenidos por otras nanoimmunotoxinas basadas en el VHH 7D12 (Deng *et al.*, 2017), pudiendo deberse al elevado crecimiento de las células A431 (Barnes, 1984), capaz de enmascarar el efecto citotóxico de VHHEGFR $\alpha$ S, o a la dificultad de la  $\alpha$ -sarcina para separarse del dominio marcador tras su internación.

Por otro lado, los ensayos de estabilidad muestran que la nanoimmunotoxina VHHEGFR $\alpha$ S mantiene su integridad estructural y su capacidad de unión específica a las células A431 a 37°C y en presencia de medio hasta las 96 horas, lo cual es coherente con la elevada estabilidad de los *nanobodies*, lo que favorecería enormemente su aplicación terapéutica *in vivo*.

La caracterización *in vivo* mostró que la administración cada 48 horas de VHHEGFR $\alpha$ S inhibía el crecimiento tumoral de los tumores xenoinjertados en ratones. No obstante, después de la administración de VHHEGFR $\alpha$ S a los 10 días, el volumen tumoral de los ratones tratados creció rápidamente a la misma velocidad que el control de PBS, alcanzándose un volumen tumoral de 2.000 mm<sup>3</sup> a los 25 días, sin que se observasen diferencias significativas en función de la concentración de nanoimmunotoxina suministrada, ni en el volumen del tumor final alcanzado, ni en la velocidad de crecimiento en relación con los días transcurridos hasta alcanzar dicho volumen final. Esto podría explicarse por el menor tamaño de VHHEGFR $\alpha$ S (32 KDa), respecto a las construcciones basadas en formato scFv, ya que está muy por debajo del umbral de filtración glomerular (60-70 KDa), por lo que la nanoimmunotoxina podría ser eliminada rápidamente de la sangre (Gainkam *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). Así, el efecto observado durante el tratamiento, con un régimen de administración cada 48 horas compensaría el rápido aclaramiento renal, permitiendo la penetración de VHHEGFR $\alpha$ S en el tumor, facilitada por su pequeño tamaño, y produciendo una mayor inhibición del crecimiento tumoral, en relación con lo descrito para otras inmunotoxinas basadas en cetuximab y que, debido a su mayor tamaño, eran incapaces de penetrar en el tumor tan eficientemente (Wu *et al.*, 2020). No obstante, cuando se paró el régimen de administración, el aclaramiento de VHHEGFR $\alpha$ S permitió la rápida recuperación del crecimiento tumoral.

Por otro lado, una de las estrategias utilizadas para aumentar la vida media en sangre de anticuerpos o derivados consiste en diseñar formatos triméricos que sobrepasen el umbral de filtración glomerular y que presenten una elevada retención en el tumor a causa de su mayor avidéz o afinidad funcional (Cuesta *et al.*, 2010; Ríos *et al.*, 2019). Estos formatos triméricos, en el caso de las inmunotoxinas, aumentarían la carga tóxica, incrementando su eficacia citotóxica antitumoral (Lázaro-Gorines *et al.*, 2019). Así, se ha diseñado la nanoimmunotoxina trimérica TriVHHEGFR $\alpha$ S mediante la incorporación del dominio de trimerización derivado del colágeno XVIII (Tie<sup>XVIII</sup>) entre el dominio marcador (VHHEGFR) y el dominio tóxico ( $\alpha$ -sarcina). Tras su expresión en *P. pastoris* y posterior purificación, se observaron en el análisis electroforético dos bandas, correspondientes al monómero de TriVHHEGFR $\alpha$ S, reconocida por el anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina; y otra correspondiente a un monómero de TriVHHEGFR, que no es reconocida por el anticuerpo anti  $\alpha$ -sarcina. Estas dos formas eluyeron de forma conjunta en una cromatografía de penetrabilidad, en el pico correspondiente a 130 KDa (el tamaño de la nanoimmunotoxina en formato trimérico). La única explicación sería que la banda de 30 KDa efectivamente correspondiese a un monómero de TriVHHEGFR, monómero que en disolución se encuentra trimerizando (razón por la cual aparece en el pico único de 130 KDa en la cromatografía de

## Discusión

penetrabilidad), y al menos uno de los monómeros del trímero es TriVHHEGFR $\alpha$ S (lo que explicaría que las 2 bandas aparezcan en una proporción 1:1 tras la cromatografía de Ni<sup>2+</sup>-NTA, al estar el *tag* de histidinas en el extremo C-terminal de TriVHHEGFR $\alpha$ S). La razón de que aparezcan estas dos bandas, en vez de la única banda de 45 KDa correspondiente al monómero de TriVHHEGFR $\alpha$ S, puede ser debido al proceso de síntesis y potencial corte proteolítico previo a la secreción al medio extracelular de la cepa de levadura utilizada, pues las pruebas de expresión llevadas a cabo tras la electroporación determinaron que según la cepa y la colonia analizada aparecían las dos bandas, solo la banda de 30 KDa, o no se observaba ninguna banda (datos no mostrados).

La caracterización estructural de TriVHHEGFR $\alpha$ S mostró que la nanoinmunotoxina trimérica presentaba una estructura secundaria caracterizada por la presencia de un elevado porcentaje de lámina  $\beta$  (debido a los componentes estructurales de VHHEGFR y de la  $\alpha$ -sarcina) y de estructura aleatoria, a causa de los *linkers* flexibles situados entre el dominio de trimerización y los dominios marcadores y tóxicos que conforman lazos de estructura aleatoria (Blanco-Toribio *et al.*, 2014; Lázaro-Gorines *et al.*, 2019). La caracterización funcional mostró que TriVHHEGFR $\alpha$ S mantenía la capacidad ribonucleolítica específica sobre los ribosomas, liberando el fragmento  $\alpha$ , así como la capacidad de unión específica a células EGFR+. Cabe destacar, que a baja concentración (10 nM), TriVHHEGFR $\alpha$ S presentó mayor capacidad de unión a las células que su variante monomérica, VHHEGFR $\alpha$ S. Ello es coherente con lo observado para otras construcciones triméricas (Lázaro-Gorines *et al.*, 2019), y puede ser debido a que la primera unión de un VHH a EGFR, favorece que se produzca una segunda y tercera unión, interacción que se ve facilitada por la flexibilidad del *linker* peptídico de 21 aminoácidos que flanquea el dominio de trimerización (Cuesta *et al.*, 2009; Cuesta *et al.*, 2010). El ensayo de citotoxicidad llevado a cabo mostró que TriVHHEGFR $\alpha$ S presentaba actividad citotóxica específica frente a las células EGFR+, con una IC<sub>50</sub> de 10 nM, 30 veces menor que la IC<sub>50</sub> de su variante monomérica, VHHEGFR $\alpha$ S frente a las mismas células, a igualdad de concentración de monómero. Este aumento en la eficacia citotóxica de la variante trimérica respecto a la monomérica, debida a su multivalencia, al aumento de su avidéz y al mayor número de moléculas tóxicas dirigidas al interior de las células, permitiría una reducción en la dosis administrada requerida para la obtención del mismo beneficio terapéutico, disminuyendo los efectos secundarios derivados de su toxicidad inespecífica.

La terapia dirigida frente a EGFR, con el desarrollo de cetuximab y panitumumab ha constituido una estrategia terapéutica que ha mejorado la respuesta clínica y la supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. No obstante, pacientes que inicialmente responden a cetuximab adquieren resistencia al tratamiento a lo largo de la

terapia, a consecuencia de mutaciones en las vías de señalización downstream de EGFR, como en KRAS o en PIK3CA (Karapetics *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2020). Por otro lado, mutaciones o deleciones en EGFR, como la variante EGFRvIII, presentan un dominio extracelular truncado que elimina el sitio de unión al ligando o al potencial terapéutico, otorgándole actividad kinasa constitutiva (Gan *et al.*, 2013). Además, la heterogeneidad intrínseca y la evolución tumoral permite a los tumorales evadir tratamientos mono-específicos mediante la evasión antigénica (Vyas *et al.*, 2017; El-Sayes *et al.*, 2021), o el desarrollo de resistencias frente al tratamiento con inmunotoxinas (Dieffenbach & Pastan, 2020). Por ello, desde hace más de 50 años (Nisonoff & Rivers, 1961) y gracias a la tecnología de anticuerpos es posible construir anticuerpos biespecíficos, que estén dirigidos a distintos epítomos de EGFR, o que estén dirigidos a distintos marcadores de membrana, con el fin de bloquear distintas vías de señalización, y permitir la continuidad en la eficacia antitumoral en caso de que alguno de esos marcadores se vuelva refractario a la unión de su correspondiente anticuerpo.

De acuerdo con esta idea, se ha diseñado y producido una inmunotoxina biespecífica (Biesp- $\alpha$ SDI), que presenta como dominios marcadores el VHH 7D12 frente a EGFR y el scFv frente a GPA33, y como dominio tóxico la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI). De esta manera, se combina la doble especificidad de los dos dominios marcadores, junto con la potencia tóxica y seguridad inmunogénica de la  $\alpha$ SDI, ya analizada en el Bloque A. Esta inmunotoxina biespecífica se expresó nuevamente en *P. pastoris* purificándose a homogeneidad con un rendimiento de 3 mg/L de inducción. Al igual que en el caso de VHHEGR $\alpha$ S, la presencia del dominio VHH en el extremo N-terminal parece favorecer un incremento en el rendimiento de producción y purificación de las construcciones en las que se incluye.

La caracterización estructural mostró que Biesp- $\alpha$ SDI presentaba un plegamiento adecuado con un predominio de estructura secundaria en lámina  $\beta$ , debido al predominio de este componente estructural en sus 3 componentes (el VHH7D12, el scFv frente a GPA33, y la  $\alpha$ SDI) y una  $T_m$  de 55°C, por encima de los 37°C a los que la inmunotoxina llevaría a cabo su acción terapéutica, indicando la elevada estabilidad de Biesp- $\alpha$ SDI, pese a su elevado tamaño molecular (58 KDa).

Del mismo modo, Biesp- $\alpha$ SDI mantenía la actividad ribonucleolítica específica de la  $\alpha$ -sarcina sobre los ribosomas, liberando el fragmento  $\alpha$ . Además, la funcionalidad de los dos componentes del dominio marcador se puso de manifiesto por su capacidad de reconocimiento y de unión, tanto a células EGFR+ (A431) como a células GPA33+ (SW1222). Además, cuando se comparó la unión de Biesp- $\alpha$ SDI con sus variantes

## Discusión

monoespecíficas (VHHEGFR $\alpha$ S o IMTXA33 $\alpha$ SDI), se observa que la inmunotoxina biespecífica mantiene la misma capacidad de unión, de acuerdo con el porcentaje de células marcadas, que las variantes monoespecíficas, indicando que ni el mayor tamaño molecular de la inmunotoxina biespecífica, ni el hecho de que el dominio marcador scFvA33 esté flanqueado en su extremo N-terminal por VHHEGFR y en su extremo C-terminal por  $\alpha$ SDI provocó una disminución en la capacidad de unión de Biesp- $\alpha$ SDI a sus marcadores tumorales diana, EGFR y GPA33.

Los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con la inmunotoxina biespecífica mostraron que Biesp- $\alpha$ SDI presentaba actividad citotóxica específica sobre células EGFR+ y GPA33+, sin embargo, las IC<sub>50</sub> obtenidas fueron mayores que las observadas con sus variantes monoespecíficas (1  $\mu$ M frente a 300 nM para el caso de células A431 y 700 nM frente a 150 nM para el caso de células SW1222) (**Tabla D.2**). Estos resultados, sugerirían una menor tasa de internación de la inmunotoxina biespecífica, de mayor tamaño molecular que sus variantes monoespecíficas, a pesar de no verse afectada la unión a sus marcadores tumorales, como se ha indicado anteriormente. Por tanto, serían necesarios nuevos estudios que determinasen la eficacia de internación y procesamiento intracelular de la inmunotoxina biespecífica, y consecuentemente la tasa de liberación del dominio tóxico ( $\alpha$ SDI) al citosol. A pesar de todo, la biespecificidad citotóxica de Biesp- $\alpha$ SDI sobre células que presenten en su membrana el antígeno tumoral GPA33, EGFR o ambos, junto con la seguridad inmunogénica proporcionada por  $\alpha$ SDI, convierten a Biesp- $\alpha$ SDI en un seguro y potencial agente terapéutico para el cáncer colorrectal.

Inmunotoxina	Rendimiento	IC <sub>50</sub> (MTT)	IC <sub>50</sub> (Leu-H <sup>3</sup> )
IMTXA33 $\alpha$ SDI	1 mg/L	150 nM	20 nM
IMTXA33fura $\alpha$ SDI	0,9 mg/l	12 nM	20 nM
VHHEGFR $\alpha$ S	4 mg/l	300 nM	200 nM
TriVHHEGFR $\alpha$ S	0,4 mg/l	10 nM	-
VHHEGFRA33 $\alpha$ SDI	3 mg/l	1 $\mu$ M (A431) 700 nM (SW1222)	-

**Tabla D.2.** Tabla indicando el rendimiento de la producción y las IC<sub>50</sub>, tanto para los ensayos de MTT como para los ensayos de Leu-H<sup>3</sup> de todas las inmunotoxinas diseñadas y caracterizadas en la presente tesis doctoral.

Por tanto, el conjunto de resultados obtenidos con las tres construcciones basadas en el empleo de *nanobodies* confirman y apoyan su potencial aplicación en el tratamiento y

diagnóstico del cáncer. Su elevada capacidad de unión, su termorresistencia y elevada estabilidad, así como su baja inmunogenicidad los convierten en candidatos idóneos para su incorporación en el diseño de inmunotoxinas de nueva generación. En la actualidad, existen numerosos ensayos clínicos de terapia antitumoral basada en nanobodies frente a tumores hematológicos (Wu *et al.*, 2014), glioblastoma (Van de Water *et al.*, 2012), cáncer colorrectal (Behar *et al.*, 2009; Allegra *et al.*, 2018), confirmando el inmenso potencial que tienen los *nanobodies* y sus derivados como agentes terapéuticos antitumorales. Además, el carácter modular de las inmunotoxinas permite la incorporación de dominios de trimerización, incrementando su avidéz y carga tóxica, así como de otros dominios marcadores, permitiendo la unión simultánea a diferentes marcadores, bloqueando distintas vías de señalización.

### **D3. Vehiculización de inmunotoxinas mediante nanopartículas de oro.**

Recientemente, ha surgido un elevado interés en el empleo de nanomateriales para el tratamiento de enfermedades, no sólo con el fin de reducir la invasividad y la toxicidad inespecífica, sino por sus características específicas que aportan nuevas propiedades con potencial aplicación terapéutica. Una de las principales características de estos nanomateriales es que, debido a la reactividad de su superficie en función del material del que estén constituidos, y a su elevada *ratio* superficie/volumen, se pueden fusionar con distintos agentes, combinando diferentes propiedades de interés médico (absorción infrarroja y efecto fototérmico, fluorescencia, magnetización, unión específica mediante anticuerpos, agentes quimioterapéuticos) en una única partícula de dimensiones nanométricas para desarrollar plataformas o vehículos nanomédicos para la administración terapéutica, marcaje específico, efectos antitumoral, monitorización... (Park *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020).

Además de servir como plataformas nanomédicas, estos nanomateriales pueden presentar un efecto fototérmico en función del material del que estén constituidos, convirtiendo la energía lumínica incidida a través de la penetración en los tejidos en energía térmica, pudiendo utilizarse para la eliminación de células tumorales (Jaque *et al.*, 2014). Así, puede utilizarse este efecto dual de las nanopartículas para diseñar nuevas estrategias terapéuticas que combinen la fototerapia de las nanopartículas, con el efecto terapéutico de las inmunotoxinas adheridas a la superficie de estas nanopartículas.

## Discusión

Para ello, en primer lugar, se sintetizaron nanopartículas de oro (AuNP), que presentan una elevada eficiencia fototérmica, sencillez y rapidez de síntesis y modificación de su superficie, una elevada estabilidad, así como ausencia de toxicidad o inmunogenicidad, y una elevada penetración y retención en tejidos (Chen *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Además, la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR, de Localized Surface Plasmon Resonance) de las AuNP puede ser usado tanto para monitorizar por imagen como para terapia fototérmica, convirtiéndolas en agentes teranósticos, utilizados tanto para terapia como para diagnóstico. (D'Hollander *et al.*, 2020)

Entre las diferentes morfologías posibles de nanopartícula, se seleccionaron aquellas con morfología de nanoestrellas (AuNS), sintetizándolas mediante un crecimiento mediado por semillas (Yuan *et al.*, 2012; Ahijado-Guzmán *et al.*, 2020), debido a que las AuNS presentan una baja toxicidad, una elevada endocitosis celular y una elevada generación de calor comparado con otras morfologías, como *nanorods*, nanojaulas o nanoesferas (D'Hollander *et al.*, 2020; Pakravan *et al.*, 2021). Tras su síntesis, se recubrieron con PEG para aumentar su estabilidad y disminuir su agregación, y se funcionalizaron con el grupo funcional ANTA-Co<sup>II</sup>, para la unión del tag de histidinas, presentes en el extremo C-terminal de nuestras inmunotoxinas. El diámetro de las AuNS sintetizadas fue de 55 nm, siendo el tamaño de diámetro de 50 nm el óptimo para la interacción de las AuNS con las células (Verma *et al.*, 2010) y para la penetración en los frágiles vasos sanguíneos de la vasculatura tumoral (Zhao *et al.*, 2018). No obstante, diámetros superiores a 100 nm han resultado mostrar una mayor retención tumoral (Nomura *et al.*, 1988; D'Hollander *et al.*, 2020).

Tras la síntesis de AuNS, se analizaron las condiciones óptimas de unión (inicialmente solamente al dominio marcador scFvA33, y posteriormente a la inmunotoxina completa IMTXA33 $\alpha$ S), determinándose que la unión era dependiente de la *ratio* proteína/AuNS, del tiempo de interacción entre ambos componentes, y de la presencia de ANTA-Co<sup>II</sup> en la superficie de las AuNS para la interacción con el tag de histidinas. Se determinó que las condiciones óptimas de unión implicaban una *ratio* Au:proteína de 1:10<sup>6</sup>, así como un tiempo de incubación entre ambos componentes de al menos 12 horas. La unión de las proteínas a las AuNS no modificaba la morfología de estas (pues mantienen el mismo diámetro y el mismo tamaño de espículas) ni sus propiedades físicas, al mantenerse el pico de absorción entre los 650 nm, con una amplitud que abarca desde los 550 nm hasta los 800 nm, correspondiente a la región infrarroja próxima (NIR) o ventana fototerapéutica, desde los 650 a los 1000 nm (Wei *et al.*, 2020), donde la transmisividad del agua y la hemoglobina es mayor y la luz puede penetrar hasta la localización tumoral de las AuNS (Melancon *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2019). Este máximo de absorción, correspondiente con la resonancia del plasmón de superficie localizada, depende del tamaño y ángulo de las

espículas (Kumar *et al.*, 2008), y en algunos casos puede llegar hasta los 800 nm (Pakravan *et al.*, 2021). En nuestro caso, la localización del máximo de absorción en la ventana fototerapéutica fue suficiente para aprovechar el efecto fototérmico.

Cuando las proteínas quedan adsorbidas en la superficie de las nanopartículas, tienden a formar una corona intersticial o corona proteica, con interacciones proteína-proteína y proteína-nanopartícula que las dota de una nueva identidad biológica (Mahmoudi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2021). No obstante, estas interacciones en la corona proteica pueden modificar la estructura y función de las proteínas adsorbidas, siendo esta modificación mayor con las AuNS que con otras morfologías de nanopartículas, como las nanoesferas o los nanorods (Wang *et al.*, 2020). En nuestro caso, se observó que cuando el dominio marcador scFvA33 aparecía unido a AuNS, el complejo AuNS-scFvA33 fue capaz de reconocer y unirse específicamente a células SW1222 (GPA33+). La unión observada con una baja concentración (10 nM) del complejo fue menor que la del dominio marcador solo (20% de células marcadas respecto al 85% para el caso de scFvA33 libre) debido posiblemente a impedimentos estéricos resultantes del tamaño de la nanopartícula; mientras que a concentraciones superiores, 100 nM y 1  $\mu$ M, el porcentaje de células marcadas tanto por AuNS-scFvA33 como por scFvA33 libre fue similar, disminuyendo nuevamente a partir de 5  $\mu$ M. Este último efecto podría explicarse por alteraciones celulares durante los procesos de centrifugación de la citometría de flujo, debido a la presencia de gran cantidad de nanopartículas.

En el caso de IMTXA33 $\alpha$ S unida a las AuNS formando el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, se observó no sólo que se mantenía la capacidad de unirse específicamente a las células SW1222, sino que el porcentaje de células marcadas fue mayor que para el caso de AuNS-scFvA33 y próximo a los resultados descritos con IMTXA33 $\alpha$ S libre (Carreras-Sangrà *et al.*, 2012). Esta diferencia observada entre los dos complejos podría ser debido a que, al presentar el dominio tóxico en el extremo C-terminal, el dominio marcador se encuentra más alejado de la AuNS, permitiendo una menor interacción proteína-complejo y la funcionalidad íntegra del dominio marcador, así como menores impedimentos estéricos. Además, el ensayo de actividad ribonucleolítica específica mostró que el dominio tóxico, constituido por la  $\alpha$ -sarcina, del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S mantenía su actividad ribonucleolítica específica, liberando el fragmento  $\alpha$  de los ribosomas, pese a estar flanqueado en su extremo C-terminal por AuNS, y en su extremo N-terminal por el dominio marcador scFvA33.

Los análisis de internación por TEM muestran que no se observó un incremento en la internación de nanoestrellas por estar estas unidas al dominio marcador scFvA33, o a la

## Discusión

inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S, respecto a la internación de nanoestrellas solas, con una estimación de en torno a 10 AuNS/célula. Este hecho, podría ser debido a la dificultad de delimitar las membranas celulares, necesario para contabilizar las nanopartículas / célula; o a que la endocitosis mediada por receptor tras la unión de scFvA33 desempeñe un papel secundario respecto a la endocitosis de las AuNS, favorecido en este caso por la mayor internación celular de las AuNS respecto a otras morfologías de nanopartículas (Pakravan *et al*, 2021). En condiciones fisiológicas, la endocitosis pasiva de las nanopartículas en los tumores se vería favorecida por la débil vasculatura tumoral, lo que permitiría la rápida acumulación y endocitosis de las nanopartículas, conocido como aumento del efecto de permeabilidad y retención (EPR, de Enhanced Permeation and Retention effect) (Bahrami *et al*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

La internación del complejo AuNS-scFvA33, y su visualización por microscopía de fluorescencia requirió la conjugación previa de scFvA33 con el fluoróforo Alexa Fluor 555, obteniéndose una DOL de 0,385, indicando la media del número de moléculas de fluoróforo por cada molécula de scFvA33. Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia muestran en primer lugar que las AuNS sin conjugar no mostraban ninguna fluorescencia, indicando que la fluorescencia observada era debida al fluoróforo. Además, se observó un incremento en la fluorescencia al tratar las células con AuNS-scFvA33 respecto a tratarlas únicamente con scFvA33, debido al uso de las AuNS como plataformas o vehículos con una elevada *ratio* superficie/volumen, permitiendo una mayor acumulación y liberación de agentes terapéuticos al interior de las células (Singh *et al*, 2018) y de esta manera, la reducción en la cantidad de agente terapéutico administrado si este está vehiculizado con nanopartículas de oro. No obstante, habría sido adecuado haber hecho un control con células GPA33-, o comparando la fluorescencia en el interior de las células de AuNS-scFvA33 con AuNS-BSA, con el fin de determinar si el incremento de fluorescencia era debido directamente a la endocitosis mediada por receptor, tras la unión del dominio marcador, como si se ha visto en algunos casos (Kirui *et al.*, 2010).

La toxicidad de las nanopartículas de oro sobre los sistemas biológicos es compleja, dependiendo del tamaño, forma, química de superficie, así como de la heterogeneidad intrínseca a las células y tejidos biológicos. Por ello, se estudió la toxicidad de las AuNS sobre las células SW1222 (GPA33+). Los resultados mostraron que las AuNS recubiertas con PEG no son tóxicas para las células, mientras que cuando están funcionalizadas con el grupo ANTA-Co<sup>II</sup> si son tóxicas, con viabilidades inferiores al 20% a partir de los 0,1 pM. Ello es coherente con lo descrito para la influencia de la carga en la toxicidad de las nanopartículas, siendo más tóxicas las partículas cargadas positivamente, que las partículas neutras o cargadas negativamente (Feng *et al.*, 2015). En concreto, los iones de

cobalto, necesarios para la unión del *tag* de histidinas de las distintas proteínas, han resultado ser tóxicos frente a diversos tipos celulares (Koga *et al.*, 2006; Kanaji *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2021), por lo que es preciso disminuir el tiempo de incubación y la dosis para alcanzar la ventana farmacológica en la que el cobalto no resulte tóxico, pero se observe la toxicidad debida al dominio tóxico de la inmunotoxina unida a la nanopartícula de oro.

Así, a las 48 horas, sobre las células SW1222, se obtuvo una  $IC_{50}$  de 0,04 pM para las AuNS, mientras que para el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, la  $IC_{50}$  fue de 0,02 pM. Queda por tanto de manifiesto el efecto tóxico de la  $\alpha$ -sarcina sobre las células SW1222 por encima de la toxicidad inespecífica de los iones cobalto de la superficie de las AuNS. Por otra parte, el complejo AuNS-scFvA33 es menos tóxico, con una  $IC_{50}$  de 0,07 pM, debido a la ausencia de dominio tóxico, y al hecho de que la unión del *tag* de histidinas al cobalto de la superficie de las AuNS disminuye la cantidad de cobalto libre en la superficie de las nanopartículas, reduciendo su toxicidad.

Cuando se estudió la toxicidad sobre células HeLa (GPA33-) se observó que las AuNS eran menos tóxicas que para las células SW1222, sin bajar del 60% de viabilidad a concentraciones de 1 pM, poniendo de manifiesto que la toxicidad de las nanopartículas, no sólo depende de su tamaño, forma, o superficie química, sino también del tipo celular que se trate. Además, ni el complejo AuNS-scFvA33, ni el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S resultó tóxico para las células, manteniéndose en viabilidades del 95% para todas las concentraciones. Ello indica que, pese a que en los estudios de microscopía no se ha observado un incremento en la internación de las nanopartículas debida a la unión del dominio marcador (scFvA33) al receptor (GPA33) en la superficie de las células SW1222, al estudiar la citotoxicidad, sí parece que la endocitosis mediada por receptor desempeñaría un papel importante en la internación de las nanopartículas, pues si la endocitosis de las células HeLa fuese debida solo a las nanopartículas, el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S tendría que haber sido internado de igual manera, y se apreciaría el efecto tóxico de la  $\alpha$ -sarcina.

Finalmente, cuando se estudió el efecto fototérmico de las AuNS *in vitro*, sobre las células SW1222, se observó que a las 24 horas, el complejo AuNS-scFvA33, internado en el interior de las células, no provocaban la muerte de las células, mientras que al aplicar el láser de luz infrarroja, el efecto fototérmico provocaba la emisión de calor por parte de las AuNS, viéndose reducida la viabilidad celular hasta el 80%, alcanzándose el 60 % con 1 pM de complejo. Cuando se aplicó luz infrarroja sobre las células tras haberlas incubado con el complejo AuNS libres, la viabilidad de estas se redujo, manteniéndose en torno al 80%. Esta disminución del 20% en la viabilidad a partir de 1 pM entre la incubación con

## Discusión

AuNS-scFvA33 frente a la incubación con AuNS y posterior irradiación infrarroja podría ser explicado por la unión específica de scFvA33 al antígeno de membrana GPA33, y la mayor endocitosis mediada por receptor del complejo AuNS-scFvA33, dando lugar a la internación de un mayor número de nanopartículas de oro y una consiguiente mayor muerte celular debido al efecto fototérmico. En otros estudios utilizando nanopartículas híbridas de oro y hierro y funcionalizándolas con scFvA33, se observó un mayor efecto fototérmico *in vitro* empleando mayores intensidades de láser, con viabilidades de 11% y 1% para intensidades de 31, 5 y 100 Wxcm<sup>-2</sup> respectivamente (Kirui *et al.*, 2010). No obstante, la mayor parte de la muerte a elevadas intensidades de láser era debida a procesos necróticos (Lim *et al.*, 2008; Kirui *et al.*, 2010); mientras que conjugando scFvA33 con el fotoabsorbente IR700, se producía una fototoxicidad del 5% para una concentración de 1 μM de scFvA33 (Wei *et al.*, 2020). Todo ello indica que es preciso optimizar las condiciones de nuestro ensayo, aumentando el tiempo, la intensidad de irradiación, o la concentración de complejo AuNS-scFvA33 con el fin de obtener una fototoxicidad específica más eficiente, así como estudiar el efecto combinado del efecto fototérmico y la toxicidad específica de la α-sarcina, al irradiar las células incubadas con el complejo AuNS-IMTXA33αS.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral apoyan la versatilidad del empleo de este tipo de nanopartículas de oro para el tratamiento terapéutico de diversas enfermedades. Así, a sus propiedades físicas, que permiten un efecto fototérmico, fotoacústico o la fototerapia dinámica, habría que añadir su elevada estabilidad, así como su elevada *ratio* superficie/volumen y la posibilidad de modificar químicamente su superficie (Plaza-GA *et al.*, 2019; Siddique & Chow, 2020). Gracias a ello, se han podido conjugar las nanopartículas y fotosensores con anticuerpos, para dirigirlos específicamente a tumores de próstata (Tan *et al.*, 2020), o tumores que expresan EGFR (Siddiqui *et al.*, 2019); con *nanobodies* frente a tumores que expresan HER2 (Van de Broek *et al.*, 2011; Deken *et al.*, 2020) e incluso se han funcionalizado nanorods para prevenir la amiloidogénesis que se produce en la enfermedad del Alzheimer o del Parkinson (Fernández *et al.*, 2016). En la presente Tesis Doctoral, hemos realizado una aproximación al efecto terapéutico combinado de nanopartículas de oro funcionalizadas con la inmunotoxina IMTXA33αS, para por un lado, aprovechar el papel de las nanopartículas como vehículos o plataformas biomédicas, permitiendo la acumulación y liberación de agentes terapéuticos en el tejido diana, disminuyendo la cantidad de dosis administrada y las posibles toxicidades inespecíficas; y por otro lado dirigir específicamente las nanopartículas a las células tumorales mediante el dominio marcador scFvA33, para localizar en el tumor el efecto de la fototoxicidad y la toxicidad de la α-sarcina.

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, correspondientes a los distintos objetivos, pueden resumirse en primer lugar en las siguientes conclusiones generales:

1. Se han producido y purificado a homogeneidad distintas variantes de inmunotoxinas basadas en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina que presentan diferentes especificidades y propiedades optimizadas para su potencial aplicación terapéutica frente a cáncer de colon.
2. En todos los casos, las inmunotoxinas purificadas presentaron un plegamiento acorde al de una proteína globular en disolución. Además, dicho plegamiento, así como la integridad molecular de las mismas se mantuvo estable tras incubación a 37°C a tiempos largos.
3. Nuevamente, en todos los diseños de inmunotoxinas incluidos en este trabajo, su caracterización funcional confirmó el mantenimiento de la actividad ribonucleolítica característica de la  $\alpha$ -sarcina presente en sus dominios tóxicos, así como la capacidad de reconocimiento y unión específica del dominio marcador a las células diana, a través de sus correspondientes antígenos tumorales.
4. Todas las inmunotoxinas objeto de estudio de esta Tesis Doctoral exhibieron una potente actividad citotóxica específica *in vitro*, con valores de IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar.
5. Por último, los resultados obtenidos demuestran el potencial terapéutico de las inmunotoxinas basadas en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina, así como de su versatilidad y fiabilidad para su incorporación en el diseño de inmunotoxinas con diferentes formatos y propiedades.

En cuanto a las conclusiones particulares de los diferentes diseños se destacan las siguientes:

6. La incorporación de la variante no inmunogénica de la  $\alpha$ -sarcina ( $\alpha$ SDI), una vez comprobado que se mantenían las características estructurales y funcionales de la ribotoxina original, como dominio tóxico en las inmunotoxinas IMTXA33 $\alpha$ SDI e IMTXA33furaSDI, ha permitido obtener diseños de inmunotoxinas no inmunogénicas, de acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización inmunológica, sin que se vea afectada la funcionalidad de cada uno de sus dominios, ni su eficacia citotóxica.
7. La caracterización *in vivo* de estas dos variantes no inmunogénicas mostró que ambas inmunotoxinas eran capaces de inhibir significativamente el crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados, así como de aumentar su supervivencia.
8. La incorporación del sitio de reconocimiento y corte por furina en la inmunotoxina IMTXA33furaSDI supuso un aumento muy importante de su eficacia antitumoral *in vitro* e *in vivo*, con un aumento de la supervivencia de los ratones xenoinjertados tratados, como

## Conclusiones

consecuencia de una mejor liberación de  $\alpha$ SDI y una traslocación más rápida del dominio tóxico al citosol de las células tumorales. De este modo se pone de manifiesto que la incorporación del sitio de reconocimiento y corte por furina mejora el procesamiento y la eficacia antitumoral de las inmunotoxinas.

**9.** En cuanto a las inmunotoxinas que incorporan en su dominio marcador el *nanobody* VHHEGFR, tanto en formato monomérico (VHHEGFR $\alpha$ S) como en formato trimérico (TriVHHEGFR $\alpha$ S), han mostrado una elevada citotoxicidad específica *in vitro*.

**10.** La caracterización *in vivo* de VHHEGFR $\alpha$ S mostró que esta nanoimmunotoxina era capaz de reducir el volumen de tumores colorrectales, así como de aumentar la supervivencia de ratones xenoinjertados. No obstante, tras la serie de administración de las dosis, se produjo una rápida recuperación del crecimiento tumoral posiblemente debido a la elevada tasa de filtración glomerular de esta nanoimmunotoxina.

**11.** La caracterización de TriVHHEGFR $\alpha$ S demostró no sólo su formato trimérico en disolución, sino que además este diseño presenta una mayor capacidad de unión y actividad citotóxica frente a células EGFR+ que la variante monomérica VHHEGFR $\alpha$ S. Así, la incorporación de un dominio de trimerización constituye una herramienta adecuada para el incremento del potencial terapéutico de las inmunotoxinas, quedando pendiente la caracterización de su eficacia antitumoral *in vivo*.

**12.** Por último, en cuanto al diseño de nuevas inmunotoxinas, se ha obtenido la primera inmunotoxina biespecífica en nuestro grupo de investigación, basada en la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina no inmunogénica y dirigida frente a dos marcadores de cáncer colorrectal. Los resultados han mostrado que esta inmunotoxina era capaz de unirse, y eliminar específicamente a células tanto EGFR+ como GPA33+, mostrando su biespecificidad a la hora de reconocer distintos antígenos tumorales. Además, el carácter no inmunogénico de su dominio tóxico, la  $\alpha$ SDI, proporciona a esta inmunotoxina una versatilidad y potencial terapéutico frente al cáncer de colon.

**13.** Finalmente, y en cuanto al último objetivo de este trabajo; se han sintetizado nanoestrellas de oro, AuNS, mediante un crecimiento mediado por semillas, y se han determinado las condiciones de unión óptimas con el dominio marcador scFvA33, o la inmunotoxina IMTXA33 $\alpha$ S, para constituir el complejo AuNS-scFvA33 o el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S, respectivamente.

**14.** Ambos complejos AuNS-proteína fueron capaces de unirse específicamente a las células GPA33+, mientras que el complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S además exhibió la actividad ribonucleolítica específica propia de la ribotoxina.

## Conclusiones

**15.** Los estudios de internación mostraron que tanto las AuNS, como el dominio marcador son efectivamente internadas en el interior de las células tumorales GPA33+, con un incremento de la internación de scFvA33 cuanto este se encuentra unido a las AuNS, mostrando su uso potencial como plataformas biomédicas o vehículos de administración de fármacos.

**16.** El estudio de fototoxicidad, debido al efecto fototérmico de las AuNS, mostró la potencial aplicación del complejo AuNS-scFvA33 como terapia combinada, incorporando el efecto de liberación de calor en la muerte celular de las células diana. No obstante, son precisos más estudios para optimizar las condiciones del ensayo, así como para analizar el efecto dual de la fototoxicidad, y la toxicidad debida a la  $\alpha$ -sarcina del complejo AuNS-IMTXA33 $\alpha$ S.

## Conclusiones

**BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

(**Abadeer & Murphy, 2016**) Abadeer NS & Murphy CJ (2016) Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles. *J Phys Chem C*. 120: 4691-4716.

(**Abulrob et al., 2005**) Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P & Stanimirovic D (2005) The blood-brain barrier transmigration of single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem*. 95: 1201-1214.

(**Ackerman et al., 2008**) Ackerman ME, Chalouni C, Schmidt MM, Raman VV, Ritter G, Old LJ, Mellman I & Wittrup KD (2008) A33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunol. Immunother*. 57: 1017-1027.

(**Ahamadi-Fesharaki et al., 2019**) Ahamadi-Fesharaki R, Fateh A, Vaziri F, Solgi G, Davar Siadat S, Mahboudi F & Rahimi-Jamnani F (2019) Single-chain variable fragment-based bispecific antibodies: hitting two targets with one sophisticated arrow *Molecular Therapy Oncolytics* 14 doi: 10.1016/j.omto.2019.02.004

(**Ahangarzadeh et al., 2020**) Ahangarzadeh S, Payandeh Z, Arezumand R, Shahzamani K, Yarian F & Alibakhshi A (2020) An update on antiviral antibody-based biopharmaceuticals. *Int Immunopharmacol*. 86 doi: 10.1016/j.intimp.2020.106760

(**Ahijado-Guzmán et al., 2020**) Ahijado-Guzmán R, Sánchez-Arribas N, Martínez-Negro M, González-Rubio G, Santiago-Varela M, Pardo M, Piñeiro A, López-Montero I, Junquera E & Guerrero-Martínez Á. (2020) Intercellular trafficking of gold nanostars in uveal melanoma cells for plasmonic photothermal therapy. *Nanomaterials* 10, 590 doi: 10.3390/nano10030590.

(**Ahmad et al., 2012**) Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB & Hamid M (2012) scFv antibody: principles and clinical application *Clinical and Developmental Immunology* 2012 doi: 10.1155/2012/980250

(**Akbari et al., 2017**) Akbari B, Farajnia S, Ahdi Khosroshahi S, Safari F, Yousefi M, Dariushnejad H & Rahbarnia L (2017) Immunotoxins in cancer therapy: review and update. *Int Rev Immunol* 36(4): 207-219.

(**Alewine et al., 2015**) Alewine C, Hassan R & Pastan I (2015). Advances in anticancer immunotoxin therapy. *Oncologist* 20 (2): 176-185.

(**Allegra et al., 2018**) Allegra A, Immao V, Gerace D, Vaddinelli D, Allegra AG & Musolino C (2018) Nanobodies and cancer: current status and new perspectives. *Cancer Investigation* doi: 10.1080/07357907.2018.1458858

(**Almqvist et al., 2006**) Almqvist Y, Steffen AC, Tolmachev V, Divgi CR & Sundin A (2006) In vitro and in vivo characterization of <sup>177</sup>Lu-huA33. A radioimmunoconjugate against colorectal cancer. *Nuclear Med Biol* 33: 991-998.

(**Andrew, 2017**) Andrew G (2017) La epopeya de Gilgamesh. Edición por Penguin Clásicos. Impreso en Madrid, España.

## Bibliografía

(Antignani *et al.*, 2020) Antignani A, Hei-Ho EC, Bilotta MT, Qiu R, Sarnvosky R & FitzGerald DJ (2020) Targeting receptors on cancer cells with protein toxins. *Biomolecules* 10, 1331 doi: 10.3390/biom10091331.

(Appelbaum & Bernstein, 2017) Appelbaum FR & Bernstein ID (2017) Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia *Blood* 130 (22) doi: 10.1182/blood-2017-09.

(Ardelt, 2013) Ardel W (2013) InmunoRNase fusions. In *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and challenges*, First Edition. Edited by Stefan R. Schmidt, John Wiley & Sons, Inc. Published by John Wiley & Sons, Inc. pp: 337-353

(Azemar *et al.*, 2000) Azemar M, Schmidt M, Arlt F, Kennel P, Brandt B, Papadimitriou A, Groner B & Wels W (2000) Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibits the *in vitro* growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression *in vivo*. *Int. J. Cancer* 86: 269-275.

(Bader *et al.*, 2008) Bader O, Krauke Y & Hube B (2008) Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology* 8: 116 doi: 10.1186/1471-2180/8/116.

(Bagheri *et al.*, 2018) Bagheri S, Yasemi M, Safaie-Qamsari E, Rashidiani J, Abkar M, Hassani M, Ali Mirhosseini SA & Kooshki H (2018) Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. Doi: 10.1080/21691401.2018.1430585.

(Bahrami *et al.*, 2017) Bahrami B, Hojjat-Farsangi M, Mohammadi H, Anvari E, Ghalamfarsa G, Yousefi M & Jadidi-Niaragh F (2017) Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol. Lett.* 190: 64-83.

(Bai *et al.*, 2021) Bai X, Wang J, Mu Q & Su G (2021) In vivo protein corona formation: characterizations, effects on engineered nanoparticles' biobehaviours, and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9: 646708 doi: 10.3389/fbioe.2021.646708

(Barnes, 1984) Barnes DW (1984) Growth Characteristics of A431 Human Epidermoid Carcinoma Cells in Serum-Free Medium: Inhibition by Epidermal Growth Factor. In: Acton R.T., Daniel Lynn J. (eds) *Eukaryotic Cell Cultures. Advances in Experimental Medicine and Biology* 172. Springer, New York, NY. Doi:10.1007/978-1-4615-9376-8\_4.

(Beauchemin & Arabzadeh, 2013) Beauchemin N & Arabzadeh A (2013) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 32: 643-671.

(Behar *et al.*, 2009) Behar G, Chames P, Teulon I, Cornillon A, Alshoukr F, Roquet F, Pugnère M, Teillaud JL, Gruaz-Guyon A, Pèlegri A & Baty D (2009). Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from non-specific cross-reacting antigen. *FEBS J.* 276: 3881-3893.

(**Behring & Kitasato, 1890**) Behring E & Kitasato S (1890) *Ueber das zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren*. *S. Dtsch Med. Wochenschr.* 49: 1113-1114.

(**Biteghe et al., 2020**) Biteghe FAN, Mungra N, Chalomie NET, Ndong J, Engohang-Ndong J, Vignaux G, Padayachee E, Naran K & Barth S (2021). Advances in epidermal growth factor specific immunotherapy: lessons to be learned from armed antibodies. *Oncotarget* 11 (38): 3531-3557.

(**Blanck et al., 1982**) Blanck A, Sugiyama RH & Dekker CA (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl-sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis: Use of aqueous isopropanol to remove detergent from gel. *Analytical Biochem.* 120: 267-275.

(**Blanco-Toribio et al., 2014**) Blanco-Toribio A, Lacadena J, Nuñez-Prado N, Álvarez-Cienfuegos A, Villate M, Compte M, Sanz L, Blanco FJ & Álvarez-Vallina L (2014) Efficient production of single-chain fragment variable-based N-terminal trimerbodies in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 13: 116 doi: 10.1186/s12934-014-0116-1

(**Bolognesi et al., 2016**) Bolognesi A, Bortolotti M, Maiello S, Batteli M & Polito L (2016) Ribosome-inactivating proteins from plants: A historical overview. *Molecules* 21, 1627

(**Brandhorst et al., 1992**) Brandhorst TT & Kenealy WR (1992) Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1429-1435

(**Bray et al., 2018**) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre LA & Jemal A (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424.

(**Bruell et al., 2005**) Bruell D, Bruns CJ, Yezhelyev M, Huhn M, Müller J, Ischenko I, Fischer R, Finnern R, Jauch K & Barth S (2005) Recombinant anti-EGFR immunotoxin 425(scFv)-ETA' demonstrates anti-tumor activity against disseminated human pancreatic cancer in nude mice. *Int. J. Mol. Med.* 15: 305-313.

(**Cai et al., 2019**) Cai D, Huang Z, Yu H, Wang X, Bai L, Tang G, Peng S, Li Y, Huang M, Cao G, Wang J & Luo Y (2019) Prognostic value of preoperative carcinoembryonic antigen/ tumor size in rectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 25: 4945-4958.

(**Campos-Olivas et al., 1996**) Campos-Olivas R, Bruix M, Santoro J, Martínez-del-Pozo A, Lacadena J, Gavilanes JG & Rico M (1996) <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. *Protein Sci* 5: 969-972

(**Carmichael et al., 2003**) Carmichael JA, Power BE, Garrett TPJ, Yazaki PJ, Shively JE, Raubischek AA, Wu AM, & Hudson PJ (2003). The three-dimensional structure of an engineered scFv T84.66 dimer or diabody in VL to VH linkage. *J. Mol. Biol.* 326: 341-351.

## Bibliografía

(**Carreras-Sangrà et al., 2012**) Carreras-Sangrà N, Tomé-Amat J, García-Ortega L, Batt CA, Oñaderra M, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Lacadena J (2012) Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Protein Eng. Des. Sel.* 25: 425-435.

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

(**Chames et al., 2009**) Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E & Baty D (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* 157 (2): 220-233.

(**Chanput et al., 2014**) Chanput W, Mes JJ & Wichers HJ (2014) THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* 23: 37-45.

(**Chaudhary et al., 1987**) Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Adhya S & Pastan I (1987) Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor type alpha and *Pseudomonas* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4538-4542.

(**Chen et al., 2013**) Chen H, Shao L, Li Q & Wang J (2013) Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev.* 42: 2679-2724.

(**Chen et al., 2016**) Chen YW, Su YL, Hu SH & Chen SY (2016) Functionalized graphene composites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 105: 190-204.

(**Chen et al., 2020**) Chen J, Zeng Z, Huang L, Luo S, Dong J, Zhou FH, Zhou K, Wang L & Kang L (2020) Photothermal therapy technology of metastatic colorectal cancer. *Am J Transl Res* 12 (7): 3089-3115.

(**Choi & Reiser, 1998**) Choi P & Reiser H (1998). IL-4: role in disease and regulation of production. *Clin. Exp. Immunol.* 113: 317-319.

(**Coppieters et al., 2006**) Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, Beirnaert E, Jonckheere H, Van de Wiele C, Staelens L, Hostens J, Revets H, Remaut E, Elewaut D & Rottiers P (2006) Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 54: 1856-1866

(**Corkum et al., 2015**) Corkum CP, Ings DP; Burgess C, Karwowska S, Kroll W & Michalak TI (2015) Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and standard density gradient. *Immunology* 16: 48 doi: 10.1186/s12865-015-0113-0.

- (Cuesta *et al.*, 2009) Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Sanz L, Bonet J, Compte M, Kremer L, Blanco FJ, 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 *et al.*, 2010) Cuesta AM, Sainz-Pastor M, Bonet J, Oliva B & Álvarez-Vallina L (2010) Multivalent antibodies: when design surpasses evolution *Trends in Biotechnology* 28: 355-362.
- (Damasceno *et al.*, 2009) Damasceno L, Lee F, Ritter G, Old L & BAtt C (2009) High-level expression of a phage display-derived scFv in *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol* 562: 225-236.
- (D'Avino *et al.*, 2014) D'Avino C, Paciello R, Riccio G, Coppola M, Laccetti P, Maurea N, Raines RT & De Lorenzo C (2014) Effects of a second-generation human anti-ErbB2 immunoRNase on trastuzumab-resistant tumors and cardiac cells. *Prot. Eng. Des. Sel.* 27: 83-88
- (de Buck *et al.*, 2013) de Buck S, Nolf J, De meyer T, Viridi V, de Wilde K, van Lerberger E, van Droogenbroeck B & Depicker A (2013) Fusion of an Fc chain to a VHH boosts the accumulation levels in *Arabidopsis* seeds *Plant Biotechnol. J.* 11: 1006-1016.
- (de Vos *et al.*, 2013) de Vos J, Devoogdt N, Lahoutte T & Muyldermans S (2013) Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical *in vivo* molecular imaging applications: Adjusting the bullet to its target. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 13: 1149-1160
- (Deken *et al.*, 2020) Deken MM, Kijanka MM, Hernández IB, Slooter MD, de Bruijn HS, van Diest PJ, van Bergen PMP, Lowik CWGM, Robinson DJ, Vahrmeijer AL & Oliveira S (2021). Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session. *Journal of Controlled Release* (2020) doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.030.
- (Dekker *et al.*, 2019) Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM & Wallace MB (2019) Colorectal cancer. *The Lancet* 394 (1467-1480).
- (Deng *et al.*, 2017) 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).
- (Dente & Cortese, 1987) Dente L & Cortese R (1987) pEMBL: A new family of single stranded plasmids for sequencing DNA. *Methods Enzymol.* 155: 111-119.
- (Deyeb & Lebedenko, 2008) Deyeb SM & Lebedenko EN (2008) Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *Bioessays* 30: 904-918.

## Bibliografía

(D'Hollander *et al.*, 2020) D'Hollander A, Velde GV, Jans H, Vanspauwen B, Vermeersch E, Jose J, Struys T, Stakenborg T, Lagae L & Himmelreich U (2020) Assessment of the theranostic potential of gold nanostars- amultimodal imaging and photothermal treatment study. *Nanomaterials* 11,2112 doi: 10.3390/nano10112112.

(Dieffenbach & Pastan, 2020) Dieffenbach M & Pastan I (2020) Mechanisms of resistance to immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A in cancer therapy. *Biomolecules* 10, 979 doi: 10.3390/biom10070979

(DiGiandomenico *et al.*, 2014) DiGiandomenico A, Keller AE, Gao C, Rainey GJ *et al.*, (2014) A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* *Sci Transl Med* 6.

(Douillard *et al.*, 2013) Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Blasinska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wiezorek J, Sidhu R & Patterson SD (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Eng J Med* 369: 1023-1034.

(Douillard *et al.*, 2014) Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Blasinska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Tian Y, Xu F & Sidhu R (2014) Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 25: 1346-1355.

(Dreaden *et al.*, 2012) Dreaden EC, Alkilany AM; Huang X, Murphy CJ & El-Sayed MA (2012) The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev* 41: 2740-2779.

(Duffy *et al.*, 2013) Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousová M, Holubec L & Sturgeon C (2013) Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update International. *Journal of Cancer* 134: 2513-2522.

(Eguino *et al.*, 2002) Eguino A, Fernández AI, Fernández B, García G & Pacual C (2002) Cáncer colorrectal: una guía práctica. Asociación Española Contra el Cáncer Madrid España.

(Ehrlich, 1911) Ehrlich P (1911) *Aus theorie und praxis der chemotherapie. Folia Serol* 1911: 697-714.

(El Hallal *et al.*, 2021) El Hallal R, Lyu N & Wang Y (2021). Effect of cetuximab-conjugated gold nanoparticles on the cytotoxicity and phenotypic evolution of colorectal cancer cells. *Molecules* 26 (3) 567. doi: 10.3390/molecules26030567

(El-Sayes *et al.*, 2021) El-Sayes N, Vito A & Mossman K (2021) Tumor heterogeneity: a great barrier in the age of cancer immunotherapy. *Cancers* 13, 806 doi: 10.3390/cancers13040806.

- (Elshiaty *et al.*, 2021) Elshiaty M, Schindler H & Christopoulos P (2021) Principles and current clinical landscape of multispecific antibodies against cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5632 doi: 10.3390/ijms22115632
- (Feng *et al.*, 2015) Feng ZV, Gunsolus IL, Qiu TA, Hurley KR, Nyberg LH, Frew H, Johnson KP, Vartanian AM, Lacob LM, Lohse SE, D Torelli M, Hamers RJ, Murphy CJ & Haynes C (2015) Impacts of gold nanoparticles charge and ligand type on surface binding and toxicity to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Chem. Sci.* 6: 5186-5196.
- (Fercher *et al.*, 2018) Fercher C, Keshvari S, AMcGuckin M & Barnard RT (2018) Evolution of the magic bullet: single chain antibody fragments for the targeted delivery of immunomodulatory proteins *Experimental Biology and Medicine* 243: 166-183
- (Fernández *et al.*, 2016) Fernández C, González-Rubio G, Langer J, Tardajos G, Liz-Marzán LM, Giraldo R & Guerrero-Martínez A (2016) Nucleation of amyloid oligomers by RepA-WH1-prionoid-functionalised gold nanorods. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55: 11237-11241.
- (Fleming & Ho, 2020) Fleming BD & Ho M (2020) Development of glypican-3 targeting immunotoxins for the treatment of liver cancer: an update. *Biomolecules* 10, 294 doi: 10.3390/biom10060934
- (Fuchs *et al.*, 2016) Fuchs H, Weng A & Gilibert Oriol R (2016) Augmenting the efficacy of immunotoxins and other targeted protein toxins by endosomal escape enhancers *Toxins* 8 (7): 176-185
- (Gainkam *et al.*, 2008) Gainkam LO, Huang L, Caveliers V, Keyartes M, Hernot S, Vaneycken I, Vanhove C, Revets H, De Baetselier P & Lahoutte P (2008) Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two 99mTc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J. Nucl. Med.* 49: 788-795.
- (Gan *et al.*, 2013) Gan HK, Cvrljevic AN & Johns TG (2013) The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII). Where wild things are altered. *FEBS J* 280:5330-5370.
- (García-Ortega *et al.*, 2002) García-Ortega L, Masip M, Mancheño JM; Oñaderra M, Lizarbe MA, García-Mayoral MF, Bruix M, Martínez-del-Pozo A & Gavilanes JG (2002) Deletion of the NH<sub>2</sub> terminal  $\beta$ -hairpin of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease. *J Biol. Chem.* 277: 18632-18639.
- (García-Ortega *et al.*, 2005) García-Ortega L, De Los Ríos V, Martínez-Ruiz A, Oñaderra M, Lacadena J, Martínez-del-Pozo A & Gavilanes JG (2005) Anomalous electrophoretic behaviour of a very acidic protein: ribonuclease U2. *Electrophoresis* 26: 3407-3413.
- (García-Ortega *et al.*, 2010) García-Ortega L, Álvarez-García E, Gavilanes JG, Martínez-del-Pozo A & Joseph S (2010) Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially affects EF-G y EF-Tu binding. *Nucleic Acid Res.* 38: 4108-4119.

## Bibliografía

(Gasset *et al.*, 1989) Gasset M, Martínez-del-Pozo Á, Oñaderra M & Gavilanes JG (1989). Study of the interaction between the antitumor protein  $\alpha$ -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.* 258 (1989): 569-575.

(Gasset *et al.*, 1991) Gasset M, Oñaderra M, Martínez-del-Pozo Á, Schiavo GP, Laynez J, Usobiaga P & Gavilanes JG (1991) Effect of the antitumor protein  $\alpha$ -sarcin on the thermotropic behaviour of acid phospholipid vesicles. *Biochim et Biophys Acta* 1068: 9-16.

(Gasset *et al.*, 1994) Gasset M, Mancheño JM, Lacadena J, Turnay J, Olmo N, Lizarbe MA, Martínez-del-Pozo A, Oñaderra M & Gavilanes JG (1994)  $\alpha$ -sarcin, a ribosome inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles. *Curr. Topics Pept. Protein Res.* 1: 117-122.

(Gherman *et al.*, 2020) Gherman A, Balacescu L, Gheorghe-Cetean S, Vlad C, Balacescu O, Irimie A & Lisencu C (2020) Current and new predictors for treatment response in metastatic colorectal cancer. The role of circulating miRNAs as biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 21 doi: 10.3390/ijms21062089

(Glare *et al.*, 2012) Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Kohl J, Marrone P, Morin L & Stewart A (2012) Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* 30: 250-258

(Glynne-Jones *et al.*, 2018) Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A & Arnold D (2018) Rectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. *Ann Oncol.* 29 (suppl 4): 22-40

(Goetsch *et al.*, 2013) Goetsch L, Haeuw JF, Beau-Larvor C, González A, Zanna L, Malissard M, Lepecquet AM, Robert A, Bailly C, Broussas M & Corvaia N (2013) A novel role for junctional adhesion molecule-A in tumor proliferation: Modulation by an anti-JAM-A monoclonal antibody. *Int J Cancer* 132: 1463-1474.

(Gotte *et al.*, 2019) Gotte G & Menegazzi M (2019) Biological activities of secretory RNases: Focus on their oligomerization to design antitumor drugs. *Frontiers in Immunology.* Doi: 10.3389/fimmu.2019.02626

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

(Greenberg *et al.*, 1995) Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC & Flajnik MF (1995) A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks *Nature* 374: 168-173.

- (Groth *et al.*, 2019) Groth C, van Groninjen LFJ, Matos TR, Bremmers ME, Preijers FWMB, Dolstra H, Reicherts C, Schaap NPM, van Hooren EHG, IntHout J, Masereeuw R, Netea MG, Levine JE, Morales G, Ferrara JL, Blijlevens NMA, van Oosterhout YVJM, Stelljes M & van der Velden WJFM (2019) Phase I/II trial of a combination of anti-CD3/CD7 immunotoxins for steroid refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 25 (4): 712-719.
- (Gruenberg, 2003) Gruenberg J (2003) Lipids in endocytic membrane transport and sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 382-388.
- (Hainfeld *et al.*, 2008) Hainfeld J, Dilmanian F, Slatkin D & Smilowitz H (2008) Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60, 977-985.
- (Halin *et al.*, 2003) Halin C, Gafner V, Villani ME, Borsi L, Berndt A, Kosmehl H, Zardi L & Neri D (2003) Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Cancer Research* 63: 3202-3210.
- (Hamers-Casterman *et al.*, 1993) Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N & Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
- (Hanahan, 1983) Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- (Hanahan & Weinberg, 2011) Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5): 646-674.
- (Harmsen & Haard, 2007) Harmsen MM & de Haard HJ (2007) Properties, production and applications of camelid single-domain antibody fragments *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 13-22.
- (Hassan *et al.*, 2004) Hassan R, Williams-Gould J, Watson T, Pai-Scherf L & Pastan I (2004) Pretreatment with rituximab does not inhibit the human immune response against the immunogenic protein LMB-1. *Clin Cancer Res.* 67: 1783-1792.
- (Hassan *et al.*, 2013) Hassan R, Miller Ac, Sharon E, Thomas A, Reynolds JC, Ling A, Kreitman RJ, Miettinen MM, Steinberg SM, Fowler DH & Pastan I (2013) Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression. *Sci Transl Med.* doi: 10.1126/scitranslmed.3006941.
- (Heath *et al.*, 1997) Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, Tu GF, Ji H, Whitehead RH, Groenen LC, Scott AM, Ritter G, Cohen L, Welt S, Old LJ, Nice EC & Burgess AW (1997). The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Biochemistry* 94: 469-474.

## Bibliografía

(Herrero-Galán *et al.*, 2012) Herrero-Galán E, García-Ortega L, Lacadena J, Martínez-del-Pozo A, Olmo N, Gavilanes JG & Oñaderra M (2012) A non-cytotoxic but ribonucleolytically specific ribotoxin variant: implication of tryptophan residues in the cytotoxicity of Hirsutellin A. *Biol. Chem.* 393: 449-456.

(Herrero-Galán *et al.*, 2013) Herrero-Galán E, García-Ortega L, Olombrada M, Lacadena J, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Oñaderra M (2013) Hirsutellin A: a paradigmatic example of the insecticidal function of fungal ribotoxins. *Insects* 4 (3): 339-356.

(Hoogenboom, 2005) Hoogenboom HR (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23: 1105-1116.

(Huang *et al.*, 2008) Huang L, Gai Kam LO, Caveliers V, Vanhove C, Keyaerts M, De Baetselier P, Bossuyt A, Revets H, & Lahoutte T (2008) Spect imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol. Imaging Bio.* 10: 167-175.

(Huang *et al.*, 2010) Huang X, Kang B, Qian W, Mackey MA, Chen PC, Oyelere AK, El-Sayed IH & El-Sayed MA (2010). Comparative study of photothermal ablation of cancer cells with nuclear-targeted or cytoplasm-targeted gold nanospheres: continuous wave or pulsed lasers. *J. Biomed. Opt.* 15 (5): 058002.

(Hurwitz *et al.*, 2004) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R & Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 350: 2335-2342.

(Huston *et al.*, 1991) Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, McCartney J, Warren F, Haber E & Oppermann H (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods in Enzymology* 203: 46-88

(Ibáñez-Pérez *et al.*, 2019) Ibáñez-Pérez R, Guerrero-Ochoa P, Al-Wasaby S, Navarro R, Tapia-Galisteo A, De Miguel D, Gonzalo O, Conde B, Martínez-Lostao L, Hurtado-Guerrero R, Sanz L & Anel A (2019) Anti-tumoral potential of a human granulysin, CEA targeted cytolytic immunotoxin. *Oncoimmunology* 8 (11) e1641392 doi: 10.1080/2162402X.2019.1641392

(Jaque *et al.*, 2014) Jaque D, Martínez Maestro L, Del Rosal B, Haro-González P, Benayas A, Plaza JL, Martín Rodríguez E & García Solé J (2014) Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* 6: 9494-9530.

(Jin *et al.*, 2021) Jin KT, Chen B, Liu Y-Y, Lan H-R. & Yan J-P (2021) Monoclonal antibodies and chimeric antigen receptor (CAR) T cells in the treatment of colorectal cancer *Cancer Cell Int* 21: 83.

(Johdi & Sukor, 2020) Johdi NA & Sukor NF (2020) Colorectal cancer immunotherapy: options and strategies. *Front Immunol.* 11: 1624. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01624.

- (**Jones et al., 2016**) Jones TD, Hearn AR, Holgate R, Kozub D, Fogg MH, Carr FJ, Baker MP, Lacadena J & Gehlsen KR (2016) A deimmunized form of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin, lacking CD4+ T cell epitopes and its use as an immunotoxin warhead. *Protein Engineering, Design & Selection* 29 (11): 531-540.
- (**Jonker et al., 2007**) Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au H-J, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C & Moore MJ (2007) Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 357: 2040-2048.
- (**Jordaan et al., 2018**) Jordaan S, Akinrinmade OA, Nachreiner T, Cremer C, Naran K, Chetty S & Barth S (2018) Updates in the development of immunoRNases for the selective killing of tumor cells. *Biomedicines* 6: 28 doi: 10.3390/biomedicines6010028.
- (**Jung et al., 2018**) Jung HS, Verwilt P, Sharma A, Shin J, Sessler JL & Kim JS (2018) Organic molecule-based photothermal agents: an expanding photothermal therapy universe. *Chem Soc Rev* 47: 2280-2297.
- (**Kanaji et al., 2014**) Kanaji A, Vbenosawemwinghayo O, Caicedo MS, Viridi AS, Sumner DR, Hallab NJ, Yoshiaki T & Sena K (2014) Cytotoxic effects of cobalt and nickel ions on osteocytes in vitro. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 9:91 doi: 10.1186/s13018-014-0091-6
- (**Kantarjian et al., 2017**) Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, Wei A, Dombret H, Foà R, Bassan R, Arslan Ö, Sanz MA, Bergeron J, Demirkan F, Lech-Maranda E, Rambaldi A, Thomas X, Horst H-A, Brüggemann M, Klapper W, Wood BL, Fleishman A, Nagorsen D, Holland C, Zimmerman Z & Topp MS (2017) Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia *N Engl J Med* 376: 836-847.
- (**Kao et al., 2001**) Kao R, Martínez-Ruiz A, Martínez-del-Pozo Á, Cramer R & Davies J (2001) Mitogillin and related fungal ribotoxins. *Methods Enzymol.* 341: 324-335.
- (**Karapetis et al., 2008**) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore Mj & Zalcborg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 359 (17): 1757-1765.
- (**Kavousipour et al., 2017**) Kavousipour S, Khademi F, Zamani M, Vakili B & Mokarram P (2017). Novel biotechnology approaches in colorectal cancer diagnosis and therapy. *Biotechnol. Lett.* Doi: 10.1007/s10529-017-2303-8.
- (**Kennedy et al., 2011**) Kennedy LC, Bickford LR, Lewinski NA, Coughlin AJ, Hu Y, Day ES, West JL & Drezek RA (2011) A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small* 7: 169-183.

## Bibliografía

- (**Kim et al., 2014**) Kim CS, Lee JB, Kim BS, Nam YH, Shin KS, Kim JW, Kim JE & Kwon GS (2014) A technique for the prevention of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* M130. *J Microbiol. Biotechnol.*24: 1-7.
- (**Kim et al., 2020**) Kim JS, Jun SJ & Kim YS (2020) Critical Issues in the development of immunotoxins for anticancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences* 109 (2020): 104-115.
- (**Kimiz-Gebologlu et al., 2018**) Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S & Biray-Avci C (2018) Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Molecular Biology Reports* 45: 2935-2940.
- (**Kinugasa et al., 1994**) Kinugasa T, Kuroki M, Yamanaka T, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H & Matsuoka Y (1994) Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel. *Int J Cancer* 58: 102-107
- (**Kirui et al., 2010**) Kirui D, Rey DA & Batt CA (2010) Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging. *Nanotechnology* 21 105105. Doi: 10.1088/0957-4484/21/10/105105.
- (**Klee, 2000**) Klee GG (2000) Human anti-mouse antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124 (6): 921-923.
- (**Koga et al., 2006**) Koga K, Kaji A, Hoiosaki K, Hata Y, Ogura T, Fujishita O & Shintani K (2006) Cytotoxic evaluation of cubic boron nitride in human origin cultured cells. *Toxicology in vitro* 20: 1370-1377.
- (**Kohler & Milstein, 1975**) Kohler G & Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495-497.
- (**Kuipers et al., 2016**) Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJH & Watanabe T (2016) Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers* 1:15065 doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
- (**Kumar et al., 2008**) Kumar P, Pastoriza-Santos I, Rodríguez-González B, Abajo F & Liz-Marzán L (2008) High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. *Nanotechnology* 19: 015606 doi: 10.1088/0957-4484/19/01/015606
- (**Kwong et al., 2018**) Kwong TNY, Wang X, Nakatsu G, Chow TC, Tipoe T, Dai RZW, Tsoi KKK, Wong MCS, Tse G, Chan MTV, Chan FKL, Ng SC, Wu JCY, Wu WKK, Yu J, Sung JJY & Wong SH (2018) Association between bacteremia from specific microbes and subsequent diagnosis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 155: 383-390
- (**Labianca et al., 2013**) Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A & Arnold D (2013). Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 (6): 64-72.

- (Lacadena *et al.*, 1994) Lacadena J, Martínez-del-Pozo Á, Barbero JL, Mancheño JM, Gasset M, Oñaderra M, López-Otín C, Ortega S, García J & Gavilanes JG (1994) Overproduction and purification of biologically active native fungal  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* 142: 147-151.
- (Lacadena, 1997) Lacadena J. Purificación y caracterización de diferentes formas mutantes de la citotoxina alfa-sarcina. Tesis Doctoral. Madrid, 1997.
- (Lacadena *et al.*, 1998) Lacadena J, Martínez-del-Pozo A, Lacadena V, Martínez-Ruiz A, Mancheño JM, Oñaderra M & Gavilanes JG (1998) The cytotoxin  $\alpha$ -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett* 424: 46-48.
- (Lacadena *et al.*, 2007) Lacadena J, Álvarez-García E, Carreras-Sangrà N, Herrero-Galán E, Alegre-Cebollada J, García-Ortega L, Oñaderra M, Gavilanes JG & Martínez del Pozo A (2007) Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol Rev* 31: 212-237
- (Lambert & Morris, 2017) Lambert JM & Morris CQ (2017) Antibody-drug conjugates (ADCs) for personalized treatment of solid tumors: a review *Adv Ther* 34: 1015-1035.
- (Lázaro-Gorines *et al.*, 2019) Lázaro-Gorines R, Ruiz-de-la-Herrán J, Navarro R, Sanz L, Álvarez-Vallina L, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Lacadena J (2019) A novel carcinoembryonic antigen (CEA)-targeted trimeric immunotoxin shows significantly enhanced antitumor activity in human colorectal cancer xenografts. *Scientific Reports* 9: 11680 doi: 10.1038/s41598-019-48285-z.
- (Lázaro-Gorines *et al.*, 2020) Lázaro-Gorines R, López-Rodríguez JC, Benedé S, González M, Mayorga C, Vogel L, Martínez-del-Pozo Á, Lacadena J & Villalba M (2020) Derp 1-based immunotoxin as potential tool for the treatment of dust mite respiratory allergy. *Sci. Rep.* 10 (1): 12255 doi: 10.1038/s41598-020-69166-w.
- (Lee *et al.*, 2005) Lee FT, Mountain AJ, Kelly MP, Hall C, Rigopoulos A, Johns TG, Smyth FE, Brechbiel MW, Nice EC, Burgess AW & Scott AM (2005). Enhanced efficacy of radioimmunotherapy with 90Y-CHX-A''-DTPA-hu3S193 by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling with EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478. *Clin Cancer Res* 11 (19): 7080-7086.
- (Levene *et al.*, 2005) Levene AP, Singh G & Palmieri C (2005) Therapeutic monoclonal antibodies in oncology *J R Soc Med* 98: 146-152
- (Li *et al.*, 2017) Li M, Liu ZS, Liu XL; Hui Q, Lu SY, Qu LL, Li YS, Zhou Y, Ren HL & Hu P (2017) Clinical targeting recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Oncotargets Ther.*10: 3645-3665.
- (Li *et al.*, 2018) Li J, Rao J & Pu K (2018) Recent progress on semiconducting polymer nanoparticles for molecular imaging and cancer phototherapy. *Biomaterials* 155: 217-235.

## Bibliografía

(Lim *et al.*, 2008) Lim YT *et al* (2008) Paramagnetic gold nanostructures for dual bioimaging and phototherapy of cancer cells. *Chem. Commun.* 40: 4930-4932.

(Liu *et al.*, 2012) Liu W, Onda M, Lee B, Kreitman RJ, Hassan R, Xiang L & Pastan I (2012) Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by identifying and silencing human b-cell epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 109: 11782-11787.

(Liu *et al.*, 2019) Liu Y, Bhattari P, Dai Z & Chen X (2019) Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. *Chem Soc Rev* 48 (7): 2053-2108.

(Lopez *et al.*, 2019) Lopez A, Harada K, Vasilakopoulou M, Shanbhag N & Ajani JA (2019) Targeting angiogenesis in colorectal carcinoma. *Drugs* 79: 63-74.

(López de Pablo *et al.*, 2014) López de Pablo CS, Olmedo JJS, Rosales AM, Hernández NR & Guerrero FP (2014) A method to obtain the thermal parameters and the photothermal transduction efficiency in an optical hyperthermia device based on laser irradiation of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 9: 441 doi: 10.1186/1556-276X-9-441.

(Mahmoudi *et al.*, 2011) Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, & Laurent S (2011) Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem. Rev.* 111: 5610-5637.

(Martínez-del-Pozo *et al.*, 1988) Martínez-del-Pozo Á, Gasset M, Oñaderra M & Gavilanes JG (1988). Conformational study of the antitumor protein  $\alpha$ Sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* 953 (1988): 280-288.

(Martínez-Ruiz *et al.*, 2001) Martínez-Ruiz A, García-Ortega L, Kao R, Lacadena J, Oñaderra M, Mancheño JM, Davies J, Martínez-del-Pozo Á & Gavilanes JG (2001) RNase U2 and  $\alpha$ -sarcin: a study of relationships. *Methods Enzymol* 341: 335-351

(Mata-Espinosa *et al.*, 2008) Mata-Espinosa D & Hernández-Pando R (2008) Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Rev. Invest. Clin.* 60 (50): 421-431.

(Mazor *et al.*, 2014) Mazor R, Eberle JA, Hu X, Vassall AN, Onda M, Beers R, Lee EC, Kreitman RJ, Lee B, Baker D, King C, Hassan R, Benhar I & Pastan I (2014) Recombinant immunotoxin for cancer treatment with low immunogenicity by identification and silencing of human T-cell epitopes. *PNAS* 111 (23): 8571-8576.

(Mazor *et al.*, 2016) Mazor R, Onda M, Park D, Addissie S, Xiang L, Zhang J, Hassan R & Pastan I (2016) Dual B-and T-cell de-immunization of recombinant immunotoxin targeting mesothelin with high cytotoxic activity *Oncotarget* 7: 29916-29926.

(Mazor *et al.*, 2017) Mazor R, Crown D, Addissie S, Jang Y, Kaplan G & Pastan I (2017) Elimination of murin and human T-cell epitopes in recombinant immunotoxin eliminates neutralizing and anti-drug antibodies in vivo. *Cell Mol. Immunol.* 14: 432-442.

- (**Mazor et al., 2018**) Mazor R, King EM & Pastan I (2018) Strategies to reduce the immunogenicity of recombinant immunotoxins. *The American Journal of Pathology* 188 (8) doi: 10.1016/j.ajpath.2018.04.016.
- (**Mazor & Pastan, 2020**) Mazor R & Pastan I (2020) Immunogenicity of immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: causes, consequences, and mitigation. *Frontiers in Immunology*. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01261.
- (**Melancon et al., 2009**) Melancon MP, Lu W & Li C (2009) Gold-based magneto/optical nanostructures: challenges for in vivo applications in cancer diagnostics and therapy. *MRS Bulletin* 34: 415-421.
- (**Mellman et al., 2011**) Mellman I, Coukos G & Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-489.
- (**Mikkelsen et al., 2019**) Mikkelsen K, Lykke Harwood S, Compte M, Merino N, Molgaard K, Lykkemark S, Alvarez-Mendez A, Blanco FJ & Álvarez-Vallina L (2019) Carcynoembryonic antigen (CEA)-specific 4-1BB.Costimulation induced by CEA-targeted 4-1BB-Agonistic trimerbodies. *Frontiers in Immunology* 10, 1791
- (**Molineux 2002**) Molineux G (2002) Pegylation: Engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. *Cancer Treat. Rev.*28: 13-16.
- (**Moolten & Cooperband, 1970**) Moolten FL & Cooperband SR (1970) Selective destruction of target cells by diptheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science* 169: 68-70.
- (**Moolten et al., 1976**) Moolten F, Zajdel S & Cooperband S (1976) Immunotherapy of experimental animals tumors with antitumor antibodies conjugated to diptheria toxin or ricin *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 277: 690-699.
- (**Moradi et al., 2020**) Moradi A, Pourseif MM, Jafari B & Parvizpour S (2020) Nanobody-based therapeutics against colorectal cancer: precision therapies based on the personal mutanome profile and tumor neoantigens *Pharmacological Research* 156 doi: 10.1016/j.phrs.2020104790
- (**Mungra et al., 2019**) Mungra N, Jordaan S, Hlongwane P, Naran K, Chetty S & Barth S (2019) Targeted human cytolytic fusion proteins at the cutting edge: harnessing the apoptosis-inducing properties of human enzymes for the selective elimination of tumor cells. *Oncotarget* 10 (8): 897-915.
- (**Murer et al., 2020**) Murer P, Plüss L & Neri D (2020) A novel human monoclonal antibody specific to the A33 glycoprotein recognizes colorectal cancer and inhibits metastasis. *MABS* 12 (1) e1714371 doi: 10.1080/19420862.2020.1714371.
- (**Muruganandam et al., 2002**) Muruganandam A, Tanha J, Narang S & Stanimirovic D (2002) Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-barrier endothelium. *FASEB-J* 16: 240-242

## Bibliografía

(Nassar & Blanpain, 2016) Nassar D & Blanpain C (2016) Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic applications. *Ann Rev Pathol* 11: 47-76.

(Niesen *et al.*, 2015) Niesen J, Stein C, Brehm H, Hehmann-Titt G, Fendel R, Melmer G, Fischer R & Barth S (2015) Novel EGFR-specific immunotoxins based on panitumumab and cetuximab show in vitro and ex vivo activity against different tumor entities. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141:2079-2095.

(Nisonoff & Rivers, 1961) Nisonoff A & Rivers MM (1961) Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 460-462.

(Nomura *et al.*, 1998) Nomura T, Koreeda N, Yamashita F, Takakura Y & Hashida M (1988) Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors. *Pharm. Res.* 15: 128-132.

(Olmo *et al.*, 2001) Olmo N, Turnay J, González de Buitrago G, López de Silanes I, Gavilanes JG & Lizarbe MA (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *European Journal of Biochemistry* 268: 2113-2123.

(Olombrada *et al.*, 2013) Olombrada M, Herrero-Galán E, Tello D, Oñaderra M, Gavilanes JG, Martínez-del-Pozo A & García-Ortega L (2013) Fungal extracellular ribotoxins as insecticidal agents. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 39-46.

(Olombrada *et al.*, 2014) Olombrada M, Martínez-del-Pozo A, Medina P, Budia F, Gavilanes JG & García-Ortega L (2014) Fungal ribotoxins: natural protein-based weapons against insects. *Toxicon* 83: 69-74.

(Olombrada *et al.*, 2017a) Olombrada M, Lázaro-Gorines R, López-Rodríguez JC, Martínez-del-Pozo A, Oñaderra M, Maestro-López M, Lacadena J, Gavilanes JG & García-Ortega L (2017) Fungal ribotoxins: a review of potential biotechnological applications. *Toxins*. doi: 10.3390/toxins9020071

(Olombrada *et al.*, 2017b) Olombrada M, Medina P, Budia F, Gavilanes JG, Martínez-del-Pozo A & García-Ortega L (2017) Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. *Biol. Chem.* 398: 135-142

(Olson & Goerner, 1965) Olson BH & Goerner GL (1965)  $\alpha$ -Sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. *Appl Microbiol* 13: 314-321

(Olson *et al.*, 1965) Olson BH, Jennings JC, Roga V, Junek AJ & Schuurmans DM (1965)  $\alpha$ -Sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Appl Microbiol* 13: 322-326.

- (Onda *et al.*, 2006) Onda M, Nagata S, Fitzgerald DJ, Beers R, Fisher RJ, Vincent JJ, Lee B, Nakamura M, Hwang J, Kreitman RJ, Hassan R & Pastan I (2006) Characterization of the B-cell epitopes associated with a truncated form of *Pseudomonas* exotoxin (PE38) used to make immunotoxins for the treatment of cancer patients. *J. Immunol.* 177: 8822-8834.
- (Oñaderra *et al.*, 1993) Oñaderra M, Mancheño JM, Gasset M, Lacadena J, Schiavo G, Martínez-del-Pozo A & Gavilanes JG (1993) Translocation of  $\alpha$ -sarcin across the lipid bilayer of asolectin vesicles. *Biochem J* 295: 221-225.
- (Osumi *et al.*, 2015) Osumi H, Shinozaki E, Osako M, Kawazoe Y, Oba M, Misaka T, Goto T, Kamo H, Suenaga M & Kumekawa Y (2015) Cetuximab treatment for metastatic colorectal cancer with KRAS p.G13D mutations improves progression-free survival. *Mol. Clin. Oncol.* 3, 1053-1057.
- (Overman *et al.*, 2017) Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, Goldberg MV, Cao ZA, Ledine J-M, Maglinte GA, Kopetz S & André T (2017) Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18: 1182-1191.
- (Pakravan *et al.*, 2021) Pakravan A, Salehi R & Mahkam M (2021) Comparison study on the effect of gold nanoparticles shape in the forms of star, hallow, cage, rods, and Si-Au and Fe-Au core-shell on photothermal cancer treatment. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 33. 102144 doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102144
- (Palomares *et al.*, 2019) Palomares F, Ramos-Soriano J, Gomez F, Mascaraque A, Bogas G, Perkins JR, Gonzalez M, Torres MJ; Diaz-Perales A, Rojo J & Mayorga C (2019) Pru p 3- glycodendropeptides based on mannoses promote changes in the immunological properties of dendritic and T-cells from LTP-allergic patients. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, 1900553 doi: 10.1002/mnfr.201900553.
- (Pandur *et al.*, 2021) Pandur E, Tamási K, Pap R, Jánosa G & Sipos K (2021). Distinct effects of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cell wall component-induced inflammation on the iron metabolism of THP-1 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (3): 1497 doi: 10.3390/ijms22031497.
- (Panjideh *et al.*, 2008) Panjideh H, Coelho VC, Dervede J; Bachran C, Förster G, Franke J, Fasold P, Fuchs H, Thiel E & Deckert PM (2008). Biodistribution and efficacy of <sup>131</sup>I A33scFvCDy, a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer. *Int J Oncol* 32: 925-930
- (Park *et al.*, 2008) Park H, Yang J, Seo S, Kim K, Suh J, Kim D, Haam S & Yoo K-H (2008) Multifunctional nanoparticles for photothermally controlled drug delivery and magnetic resonance imaging enhancement. *Small* 4 (2): 192-196.
- (Pasqualini, 2012) Pasqualini DC. (2012) Oncología experimental. Volviendo a Boveri y Virchow. *Medicina* 72: 530-532.

## Bibliografía

(**Pastan et al., 2007**) Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ & Kreitman RJ (2007) Immunotoxin treatment of cancer *Annu Rev Med* 58: 221-237.

(**Peng et al., 2002**) Peng CY, Zhou X & Kaya HK (2002) Virulence and site of infection of the fungus, *Hirsutella thompsonii*, to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 81: 185-195.

(**Pereira-Fantini et al., 2010**). Pereira-Fantini PM, Judd LM; Kalantzis A, Peterson A, Ernst M, Heath JK & Giraud AS (2010) A33 antigen-deficient mice have defective colonic mucosal repair. *Inflamm Bowel Dis* 16: 604-612.

(**Pérez-Cañadillas et al., 2000**) Pérez-Cañadillas JM, Santoro J, Campos-Olivas R, Lacadena J, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG, Rico M & Bruix M (2000) The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. *J Mol Biol* 299: 1061-1073.

(**Pham & Mesplède, 2018**) Pham HT & Mesplède T (2018) The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies *Drug Context* 7, 212522

(**Pirie et al., 2013**) Pirie CM, Liu DV & Wittrup KD (2013) Targeted cytolysins synergistically potentiate cytoplasmic delivery of gelonin immunotoxin. *Mol Cancer Ther.* 12 (9): 1774-1782

(**Pishvaian et al., 2016**) Pishvaian M, Morse MA, McDevitt J, Norton JD, Ren S, Robbie GJ, Ryan PC, Soukharev S, Bao H & Denlinger CS (2016) Phase I dose escalation study of MEDI-565, a bispecific T cell engager that targets human carcinoembryonic antigen, in patients with advanced gastrointestinal adenocarcinomas. *Clin. Colorectal Cancer* 15: 345-351.

(**Plaza-GA et al., 2019**) Plaza-GA I, Manzaneda-González V, Kisovec M, Almendro-Vedia V, Muñoz-Úbeda M, Anderluh G, Guerrero-Martínez A, Natale P & López-Montero I (2019) pH-triggered endosomal escape of pore-forming Listeriolysin O toxin-coated gold nanoparticles. *J. Nanobiotechnol.* 17: 108 doi: 10.1186/s12951-019-0543-6.

(**Polito et al., 2019**) Polito L, Bortolotti M, Battelli MG, Calafato G & Bolognesi A (2019) Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin. *Toxins* 11, 324 doi: 10.3390/toxins11060324

(**Prali et al., 1996**) Prali F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Löning T & Wagener C (1996) CD66a, an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J. Histochem.* 44: 35-41.

(**Rajewsky, 2019**) Rajewsky K (2019) The advent and rise of monoclonal antibodies *Nature* 575: 47-49.

- (**Rathore & Batra, 1996**) Rathore D & Batra JK (1996) Generation of active immunotoxin containing recombinant restrictocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 58-63.
- (**Rathore et al., 1997**) Rathore D, Nayak SK & Batra JK (1997) Overproduction of fungal ribotoxin  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*: generation of an active immunotoxin. *Gene* 190 (1): 31-35.
- (**Rios et al., 2019**) Rios X, Compte M, Gómez-Vallejo V, Cossío U, Baz Z, Morcillo MA, 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. *Mol. Pharmaceutics* 16: 1025-1035.
- (**Ritter et al., 2001**) Ritter G, Cohen LS, Williams CJR, Richards EC, Old LJ & Welt S (2001) Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.* 61: 6851-6859.
- (**Rockwell et al., 2002**) Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T & fuller RS (2002) Precursor processing by Kex2/furin proteases. *Chem. Rev.* 102: 4525-4548.
- (**Roga et al., 1971**) Roga V, Hedeman LP & Olson BH (1971) Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms. *Cancer Chemother. Rep.* 55 (2): 101-113.
- (**Román, 2008**) Román MT. (2008) Sabidurías Orientales de la Antigüedad. Alianza Editorial, Madrid, España.
- (**Roovers et al., 2007**) Roovers RC, Laeremans T, Huang L, de Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, de Haard HJ & van Bergen en Henegouwen PMP (2007) Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumor growth by antagonistic anti EGFR nanobodies. *Cancer Immunol Immunother.* 56 (3): 303-317
- (**Rosenberg & Sauna, 2018**) Rosenberg AS & Sauna ZE (2018) Immunogenicity assessment during the development of protein therapeutics. *J. Pharm. Pharmacol.* 70: 584-594
- (**Roskoski, 2014**) Roskoski R (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharm. Res.* 79: 34-74.
- (**Roth-Walter et al., 2014**) Roth-Walter F, Moskovskich A, Gomez-Casado C, Diaz-Perales A, Oida K, Singer J, Kinaciyan T, Fuchs HC & Jensen-Jarolim E (2014) Immune suppressive effect of cinnamaldehyde due to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in immune cells: implications in cancer. *PLOS ONE* 9 (10) e108402.
- (**Ruiz-de-la-Herrán et al., 2019**) Ruiz-de-la-Herrán J, Tomé-Amat J, Lázaro-Gorines R, Gavilanes JG & Lacadena J (2019) Inclusion of a furin cleavage site enhances antitumor efficacy against colorectal cancer cells of ribotoxin  $\alpha$ -sarcin-or RNase T1-based immunotoxins. *Toxins* 11 (593) doi: 10.3390/toxins11100593.

## Bibliografía

- (Ruiz-de-la-Herrán, 2021) Ruiz-de-la-Herrán J. Diseño de variantes optimizadas de inmunotoxinas basadas en ribonucleasas fúngicas: efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Tesis Doctoral, Madrid. 2020.
- (Rust *et al.*, 2017) Rust A, Partridge LJ, Davletov B & Hautberg GM (2017) The use of plant-derived ribosome inactivating proteins in immunotoxin development: past, present and future generations *Toxins* 9, 344 doi: 10.3390/toxins9110344
- (Sadraeian *et al.*, 2017) Sadraeian M, Guimaraes FEG, Araujo APU, Worthylake DK, LeCour LJ & Pincus SH. (2017) Selective cytotoxicity of a novel immunotoxin based on pulchellin A chain for cells expressing HIV envelope. *Sci Rep* 7 (1): 7579
- (Sagaert *et al.*, 2018) Sagaert X, Vanstapel A & Verbeek S (2018) Tumor heterogeneity in colorectal cancer: what do we know so far? *Pathobiology* doi: 10.1159/000486721.
- (Sambrook *et al.*, 1989) Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Segunda Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. N. York
- (Saraiva *et al.*, 2019) Saraiva M, Vieira P & O'Garra A (2019) Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*. doi: 10.1084/jem.20190418
- (Sauna *et al.*, 2018) Sauna ZE, Lagassé D, Pedras-Vasconcelos J, Golding B & Rosenberg AS (2018) Evaluating and mitigating the immunogenicity of therapeutic proteins *Trends in Biotechnology* 36 (10) doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.008
- (Saxena *et al.*, 2015) Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T & Hamad ARA (2015) Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 74 (1): 27-34.
- (Schmidt *et al.*, 2008) Schmidt MM, Thurber GM & Wittrup KD (2008) kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency and stability. *Cancer Immunol. Immunother.* 57: 1879-1890.
- (Schmitz *et al.*, 2013) Schmitz KR, Bagchi A, Roovers RC, van Bergen en Henegouwen PMP & Ferguson KM (2013) Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Structure* 21 (7): 1214-1224.
- (Schmohl *et al.*, 2015) Schmohl JU, Todhunter D, Oh S & Vallera DA (2015) Mutagenic deimmunization of diphtheria toxin for use in biologic drug development. *Toxins* 7: 4067-4082.
- (Schmohl *et al.*, 2018) Schmohl JU, Todhunter D, Taras E, Bachanova V & Vallera DA (2018) Development of a deimmunized bispecific immunotoxin dDT2219 against B-cell malignancies. *Toxins* 10, 32 doi: 10.3390/toxins10010032.

(**Scott et al., 2005**) Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon JS, Hannah A, Chong G, U P, Papenfuss A, Rigopoulos A, Sturrock S, Murphy R, Wirth V, Murone C, Smyth FE, Knight S, Welt S, Ritter G, Richards E, Nice EC, Burgess AW & Old LJ (2005) A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. *Clin Cancer Res.* 11 (13): 4810-4817

(**Siddique & Chow, 2020**) Siddique S & Chow J, (2020) Application of nanomaterials in biomedical imaging and cancer therapy. *Nanomaterials* 10, 1700 doi:10.3390/nano10091700.

(**Siddiqui et al., 2019**) Siddiqui MR, Railkar R, Sanford T, Crooks DR, Eckhaus MA, Haines D, Choyke PL, Kobayashi H & Agarwal PK (2019) Targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expressing bladder cancer using combination photoimmunotherapy (PIT). *Scientific Reports* 9: 2084 doi: 10.1038/s41598-019-38575-x.

(**Simon & FitzGerald, 2016**) Simon N, FitzGerald D (2016) Immunotoxin therapies for the treatment of epidermal growth factor receptor-dependent cancers. *Toxins* 8, 137 doi: 10.3390/toxins8050137.

(**Simpson & Caballero, 2014**) Simpson A & Caballero O (2014) Monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *BMC Proc* 8: O6 doi: 10.1186/1753-6561-8-S4-O6.

(**Singh et al., 2018**) Singh P, Pandit S, Mokkalapati VRSS, Garg A, Ravikumar V & Mijakovic I (2018). Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *Int. J. Mo. Sci.* 19, 1979 doi: 10.3390/ijms19071979.

(**Si-Tahar et al., 2009**) Si-Tahar M, Touqui L & Chignard M (2009) Innate immunity and inflammation- two faces of the same anti-infectious reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 156 (2): 194-198.

(**Smyth et al., 2001**) Smyth MJ, Godfrey DI, & Trapani JA (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2 (4): 293-299.

(**Sørensen et al., 2016**) Sørensen CG, Karlsson WK, Pommergaard H, Burcharth J & Rosenberg J (2016) The diagnostic accuracy of carcinoembryonic antigen to detect colorectal cancer recurrence- A systematic review. *Int. J. of Surg.* 25: 134-144

(**Soudabeh et al., 2017**) Soudabeh K, Fathemeh K, Mozhdeh Z, Bahareh V & Pooneh M (2017) Novel biotechnology approaches in colorectal cancer diagnosis and therapy *Biotechnol Lett Springer* doi: 10.1007/s10529-017-2302-8.

(**Steven et al., 2011**) Steven I & Hajdu MD (2011) A note from history: landmarks in history of cancer, part 1 *Cancer* 1097-1102.

## Bibliografía

(Sun *et al.*, 2014) Sun TM, Wang YC, Wang F, Du JZ, Mao CQ, Sun CY, Tang RZ, Liu Y, Zhu J & Zhu YH (2014). Cancer stem cell therapy using doxorubicin conjugated to gold nanoparticles via hydrazone bonds. *Biomaterials* 35: 836-845.

(Sun *et al.*, 2020) Sun J, Shigemi H, Cao M, Qin E, Tang J, Shen J & Iwasaki H (2020). Minocycline induces autophagy and inhibits cell proliferation in LPS-stimulated THP-1 cells. *Biomed. Res.Int.:* 5459209. Doi: 10.1155/2020/5459209.

(Sun *et al.*, 2021) Sun S, Ding Z, Yang X, Zhao X, Zhao M, Gao L, Chen Q, Xie S, Liu A, Yin S, Xu Z & Lu X (2021) Nanobody: a small antibody with big implications for tumor therapeutic strategy. *International Journal of Nanomedicine* 16: 2337-2356

(Sung *et al.*, 2021) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A & Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209-249.

(Suzuki *et al.*, 2015). Suzuki M, Kato C & Kato A (2015) Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. *Journal of Toxicology Pathology* 28 (3): 133-139.

(Tan *et al.*, 2020) Tan H, Hou N, Liu Y, Liu B, Cao W, Zheng D, Li W, Liu Y, Xu B, Wang Z & Cui D (2020) CD133 antibody targeted delivery of gold nanostars loading IR820 and docetaxel for multimodal imaging and near-infrared photodynamic/photothermal/chemotherapy against castration resistant prostate cancer. *Nanomedicine: NBM2020*; 27:102192 doi: 10.1016/j.nano.2020.102192.

(Tang *et al.*, 2012) Tang PA, Cohen SJ, Kollmannsberger C, Bjarnason G, Virik K, Mackenzie MJ, Lourenco L, Wang L, Chen A & Moore MJ (2012). Phase II clinical and pharmacokinetic study of aflibercept in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 18: 6023-6031.

(Tang *et al.*, 2018) Tang Y, Yang T, Wang Q, Lv X, Song X, Ke H, Guo Z, Huang X, Hu J, Li Z, Yang P, Yang X & Chen H (2018) Albumin-coordinated assembly of clearable platinum nanodots for photo-induced cancer theranostics. *Biomaterials* 154: 248-260.

(Tassignon *et al.*, 2005) Tassignon J, Burny W, Dahmani S, Zhou L, Stordeur P, Byl B & De Groote D (2005) Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN- $\gamma$  production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* 305 (2005): 188-198.

(Thanikachalam & Khan, 2019) Thanikachalam K & Khan G (2019) Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* 11 (164) doi: 10.3390/nu11010164.

(Thomas, 2002) Thomas G (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (10): 753-766.

(Tiller & Tessier, 2015) Tiller KE & Tessier PM (2015) Advances in antibody design *Annu Rev Biomed Eng* 17: 191-216.

- (Tintelnot *et al.*, 2019) Tintelnot J & Stein A (2019) Immunotherapy in colorectal cancer: Available clinical evidence, challenges, and novel approaches. *World J Gastroenterol* 25 (29): 3920-3928.
- (Tomé-Amat *et al.*, 2012) Tomé-Amat J, Menéndez-Méndez A, García-Ortega L, Batt CA, Oñaderra M, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Lacadena J (2012). Production and characterization of scFvA33T1, an immunoRNase targeting colon cancer cells. *FEBS J.* 279: 3022-3032.
- (Tomé-Amat *et al.*, 2015a) Tomé-Amat J, Ruiz-de-la-Herrán J, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Lacadena J (2015)  $\alpha$ -sarcin and RNase T1 based immunoconjugates: the role of intracellular trafficking in cytotoxic efficiency. *FEBS J.* 282 (4): 673-684
- (Tomé-Amat *et al.*, 2015b) Tomé-Amat J, Herrero-Galán E, Oñaderra M, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Lacadena J (2015) Preparation of an engineered safer immunotoxin against colon carcinoma based on the ribotoxin hirsutellin A. *FEBS J.* 282: 2131-2141
- (Tomé-Amat *et al.*, 2015c) Tomé-Amat J, Olombrada M, Ruiz-de-la-Herrán J, Pérez-Gómez E, Andradas C, Sánchez C, Martínez L, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG & Lacadena J (2015) Efficient in vivo antitumor effect of an immunotoxin based on ribotoxin  $\alpha$ -sarcin *in nude* mice bearing human colorectal cancer xenografts. *SpringerPlus* 4: 168 doi: 10.1186/s40064-015-0943-5
- (Tordesillas *et al.*, 2008) Tordesillas L, Cuesta-Herranz J, Gonzalez-Muñoz M, Pacios LF, Compès E, García-Carrasco B, Sanchez-Mongue R, Salcedo G & Diaz-Perales A (2008) T-cell epitopes of the major peach allergen, Pru p 3: Identification and differential T-cell response of peach-allergic and non-allergic subjects. *Molecular Immunology* 46: 722-728.
- (Tortorella *et al.*, 2012) Tortorella LL; Pipalia NH, Mukherjee S, Pastan I, Fitzgerald D & Maxfield FR (2012) Efficiency of immunotoxin cytotoxicity is modulated by the intracellular itinerary. *PLOS ONE* 7 (10) e47320.
- (Tran *et al.*, 2011) Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O & Desai J (2011) Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 117, 4623-4632.
- (Tran *et al.*, 2017) Tran AM, Nguyen TT, Nguyen CT, Huynh-Thi XM, Nguyen CT, Trinh MT, Tran LT, Cartwright SP, Bill RM & Tran-Van H (2017). *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study of the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC Research Notes* 10(1):119-127.
- (Trapani & Darcy, 2017) Trapani JA & Darcy PK (2017) Immunotherapy of cancer. *Focus AFP* 46 (4)

## Bibliografía

(Tsumoto *et al.*, 2019) Tsumoto K, Isozaki Y, Yagami H & Tomita M (2019) Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy* 11 (2): 119-127.

(Tsutsumi *et al.*, 2000) Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ & Pastan I (2000) Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-tac(fv)-pe38 (Imb-2) improves antitumour activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8548-8553

(Turano *et al.*, 2019) Turano M, Delrio P, Rega D, Cammarota F, Polverino A, Duraturo F, Izzo P & De Rosa M (2019) Promising colorectal cancer biomarkers for precision prevention and therapy. *Cancers* doi: 10.3390/cancers 11121932.

(Vallera *et al.*, 2010) Vallera DA, Seunguk Oh, Chen H, Shu Y & Frankel AE (2010) Bioengineering a unique deimmunized bispecific targeted toxin that simultaneously recognizes human CD22 and CD19 receptors in a mouse model of B cell metastases. *Mol Cancer Ther.* 9 (6): 1872-1883

(Van de Broek *et al.*, 2011) Van de Broek B, Devoogdt N, D'Hollander A, Gijs H-L, Jans K, Lagae L, Muyldermans S, Maes G & Borghs G (2011) Specific cell targeting with nanobody conjugated branched gold nanoparticles for photothermal therapy. *ACSNANO* 5 (6): 4319-4328.

(Van de Ven *et al.*, 1991) Van de Ven WJ, Creemers JW & Roebroek AJ (1991) Furin: the prototype mammalian subtilisin-like proprotein processing enzyme. Endoproteolytic cleavage at paired basic residues of proproteins of the eukaryotic secretory pathway. *Enzyme* 45: 257-270.

(Van der Linden *et al.*, 1999) van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, de Ron L, Wilson S, Davis P & Verrips CT (1999) Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies *Biochim Biophys Acta* 1431: 37-46.

(Van de Water *et al.*, 2012) Van de Water JAJM, Bagci-Onder T, Agarwal AS, Wakimoto H, Roovers RC, Zhu Y, Kasmieh R, Bhere D, Van Bergen en Henegouwen PMP & Shah K (2012) Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects. *PNAS* 41: 16642-16647.

(Vecchione *et al.*, 2011) Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, Ciardiello F & Tejpar S (2011) EGFR-targeted therapy. *Exp. Cell Res.* 317: 2765-2771.

(Veenstra *et al.*, 2005) Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM *et al* (2005) Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteome* 4: 409-418.

(Verma *et al.*, 2010) Verma A & Stellaci F (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6: 12-21

(Vyas *et al.*, 2017) Vyas M, Müller R, & von Strandmann EP (2017) Antigen loss variants: Catching hold of escaping foes. *Front. Immunol.* 8, 175.

(Wang *et al.*, 2008) Wang L, Bai J, Li Y & Huang Y (2008) Multifunctional nanoparticles displaying magnetization and near-IR absorption. *Angew. Chem. Int.* 47 (13) 2439:2442.

(Wang *et al.*, 2017) Wang H, Lin Y, Nienhaus K & Nienhaus GU (2017) The protein corona on nanoparticles as viewed from a nanoparticle-sizing perspective, *WIREs. Nanomed. Nanobi.* 10: 1500-1504

(Wang *et al.*, 2020) Wang G, Wang W, Shangguan E, Gao S & Liu Y (2020) Effects of gold nanoparticle morphologies on interactions with proteins. *Materials, Science & Engineering C* 111: 110830 doi: 10.1016/j.msec.2020.110830.

(Wawrzynczak *et al.*, 1991) Wawrzynczak EJ, Henry RV, Cumber AJ, Parnell GD, Derbyshire EJ & 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*. *Eur. J. Biochem.* 196 (1): 203-209.

(Wei *et al.*, 2020) Wei D, Tao Z, Shi Q, Wang L, Liu L, Tianshan S, Yi Q, Wen X, Liu L, Li S, Yang H & Jiang X (2020) Selective photokilling of colorectal tumors by near-infrared photoimmunotherapy with a GPA33-targeted single-chain antibody variable fragment conjugate. *Mol Pharmaceutics* 17: 2508-2517.

(Weldon *et al.*, 2015) Weldon JE, Skarzynski M, Therres JA, Ostovitz JR, Zhou H, Kreitman RJ & Pastan I (2015) Designing the furin -cleavable linker in recombinant immunotoxins based on *Pseudomonas* exotoxin A. *Bioconjugate Chem* 26: 1120-1128.

(Whetstone & Hammock, 2007) Whetstone PA & Hammock BD (2007) Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. *Toxicon* 49: 576-596

(Wilkinson *et al.*, 2009) Wilkinson IC, Hall CJ, Veverka V, Shi JY, Muskett FW, Stephens PE, Taylor HAJ & Carr MD (2009). High resolution NMR-based model for the structure of a scFv-IL-1 $\beta$  complex: potential for NMR as a key tool in therapeutic antibody design and development. *J. Biol. Chem.* 284: 31928-31935.

(Williams & Tsai, 2016) Williams JM & Tsai B (2016) Intracellular trafficking of bacterial toxins. *Curr Opin Cell Biol* 41: 51-56.

(Wu *et al.*, 2014) Wu W, Li S, Zhang W, Sun J, Ren G & Dong Q (2014). A novel VHH antibody targeting the B cell-activating factor for B-cell lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 9481-9496.

(Wu *et al.*, 2020) Wu S, Deng C, Zhang C, Xiong J, Gu X, Wang Z, Tu J & Xie J (2020) Preparation of a novel EGFR specific immunotoxin and its efficacy of anti-colorectal cancer in vitro and in vivo. *Clinical and Translational Oncology* doi: 10.1007/s12094-020-02548-8.

## Bibliografía

(**Wu et al., 2021**) Wu H, Wang Z, Liu S, Meng H, Liu S & Fu S (2021) Sub-toxic levels of cobalt ions impair chondrocyte mechanotransduction via HDAC6-dependent primary cilia shortening. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 544: 38-43.

(**Xie et al., 2007**) Xie J, Lee JY & Wang DIC (2007) Seedless, surfactantless, high-yield synthesis of branched gold nanocrystals in HEPES buffer solution. *Chem. Mater.* 19: 2823-2830.

(**Xie et al., 2020**) Xie Y-H, Chen Y-X & Fang J-Y (2020) Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5:22 doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.

(**Xing et al., 2021**) Xing Y, Xu K, Li S, Cao L, Nan Y, Li Q, Li W & Hong Z (2021) A single-domain antibody-based anti-PSMA recombinant immunotoxin exhibits specificity and efficacy for prostate cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5501 doi: 10.3390/ijms22115501.

(**Yang et al., 2005**) Yang PH, Sun X, Chiu JF, Sun H & He QY (2005). Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjugate Chem.* 16: 497-507.

(**Yang & Shah 2020**) Yang EY & Shah K (2020) Nanobodies: next generation of cancer diagnostics and therapeutics *Frontiers in Oncology* doi: 10.3389/fonc.2020.01182.

(**Yeung et al., 2004**) Yeung VP, Chang J, Miller J, Barnett C, Stickler M & Hardling FA (2004) Elimination of an immunodominant CD4+ T cell epitope in human IFN-beta does not result in an in vivo response directed at the subdominant epitope. *J. Immunol.* 172: 6658-6665.

(**Yoshida, 2001**) Yoshida H (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods in Enzymology* 341: 28-41.

(**Yuan et al., 2012**) Yuan H, Khoury CG, Hwang H, Wilson CM, Grant GA & Vo-Dinh T (2012) Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology* 23 (7): 075102. doi: 10.1088/0957-4484/23/7/075102.

(**Zhang et al., 2016**) Zhang R, Cheng K, Antaris AL; Ma X, Yang M, Ramakrishnan S, Liu G, Lu A, Dai H, Tian M & Cheng Z (2016). Hybrid anisotropic nanostructures for dual-modal cancer imaging and image-guided chemo-thermo therapies. *Biomaterials* 103: 265-277.

(**Zhao et al., 2013**) Zhao P, Liu F, Zhang B, Liu X, Wang B, Gong J, Yu G, Ma M, Lu Y, Sun J, Wang Z, Jia P & Liu H (2013) MAIGO2 is involved in abscisic acid-mediated response to abiotic stresses and Golgi-to-ER retrograde transport. *Physiol. Plant.* 148: 2246-260.

(**Zhao et al., 2018**) Zhao X, Pan J, Li W, Yang W, Qin L & Pan Y (2018) Gold nanoparticles enhance cisplatin delivery and potentiate chemotherapy by decompressing colorectal cancer vessels. *International Journal of Nanomedicine* 13; 6207-6221

## Bibliografía

(**Zhao et al., 2019**) Zhao P, Wang P, Dong S, Zhou Z, Cao Y, Yagita H, He X, Zheng SG, Fisher SJ, Fujinami RS & Chen M (2019) Depletion of PD-1 positive cells ameliorates autoimmune disease. *Nat Biomed Eng* 3(4): 292-305

(**Zhou et al., 2021**) Zhou S, Liu M, Ren F, Meng X & Yu J (2021) The landscape of bispecific T cell engager in cancer treatment. *Biomarker Research* 9: 38 doi: 10.1186/s40364-021-00294-9.