

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
2024-2025

Células T productoras de anticuerpos inmunoestimuladores para la terapia del cáncer

MÁSTER EN BIOLOGÍA SANITARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Emma Capelo Mera

Directora: Dra. Ana Laura Sanz Alcober

Unidad de Inmunología Molecular. Fundación para la investigación Biomédica del Hospital
Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
1. Resumen/Abstract	2
2. Introducción	3
2.1. Formatos y mecanismos de acción de los anticuerpos terapéuticos.....	3
2.2. Anticuerpos biespecíficos y estrategias <i>T cell engager</i>	4
2.3. Dianas tumorales	5
2.4. Anticuerpos de pequeño tamaño en tumores sólidos	5
2.5. Terapia celular adoptiva y nuevas estrategias	6
2.6. Diseño de nuevos LiTE: estrategia experimental.....	7
3. Hipótesis y objetivos	9
4. Materiales y métodos.....	10
4.1. Búsqueda bibliográfica de V_HH	10
4.2. Diseño y generación del ADN del vector de expresión lentiviral del LiTE	10
4.3. Cultivo celular.....	11
4.3.1. Líneas celulares	11
4.3.2. Obtención y cultivo de células T primarias	12
4.4. Transfección de células 293T por el método del fosfato cálcico ($Ca_3(PO_4)_2$).....	12
4.5. Western blot	12
4.6. Reconocimiento de los AAT purificados por ELISA.....	13
4.7. Reconocimiento de los AAT en las células tumorales por citometría de flujo	13
4.8. Ensayo de activación de Jurkat	14
4.9. Generación de partículas lentivirales	15
4.10. Transducción de células humanas.....	15
4.10.1. MCF-7.....	15
4.10.2. Jurkat.....	15
4.10.3. Linfocitos T primarios.....	15
4.11. Ensayo de citotoxicidad.....	15
4.12. Análisis estadístico.....	16
5. Resultados	17
5.1. Búsqueda bibliográfica de V_HH	17
5.2. Diseño y generación del ADN del vector de expresión lentiviral del LiTE.....	17
5.3. Generación de LiTEs por 293T transfectadas	17
5.4. Caracterización de los LiTE secretados por las 293T transfectadas	18
5.4.1. LiTE anti-CDH17	18
5.4.2. LiTE anti-B7-H3	19
5.5. Activación de Jurkat	20
5.6. Generación de partículas lentivirales	22
5.7. Transducción de células humanas.....	24

5.7.1. Caracterización del LiTE anti-B7-H3 secretado por las STAb-JK B12	24
5.8. Citotoxicidad.....	25
6. Discusión	27
7. Conclusiones	29
7. Conclusions	30
8. Bibliografía.....	31

Abreviaturas

aa- Aminoacídica	H ₂ SO ₄ - Ácido sulfúrico
AT- Antígeno Tumoral	IC- Intracelular
AAT- Antígeno Asociado a Tumor	Ig- Inmunoglobulina
ADC- <i>Antibody-Drug Conjugate</i>	LI-cadherina- <i>Liver intestine-cadherina</i>
ADCC- <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>	LiKE- <i>Light nK cell Engager</i>
ADCP- <i>Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis</i>	LiTE- <i>Light T cell Engager</i>
ADN- Ácido Desoxirribonucleico	LT- Linfocito T
APC- <i>Antigen-Presenting Cell</i>	mAb- <i>Monoclonal Antibody</i>
BiTE- <i>Bispecific T cell engager</i>	MHC- <i>Major Histocompatibility Complex</i>
BSA- <i>Bovine Serum Albumin</i>	NK- <i>Célula Natural Killer</i>
BsAb- <i>Bispecific Antibody</i>	nTPM- <i>Normalized Transcripts Per Million</i>
CaCl ₂ - Cloruro de calcio	OPD- <i>o-Phenilendiamina Dihydrochloride</i>
CAR- <i>Chimeric Antigen Receptor</i>	PBMC- <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
CD- <i>Cluster of Differentiation</i>	PBS- <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
CDC- Citotoxicidad Dependiente de Complemento	P/E/G- Penicilina/Estreptomina/Glutamina
CDH17- Proteína Cadherina 17	SBF- Suero Bovino Fetal
CDR- <i>Complementary-Determining Region</i>	scFv- <i>Single chain variable Fragment</i>
CG- Cáncer Gástrico	sdAb- <i>Single domain Antibodies</i>
C _H - Región Constante de la cadena pesada de un anticuerpo convencional	SI- Sinapsis Inmune
C _L - Región Constante de la cadena ligera de un anticuerpo convencional	STAb- <i>Secreting T cell-redirecting bispecific Antibody</i>
CM- Cáncer de Mama	Ta- Temperatura ambiente
CRC- <i>Colorectal Cancer</i>	TCA- Terapia Celular Adoptiva
DAPI- 4',6-diamidino-2-fenilindol	TCE- <i>T Cell Engager</i>
DMEM- <i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>	TCR- <i>T Cell Receptor</i>
EC- Extracelular	T _{eff} - Linfocito T efector
EGFP- <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	TIL- <i>Tumor Infiltrating Lymphocyte</i>
ELISA- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	TRAIL- <i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
EMA- <i>European Medicines Agency</i>	T _{reg} - Linfocito T regulador
Fab- Fragmento de unión a antígeno (<i>antigen binding</i>) de una IgG	TriTE- <i>Trispecific T cell Engagers</i>
Fc- Fragmento cristizable de una IgG	UE- Unión Europea
FcRn- Receptor de Fc neonatal	V _H - Región variable de la cadena pesada de un anticuerpo convencional
FcγR- Receptor de Fcγ	V _H H- <i>Heavy chain-only Variable fragment</i>
FDA- <i>US Food and Drug Administration</i>	V _L - Región variable de la cadena ligera de un anticuerpo convencional
FW- <i>Framework</i>	V _{NAR} - Región variable de un anticuerpo IgNAR
GAM-PE- <i>Goat Anti-Mouse-Phycoerythrin</i>	WB- <i>Western Blot</i>
HCAb- <i>Heavy-Chain-only Antibody</i>	

1. Resumen

La inmunoterapia del cáncer ha avanzado mucho desde su descubrimiento a finales del siglo XX, en particular gracias al desarrollo de anticuerpos biespecíficos derivados de los clásicos anticuerpos monoespecíficos. Concretamente, los *T cell engagers* (TCE) redirigen células T contra antígenos tumorales de forma específica, minimizando la toxicidad *off-target* asociada a los tratamientos tradicionales. Una limitación clave en el tratamiento de tumores sólidos es la escasa penetración tumoral de anticuerpos de gran tamaño, por lo que el uso de fragmentos más pequeños se considera una estrategia prometedora. En este contexto, los dominios V_H derivados de anticuerpos de cadena pesada única de camélidos emergen como una alternativa innovadora para la construcción de TCE biespecíficos de menor tamaño, mayor estabilidad y mejor penetración tisular.

En este trabajo se diseñaron y evaluaron construcciones en formato LiTE (*Light T cell engager*) compuestas por un scFv anti-CD3 y un V_H anti-CDH17 o anti-B7-H3. Mientras que los LiTEs anti-CDH17 no mostraron unión a células CDH17⁺, el LiTE B12 anti-B7-H3 demostró su funcionalidad, induciendo fuertemente la activación de células Jurkat. A partir de este candidato se generaron células STAb-T B12 mediante la terapia génica con lentivirus de tercera generación. Esto permite la secreción continua e ilimitada del LiTE B12 por parte de los LT modificados genéticamente. Estas células demostraron una potente actividad citotóxica frente a la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7, posicionándose como una nueva terapia prometedora contra el cáncer de mama como alternativa a la administración intravenosa de TCE y la terapia CAR-T.

Palabras clave: inmunoterapia del cáncer, TCE, vectores lentivirales, terapia celular adoptiva

1. Abstract

Cancer immunotherapy has progressed considerably since its emergence in the late 20th century, especially due to the development of bispecific antibodies based on classical monospecific antibodies. In particular, T cell engagers (TCEs) redirect T cells towards tumor-associated antigens with high specificity, therefore minimizing the off-target toxicity associated with conventional treatments. When treating solid tumors, poor tumor penetration of large antibody molecules represents one of the main challenges. On this matter, smaller antibody fragments are considered a promising strategy. V_H domains from camelid heavy-chain-only antibodies have emerged as an innovative alternative for constructing bispecific TCEs with reduced size, enhanced stability, and improved tissue penetration.

In this work, LiTE (Light T cell engager) constructs were designed and evaluated, consisting of an anti-CD3 scFv and a V_H targeting either CDH17 or B7-H3. While the anti-CDH17 LiTEs did not bind to CDH17⁺ cells, the anti-B7-H3 B12 LiTE demonstrated its functionality by inducing robust activation of Jurkat cells. Based on this candidate, B12 STAb-T cells were generated using third-generation lentiviral gene therapy, enabling the continuous and unlimited secretion of B12 LiTE by genetically modified T cells. These cells exhibited potent cytotoxic activity against the MCF-7 breast cancer cell line, positioning this strategy as a promising alternative to intravenous TCE administration and CAR-T therapy for breast cancer treatment.

Key words: adoptive cell therapy, cancer immunotherapy, lentiviral vectors, TCE

2. Introducción

Según el informe *Las cifras del cáncer en España*, publicado por la Sociedad Española de Oncología Médica en 2022, en este año se diagnosticaron aproximadamente 280.000 nuevos casos de cáncer, siendo los tumores sólidos de colon, recto, mama y pulmón los de mayor incidencia, con cifras que oscilan entre los 30.000 y 43.000 diagnósticos por tipo tumoral. Además, el cáncer fue responsable del 24,7 % de los fallecimientos en España ese mismo año según el Instituto Nacional de Estadística.

Las aproximaciones terapéuticas tradicionales en oncología consisten en quimioterapia y radioterapia una vez realizada o descartada la cirugía. Desgraciadamente, en muchos casos, estos tratamientos no son completamente efectivos debido a su falta de especificidad contra las células tumorales y la consecuente toxicidad asociada. La inmunoterapia del cáncer, surge a finales del siglo pasado como una alternativa más eficaz y con menos efectos *off-target*. Se basa en activar o estimular el sistema inmunitario para atacar a las células tumorales, ya que muchos de estos mecanismos son evadidos durante la progresión del cáncer [1].

2.1. Formatos y mecanismos de acción de los anticuerpos terapéuticos

Desde 1997, con el lanzamiento del anticuerpo monoclonal (mAb; del inglés *monoclonal antibody*) rituximab anti-*cluster of differentiation* (CD) 20, una inmunoglobulina (Ig) G1 quimérica para tratar linfomas no hodgkinianos, la Agencia Europea del Medicamento (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) y la *US Food and Drug Administration* (FDA) han aprobado más de 50 medicamentos basados en anticuerpos para el tratamiento del cáncer. Los primeros fueron los mAb, que supusieron una alentadora forma de solucionar el problema de la falta de especificidad gracias a su alta capacidad para discriminar entre antígenos tumorales (AT). Otro ejemplo es el Trastuzumab anti-HER2, un mAb humanizado formado por una IgG1 humana con regiones determinantes de complementariedad (CDRs, del inglés *complementary-determining regions*) de ratón aprobado en 1998 para tratar los cánceres de mama (CM) y gástricos (CG) HER2⁺ [2].

Existen distintos formatos en la terapia con anticuerpos: anticuerpos mono-específicos, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos conjugados con distintas moléculas que potencian su efecto citotóxico, como isótopos radiactivos, toxinas o fármacos [2].

Los anticuerpos mono-específicos clásicos utilizados para la terapia del cáncer son IgG, gracias a su potente función efectora, su elevada homogeneidad estructural y una vida media más larga en comparación con otros isotipos gracias a la unión de su región fragmento cristalizante (Fc) al receptor de Fc neonatal (FcRn), concretamente aquellos con estructura de IgG1 completa (Fig. 1a). Están formados por 2 cadenas pesadas (H, del inglés *heavy*) y 2 cadenas ligeras (L, del inglés *light*) que poseen regiones variables (V_H y V_L, respectivamente) que se unen al antígeno diana y regiones constantes (C_H y C_L, respectivamente) que determinan el mecanismo de eliminación del antígeno. Los dominios Ig están unidos entre sí por puentes disulfuro, también los hay entre las cadenas H y L y dos pares de puentes disulfuro unen las cadenas H entre sí. Mientras que el Fc interacciona con receptores inmunes para desencadenar las funciones efectoras, los fragmentos de unión a antígeno (Fab, del inglés *antigen-binding fragment*) son responsables de la unión específica a la diana molecular, concretamente gracias a las 3 CDRs, bucles que contienen secuencias aminoacídicas (aa) hipervariables flanqueadas por 4 *frameworks* (FW) [2, 3].

Los anticuerpos usados en inmunoterapia del cáncer pueden tener varios mecanismos de acción:

- Represión de la señal de supervivencia de factores de crecimiento.
- Bloqueo de la angiogénesis.
- Inducción de la muerte celular programada independiente de caspasas. e.g. rituximab.
- Reclutamiento y activación de células inmunes efectoras. Concretamente, el Fc de las IgG1 tiene una alta afinidad por los receptores Fc γ (Fc γ R) expresados en macrófagos y células *natural ki-*

ller (NK), que conducen a una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) y a una fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP, del inglés *antibody-dependent cellular phagocytosis*).

- Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

- Bloqueo de los puntos de control inmunitario de las células efectoras, como CTLA-4, PD-1 y PD-L1. Inhiben las rutas que regulan negativamente los linfocitos T (LT), volviéndolos más potentes contra las células tumorales [2].

2.2. Anticuerpos biespecíficos y estrategias *T cell engager*

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs, del inglés *bispecific antibodies*) se unen a dos epítopos antigénicos diferentes, que se pueden encontrar en la misma o en diferentes células diana. Los BsAbs que se dirigen hacia la misma célula suelen bloquear las señales de proliferación celular a través de receptores de factores de crecimiento, entre otros mecanismos de acción. Sin embargo, la mayoría de anticuerpos aprobados cuyas dianas están en distintas células son *T cell engagers* (TCE), que enlazan una célula tumoral con una célula T efectora (T_{eff}) para activarla y que destruya la célula tumoral [2]. El mecanismo de acción de los TCE es obligado, es decir, la actividad del anticuerpo depende estrictamente de las dos especificidades requiriendo unión espacial simultánea a los dos epítopos: el AT y la cadena CD3 ϵ del complejo del receptor de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*) [4]. Esta conexión transitoria de ambas células promueve la formación de una sinapsis inmune (SI) citolítica, mediante la cual los T_{eff} liberan en la célula tumoral perforinas que agujerean su membrana plasmática y granzimas que inducen la apoptosis [5].

Cualquier LT con potencial citotóxico que se encuentre en el microambiente tumoral puede participar en la lisis de la célula tumoral mediada por TCE. Los TCE pueden redirigir LT tanto CD8⁺ como CD4⁺ para lisar las células tumorales. A mayores, también pueden redirigir células T reguladoras (T_{reg}), que típicamente disminuyen la respuesta de los LT CD8⁺. Hay estudios [6] que indican que esto es negativo para la eficacia del blinatumomab, un TCE biespecífico formado por dos fragmentos variables de cadena única (scFv, del inglés *single chain variable fragment*) (BiTE, del inglés *bispecific T cell engager*) anti-CD19 para tratar la leucemia linfoblástica aguda. Pero dada la alta tasa de eficacia de los TCE en tumores hematológicos, parece improbable que el reclutamiento de T_{reg} por los TCE pueda impedir su actividad antitumoral [5].

Típicamente, las células T necesitan dos señales para su activación completa: primero la unión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de la célula presentadora de antígeno (APC, del inglés *antigen-presenting cell*) al TCR y después la coestimulación de la unión del CD28 del LT con el CD80 de la APC. Ambas señales son imprescindibles para la activación de linfocitos T *naive*, pero las células T_{eff} de memoria solo necesitan la primera señal para una activación completa. Sin embargo, el reconocimiento de los AT por los LT mediado por el TCE es independiente de las moléculas del MHC, del procesamiento y la presentación de antígenos peptídicos y de la especificidad del TCR [3,5].

Los TCE pueden generar efectos adversos debido a la activación accidental de los LT. Esto puede ocurrir por la agregación del TCE o por la interacción inespecífica de la región Fc de los TCE IgG-like con receptores como Fc γ R, lo que provoca un síndrome de liberación de citoquinas (CRS, *cytokine release syndrome*) por sobreactivación de los LT [5]. Esto fue observado con el catumaxomab, el primer TCE biespecífico comercializado, que se dirigía a EpCAM para tratar las ascitis malignas en cáncer de ovario. Sin embargo, fue retirado del mercado en la Unión Europea debido a su alta inmunogenicidad. Para paliar esta toxicidad asociada a los TCE, las siguientes generaciones incorporan mutaciones puntuales en el Fc que evitan su unión a células NK o macrófagos, pero preservan el sitio de unión al receptor FcRn. En la actualidad existe una nueva tendencia, TCE de menor tamaño al eliminar por completo la región Fc, resultando en un acortamiento de la vida media del fármaco por ausencia de reciclaje asociado al FcRn [4]. Un ejemplo es el blinatumomab, el único TCE sin Fc comercializado, que requiere administración cada 2 h para mantener la concentración plasmática terapéutica [2].

Para desarrollar nuevos TCE multiespecíficos es importante tener en cuenta las siguientes características, para obtener un diseño óptimo: formato, afinidad, epítomos, distancia entre los epítomos, flexibilidad de la construcción, peso molecular, etc. [4]. En el estudio de M. Dicara *et al.* en 2022 [7] se demuestra que la selección óptima de los epítomos y sus dominios de unión, combinando unos de alta y baja afinidad, y su posicionamiento apropiado en la constitución del anticuerpo son aspectos clave en la actividad del mismo, puesto que influye directamente en la eficacia de la SI.

2.3. Dianas tumorales

La elección de dianas para la inmunoterapia del cáncer es clave en lo que respecta a la especificidad, eficacia y toxicidad terapéutica. Los AT se clasifican en antígenos asociados a tumor (AAT), antígenos específicos de tumor (AET) o neoantígenos y antígenos no peptídicos (ANP). Los AAT son proteínas como receptores de factores de crecimiento sobreexpresados en tumores sólidos y marcadores CD en tumores hematológicos. Tienen una alta prevalencia en los pacientes y son fáciles de reconocer mediante un análisis patológico [8], pero también se expresan en tejidos sanos en menor medida, por lo que si el TCE presenta una alta afinidad o un umbral de activación bajo, puede causar toxicidad *on-target off-tumor* [5]. Los AET son péptidos defectuosos derivados de células tumorales con mutaciones somáticas exclusivas de las mismas, lo que les confiere un gran valor terapéutico porque evitaría los efectos *on-target off-tumor*, pero son difíciles de identificar y menos comunes. Los ANP son lípidos, glicolípidos, carbohidratos exclusivos o sobresintetizados en las células tumorales por su alterado metabolismo [8].

2.4. Anticuerpos para tratar tumores sólidos

La inmunoterapia se ha estudiado ampliamente en tumores hematológicos y melanomas, pero su uso no es tan extenso en tumores sólidos debido a la poca cantidad de AET sólidos, al mal desempeño de los LT en el microambiente tumoral inmunosupresivo y a los múltiples mecanismos de evasión del sistema inmunitario que desarrollan estos tumores [1].

Los TCE usados para tratar tumores sólidos requieren una mayor exposición sistémica para conseguir una concentración intratumoral efectiva en comparación con los usados para tratar tumores hematológicos. Por esto y la toxicidad *off-target* asociada al reconocimiento de la región Fc del anticuerpo, y la facilidad de penetración, los formatos TCE de pequeño tamaño serían beneficiosos para tratar tumores sólidos [5].

Los anticuerpos multiespecíficos sin Fc pueden estar formados por diferentes tipos de fragmentos de anticuerpo, como por ejemplo los scFv o los Fab, unidos entre sí por un conector peptídico flexible. No obstante, los scFvs tienen propiedades negativas como bloques de construcción de un anticuerpo multiespecífico porque tienen una temperatura de fusión baja, lo que afecta a su estabilidad y propensión a formar agregados [5].

Una alternativa emergente a los scFv dentro de las construcciones multiespecíficas son los anticuerpos de dominio único (sdAb, del inglés *single domain antibodies*). Dentro de este grupo destacan los V_H , derivados de los anticuerpos homodiméricos HCABs (*heavy-chain-only antibodies*) presentes en el suero de camélidos. Estos carecen de cadena ligera y del primer dominio constante de la cadena pesada, quedando como unidad funcional un único dominio variable (V_H) (Fig. 1b). Últimamente, están ganando interés debido a que su ensamblaje en construcciones multiespecíficas —como LiTE (del inglés *light T cell engager*); LiKE (del inglés *light NK cell engager*) o TriTE (del inglés *Trispecific T Cell Engager*)— es más eficiente, gracias a su simplicidad estructural. Además, su tamaño es incluso menor que el de un scFv (~ 15 kDa), incrementando la capacidad de penetrar en el tejido. Ya se han aprobado algunos fármacos basados en V_H s como caplacizumab (CABLVI) u ozoralizumab (Nanozora) pero su potencial aplicación en oncología permanece sin explotar [9].

Existen otro tipo de sdAb, las regiones variables V_{NAR} derivadas de los anticuerpos homodiméricos IgNAR de tiburones (Fig. 1c), que también poseen IgMs e IgWs, pero no IgGs. Los V_{NAR} poseen una estructura única que les confiere un peso molecular incluso inferior al de los V_H , de 12 kDa [10]. Asi-

mismo, el medio interno de los tiburones rico en urea hace que los V_{NAR} tengan una estabilidad química y térmica excepcional y ya hayan sido usados como inmunotoxinas [11] y en terapia celular adoptiva (TCA) CAR-T [12], por lo que también serían unos bloques de construcción excelentes.

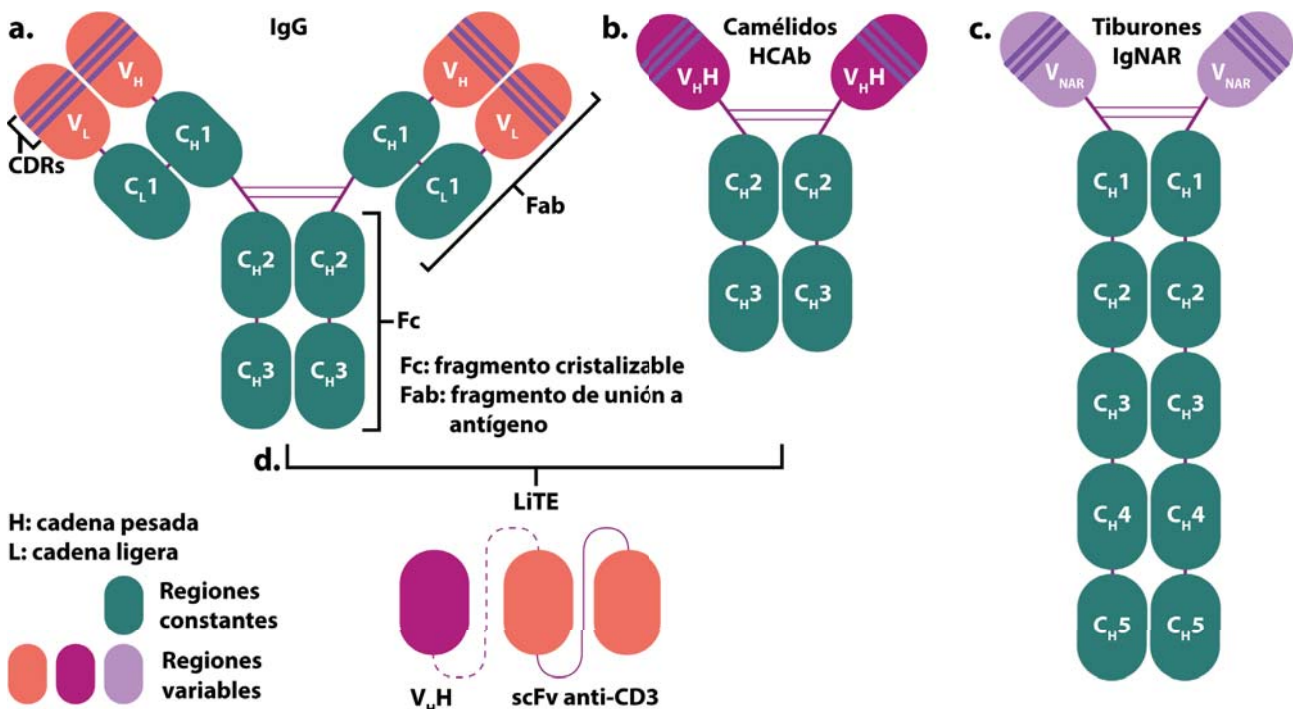


Figura 1. Tipos de anticuerpos: estructura de una IgG (a), estructura de un HCAb de camélidos (b), estructura de una IgNAR de tiburones (c) y estructura de un LiTE generado a partir de un scFv de una IgG y de un V_{HH} de un HCAb (d).

2.5. Terapia celular adoptiva y nuevas estrategias

Una forma de evitar la necesidad de administración continua de los LiTEs debido a su corta vida media es utilizar la TCA. La TCA es un tratamiento personalizado que implica el aislamiento de las células inmunes de un paciente, su activación, su expansión *ex vivo* y su reinfusión en el paciente. La mayoría de estrategias de TCA usan linfocitos T extraídos del tumor (TILs, del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*) o de sangre periférica [13], ya que los LT citotóxicos son la población de células inmunitarias presentes en pacientes oncológicos con mayor capacidad para combatir el cáncer [5]. La relevancia de estas células se remonta a 1992, cuando se aprobó el tratamiento con IL-2 recombinante, una citoquina que activa los LT citotóxicos [14]. Las estrategias de ingeniería de LT podrían mejorar el *homing* de estas células hacia su diana [1].

Al modificar genéticamente las células T autólogas de los pacientes para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR, del inglés *chimeric antigen receptor*) se les confiere la capacidad de reconocer antígenos de superficie celular de forma independiente a la interacción de estas células con el MHC, lo que se traduce en una funcionalidad completa y duradera. Sin embargo, a pesar del éxito clínico de la TCA con células CAR-T en tumores hematológicos, está asociada a un CRS más severo que el provocado por TCE y en tumores sólidos la eficacia es menor [5]. Además, las células CAR-T producen una SI con la célula tumoral no canónica, es desorganizada a lo largo de toda la membrana del LT, lo que puede afectar a la eficiencia y seguridad terapéutica [13, 15].

Las células STAb-T (del inglés *T cell genetically modified to secrete T cell redirecting bispecific antibodies*) son LT modificados genéticamente para secretar un TCE multiespecífico. Pueden migrar a zonas inflamadas y dañadas del cuerpo, como pueden ser los tumores, y activamente extravasar hacia estos tejidos (Fig. 2). Tienen una vida media larga y producen la construcción constantemente, lo que asegura una concentración persistente del BiTE o LiTE, compensando su corta vida media [13].

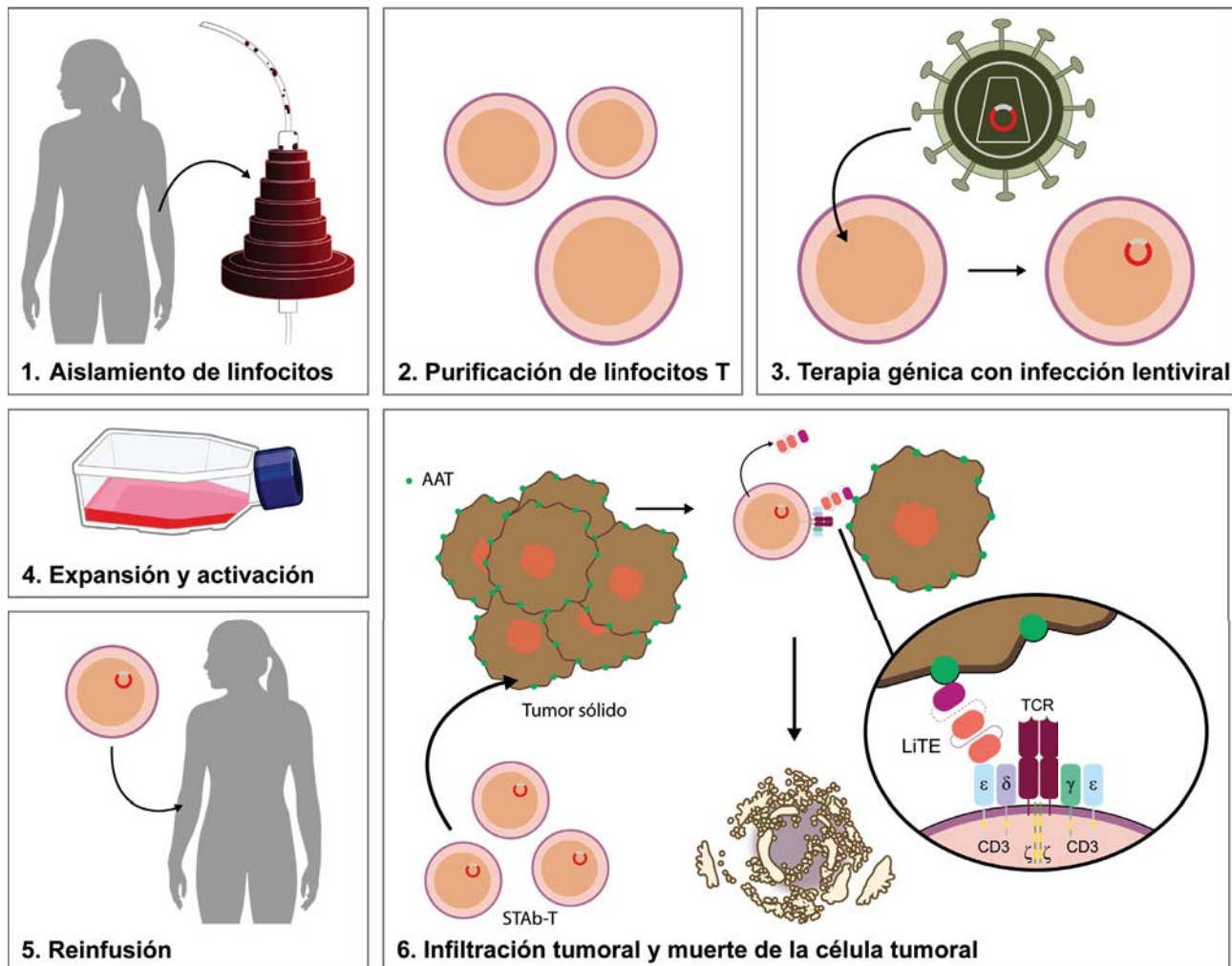


Figura 2. Terapia celular adoptiva con células STAb-T.

Las células STAb-T presentan una clara ventaja frente a las CAR-T, ya que la construcción secretada puede a su vez tener un efecto *bystander* reclutando a otros LT no modificadas presentes en el nicho tumoral. Además, las células STAb-T generan una SI canónica con la célula tumoral, a diferencia de las células CAR-T, lo que es crucial en el proceso de activación del LT mediado por el complejo del TCR [15, 16]. En el estudio de M. Velasco-Sidro *et al.* en 2025 [17], donde generan unas células STAb-T duales que secretan dos TCE bispecíficos, uno anti-CD19 y otro anti-BCMA, demuestran que este tipo de terapia es mucho más eficaz que las células CAR-T dirigidas frente a las mismas dianas, pues las primeras muestran un efecto terapéutico a ratios célula efectora:célula tumoral (E:T) muy bajos. Además, existe evidencia de la eficacia de las STAb-T en tumores sólidos según un estudio publicado en 2024 por Jiménez-Reinoso *et al.* [18], en el que demuestran la eficacia de unas STAb-TIL en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non small cell lung cancer*) en modelo murino.

2.6. Diseño de nuevos LiTE: estrategia experimental

En este trabajo, se han generado varios TCE en formato LiTE siguiendo la estructura de los ya existentes en el laboratorio, constituidos por un scFv anti-CD3 ϵ , generado a partir de la secuencia del anticuerpo comercial OKT3, y de V_H dirigidos frente a nuevos AAT sólido para el laboratorio (Fig. 1d). Las proteínas cadherina 17 (CDH17) y B7-H3 se consideraron buenas dianas para generar un LiTE.

La CDH17, también conocida como *liver intestine* (LI)-cadherina es una proteína miembro de la superfamilia cadherinas, moléculas de adhesión intercelular, que se diferencia del resto por tener

7 dominios extracelulares (EC) cadherina en lugar de 5, además de un dominio intracelular (IC) de 20 residuos aa en lugar de 100. En condiciones fisiológicas, se expresa en las membranas laterales de las células epiteliales del intestino delgado y el colon. Su expresión se ve aumentada en varios tumores en estado avanzado y metastásicos —debido a su implicación en la transición epitelio mesénquima (TEM)— del sistema digestivo como CG, cáncer colorrectal (CRC, del inglés *colorectal cancer*), hepático, pancreático y neuroendocrino [19]. Sin embargo, las células tumorales carecen de polaridad, por lo que expresan la CDH17 a lo largo de toda su membrana [20], por lo que utilizar este AAT como diana de inmunoterapia no provocaría toxicidad *on-target off-tumor*. Se han probado varios formatos de anticuerpo anti-CDH17 en ensayos preclínicos incluyendo BsAb CDH17xTRAIL [21] y TCA CAR-T [20, 22], entre otros, la mayoría de ellos usando anticuerpos de tamaño completo.

La B7-H3, también conocida como CD276 o B7RP-2, es una proteína de la familia de ligandos B7, con la que comparte entre un 20 y un 27 % de identidad aa. Posee un corto dominio IC y 2 dominios EC tipo Ig, que según su estructura, determinan una de las 2 isoformas. Durante la embriogénesis, los osteoblastos presentan altos niveles de B7-H3, pues está implicada en su diferenciación y en la mineralización ósea. En adultos, su papel principal es inhibir la inmunidad adaptativa suprimiendo la activación y proliferación de LT. Su expresión en tejidos sanos es muy limitada debido a su regulación postraducciona por microARNs. Las células tumorales pueden expresar isoformas aberrantes con diferentes funciones inmunológicas. En cáncer, promueve la tumorigénesis principalmente mediante mecanismos inmunológicos, inhibiendo la respuesta inmune específica de AT, pero también mediante mecanismos no inmunológicos, gracias a su participación en la activación de la ruta de señalización JAK/STAT. Esto resulta en la promoción de la migración en invasión tumoral en melanoma, CM y cáncer de próstata; la angiogénesis en CRC; la resistencia a la quimioterapia en CM y CRC y la TEM en glioma y hepatoma. Sin embargo, también se han reportado algunas funciones antitumorígenicas en ratones y en humanos por la infiltración de T_{reg} activadas en NSCLC. Este rol dual podría explicarse por la unión de B7-H3 a distintos tipos de receptores, tanto inhibidores como estimuladores. Existe evidencia clínica del uso de B7-H3 como diana inmunoterapéutica. Se testó un B7-H3 BiTE, el obrindatamab (MGD009, MacroGenics), en un ensayo clínico (EC) fase I (NCT02628535) que en 2018 reportó efectos adversos en el hígado debido al CRS y terminó en 2019 por motivos administrativos. También se están llevando a cabo EC fase I/II con B7-H3 CAR-T para tratar glioblastoma (NCT04077866) y EC fase I en glioma pediátrico (NCT04185038) [23].

Una vez probada la capacidad de unión de los LiTEs a las dianas en la superficie celular, se infectarán LT primarios con un lentivirus que codifica el LiTE para generar células STAb-T que lo secreten y comprobar la eficacia *in vitro* de esta TCA.

3. Hipótesis y objetivos

La terapia celular adoptiva con células STAb-T que secreten un anticuerpo biespecífico en formato LiTE como estrategia de inmunoterapia para tratar tumores sólidos puede suponer una ventaja frente a otros tipos de inmunoterapia del cáncer como el tratamiento intravenoso con anticuerpos o la TCA con células CAR-T.

El objetivo general de este trabajo es generar un LiTE funcional nuevo, transducir mediante vectores lentivirales linfocitos T primarios (LT) y demostrar su eficacia citotóxica. Para ello, deberemos lograr los siguientes objetivos específicos:

1. Búsqueda bibliográfica de la secuencia de un V_H cuya diana sea un AAT sólido de interés.
2. Subclonaje de esta secuencia en un vector de transferencia lentiviral que codifica el scFv anti-CD3.
3. Expresión del LiTE mediante transfección con el vector de transferencia lentiviral de células HEK293T.
4. Caracterización y evaluación de la eficacia de unión del LiTE al AAT inmovilizado en plástico y expresado en la superficie de líneas tumorales, así como al CD3 de Jurkat.
5. Análisis de la capacidad del LiTE para activar Jurkat.
6. Producción de un stock lentiviral mediante cotransfección de células HEK293T con el vector de transferencia y los plásmidos empaquetadores. Titulación del stock.
7. Producción de células STAb-Jurkat y STAb-T mediante la transducción de Jurkat y LT primarios, respectivamente.
8. Evaluación del efecto citotóxico de células STAb-T en cocultivos con células tumorales que expresen el AAT.

4. Materiales y Métodos

4.1. Búsqueda bibliográfica de V_H H

Mediante búsqueda bibliográfica localizamos secuencias codificantes de los siguientes V_H H: los anti-cadherina 17 humana clones E8 de Ma *et al.* en 2022 [24] y Nb289 de Xu *et al.* en 2024 [25], ambos de alpaca (*Lama pacos*); y el anti-B7-H3 humana, clon B12 de Li *et al.* en 2023 [26] de dromedario (*Camelus dromedarius*). GeneArt (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Écublens, Vaud, Suiza) sintetizó las moléculas de ADN codificante optimizadas para la expresión en *Homo sapiens* en formato plasmídico para cada V_H H flanqueado por los sitios de restricción de las enzimas de restricción (ER) MluI y Afe-I (Fig. 3a).

4.2. Diseño y generación del ADN del vector de expresión lentiviral del LiTE

Los V_H H se clonaron en un vector de expresión lentiviral, el pCCL- V_H H anti AAT-OKT3-T2A-EGFP para generar los LiTE correspondientes. El vector final está integrado por la secuencia del péptido señal oncostatina M (OncoM), la secuencia del V_H H, ya sea E8, Nb289 o B12, la secuencia del scFv anti-CD3 clon OKT3, las etiquetas peptídicas myc e his (empleadas para su detección y purificación, respectivamente), el péptido autoprocésable T2A, el gen reportero de la proteína fluorescente verde (EGFP, del inglés *enhanced green fluorescent protein*) y el gen de resistencia a ampicilina, todo ello bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) (Fig. 3b). Esta construcción tiene un único origen de traducción pero gracias a la presencia del T2A, se escinde el LiTE de la EGFP.

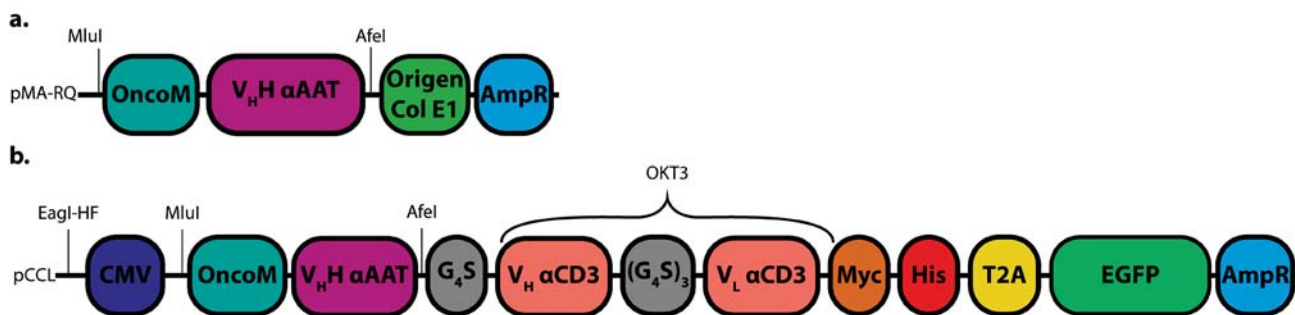


Figura 3. Esquema genérico de los plásmidos utilizados para la doble digestión. a. Plásmido pMA-RQ sintetizado por GeneArt que contiene el origen de replicación 1 de *E. coli* (origen Col E1) y un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) con el inserto, la secuencia OncoM y el V_H H frente al antígeno asociado a tumor (α AAT). b. Vector de expresión lentiviral genérico pCCL- V_H H-OKT3-T2A-EGFP: CMV, OncoM, V_H H α AAT unido por un linker corto de 4 glicinas y una serina (G₄S) al scFv anti CD3 OKT3, Myc, His, T2A, EGFP y AmpR. Indicados con una flecha los sitios de restricción de las ER EagI (con sitios adicionales en las secuencias de algunos V_H H), MluI y AfeI.

Se realizó una doble digestión de los plásmidos sintetizados por GeneArt con los V_H Hs y del vector de expresión lentiviral pCCL-Ega1-OKT3-T2A-EGFP, ya existente en el laboratorio, con las ER MluI-HF y AfeI (New England Biolabs, Ipswich, Suffolk, Reino Unido). Se separó el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) y se cortaron las bandas de interés para extraer el ADN de las mismas mediante el kit QIAquick (QIAGEN, Venlo, Limburg, Países Bajos) y ligar los fragmentos con la ligasa Quick Ligase (New England Biolabs, Ipswich, Suffolk, Reino Unido).

Para preservar y expandir el ADN ligado, transformamos la cepa bacteriana *E. coli* NZY5 α (NZYtech, Lisboa, Portugal) con 200 ng de ADN mediante choque térmico (incubación de 30 min a 4 °C seguida de 40 segundos a 42 °C y 2 min a 4 °C). Las bacterias se sembraron en medio 2xYT Broth (Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Alemania) y se incubaron 1 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, con el pélet bacteriano resuspendido se hizo una siembra por extensión en placa de LB agar con ampicilina (InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.) incubada *overnight* a 37 °C. Se seleccionaron las colonias aisladas que habían incorporado el plásmido, gracias al gen de resistencia a ampicilina, para realizar un nuevo cultivo con medio 2xYT Broth y ampicilina (100 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) incubado *overnight* a 37 °C en agitación.

El ADN plasmídico se aisló del cultivo líquido con el kit NZY Miniprep (NZYtech, Lisboa, Portugal) y se cuantificó determinando también los ratios de absorbancia (A) A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} para evaluar su pureza mediante el espectrofotómetro Nanophotometer (Implen, Múnich, Baviera, Alemania). A continuación, se realizó una digestión control con ER MluI-HF, Afel y a mayores EagI, ya que reconoce un sitio de restricción adicional en el V_H Ega1 del vector de expresión lentiviral original pero está ausente en E8, Nb289 y B12. Después se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el patrón de bandas era el adecuado. Una vez confirmado, se preparó un glicerol stock del cultivo líquido que se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente en nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo.

4.3. Cultivo celular

4.3.1. Líneas celulares

Línea celular	Tipo celular	Origen	Tipo de crecimiento	Uso
HEK-293T (293T)	Fibroblasto de riñón embrionario	ATCC (CRL-112668)	Adherente	- Transfección gen LiTE E8, Nb289 y B12 - Producción lentivirus luciferasa y LiTE B12 - Titulación stocks lentivirales luciferasa y LiTE B12
MKN-45	Adenocarcinoma de estómago	AcceGen Biotech (Cat.# ABC-TC0687)		- Citometría unión SN de 293T con LiTE E8, Nb289 y B12 - Citometría unión SN de STAb-JK B12 con LiTE B12
Jurkat (JK)	Leucemia T CD4 ⁺	ATCC (TIB-152)	En suspensión	- Citometría unión SN LiTE 293T - Ensayo de activación
MCF-7	Adenocarcinoma de mama metastásico	ATCC (HTB-22)	Adherente	- Citometría unión SN de 293T con LiTE B12 - Citometría unión SN de STAb-JK B12 con LiTE B12 - Transducción con lentivirus luciferasa
STAb-JK B12	JK infectadas con lentivirus LiTE B12	Laboratorio	En suspensión	- Producción SN LiTE B12 para ensayo de citotoxicidad por bioluminiscencia
MCF-7 luc	MCF-7 infectadas con lentivirus luciferasa		Adherente	- Ensayo de citotoxicidad por bioluminiscencia

Tabla 1. Lista de líneas celulares humanas empleadas en el estudio, indicando el tipo celular, el origen de la misma, el tipo de crecimiento y su uso en este trabajo. ATCC (Manassas, VA, EE.UU.) del inglés *American Type Culture Collection*; AcceGen Biotech (Fairfield, NJ, EE.UU.).

Las células adherentes (Tabla 1) se cultivaron en monocapa con *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, EE.UU.; Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich) y un 1 % de penicilina/estreptomicina/glutamina (P/E/G) (Corning Life Sciences). Las células en suspensión se cultivaron en *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI) (Corning Life Sciences) 10 % SBF 1 % P/S/G. Todas las células se incuban en estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera húmeda (95 %) y 5 % CO_2 .

Se trabaja en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar con material estéril. Para controlar la contaminación por *Mycoplasma spp.* se testa periódicamente el sobrenadante de los cultivos mediante PCR usando *Mycoplasma gel detection kit* (Biotools B&M Labs, Madrid, España).

Una vez alcanzada una confluencia del 70-80 % se pasan las células, lavándolas con tampón fosfa-

to salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) (Corning Life Sciences) y tripsina (Lonza, Basel, Suiza) en el caso de las células adherentes, para utilizarlas para experimentos o congelarlas con SBF 10 % dimetilsulfóxido (DMSO) (Corning Life Sciences) a -80 °C y posteriormente en nitrógeno líquido.

4.3.2. Obtención y cultivo de células T primarias

Se obtuvieron los linfocitos T (LT) de un donante sano (varón, 24 años) a partir de una cámara de leucorreducción cedida por el Biobanco del Hospital Puerta de Hierro de Majadahonda (HUPHM)/ Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHISA) (PT17/0015/0020, Red Nacional de Biobancos) como subproducto de la extracción de plasma rico en plaquetas tras haber obtenido el consentimiento informado para experimentación con muestras humanas.

En primer lugar, se incubó la sangre con RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail (50 µL/mL) (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canadá) a 4 °C durante 20 min. Después, se diluyó la sangre en el mismo volumen de PBS 2 % SBF y se centrifugó bajo gradiente de densidad sobre Lymphoprep (1,077 g/mL) (STEMCELL Technologies) a 1.200 g a temperatura ambiente (Ta) durante 20 min. Se recogió la fase correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*) enriquecidas en LT, se lavó con PBS (1.500 rpm 5 min) y se añadieron 5 mL de tampón de lisis amoníaco-cloruro-potasio (Gibco) durante 10 min a Ta para lisar los eritrocitos remanentes. Tras otro lavado con PBS, las células se resuspendieron en RPMI 10 % SBF 1 % P/E/G suplementado diariamente con IL-7 (10 ng/mL) e IL-15 (10 ng/mL) y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda (95 %) y 5 % CO₂.

4.4. Transfección de células HEK293T por el método del fosfato cálcico (Ca₃(PO₄)₂)

Las células 293T se sembraron en una placa de 24 pocillos (1,5·10⁵ células/pocillo) (Falcon, Corning Life Sciences) 24 h antes y se transfectaron con el vector correspondiente. Para ello, se mezcló directamente 1 µg de ADN/pocillo con una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) (2M) (Carl Roth) y posteriormente se añadió gota a gota el tampón fosfato (HEPES 2X) (Gibco) mientras se generaban burbujas de aire para formar un co-precipitado fino. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento sin ADN. A las 6 h se renovó el DMEM 10 % SBF 1 % P/E/G y a las 48 h se recogió el sobrenadante (SN) con el LiTE secretado y el SN-.

4.5. Western blot

Para comprobar la expresión de los LiTEs se analizaron los sobrenadantes (SN) de las 293T transfectadas por western blot.

Primero se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) bajo condiciones desnaturalizantes (SDS) con 16 µL de cada muestra. Como control positivo se usó 1 µL del LiTE anti-EGFR existente en el laboratorio. Se cargaron las muestras con sus respectivos controles negativos, los SN- de las transfecciones, y el marcador de peso molecular (SeeBlue Plus-2 Pre-Stained Protein Standard Protocol, Life Technologies) junto con tampón de carga 5X (Pierce Lane Marker). El gel corrió embebido en tampón TG-SDS 1X a 90 V durante 20 min y a 120 V durante 1 h.

A continuación, se realizó una transferencia en seco de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando el iBlot (Thermo Fisher Scientific). Consecutivamente, la membrana se bloqueó con PBS 5% leche desnatada en polvo durante 30 min a Ta en agitación. Una vez eliminada la leche, se realizó una incubación *overnight* a 4 °C en agitación con un anticuerpo primario de ratón anti-myc (1:1.000) y posteriormente una incubación de 45 min a Ta en agitación con un anticuerpo policlonal (pAb, del inglés *polyclonal antibody*) de cabra anti-ratón (GAM, del inglés *goat anti-mouse*) conjugado con DyLight 800 (1:5.000) (Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, EE. UU.).

Finalmente, la membrana se lavó dos veces con PBS-Tween 0,05% seguido de un lavado final de 10 min con PBS en agitación y se reveló con el equipo de detección de fluorescencia Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) y el software Image 3.1.

4.6. Reconocimiento de los AAT purificados por ELISA

Con el objetivo de analizar la funcionalidad de los TCE biespecíficos LiTE E8, LiTE Nb289 y LiTE B12 se realizaron ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) a partir de los SN de células 293T transfectadas o STAb-JK B12. El *coating* se hizo incubando a 4 °C *overnight* 5 µg/mL las proteínas humanas CDH17 (11360-H08H, Sino Biological, Houston, TX, EE. UU.) o B7-H3 (B73-H52E2, ACROBiosystems, Newark, DE, EE. UU.) en una palca de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific).

Se lavó la placa con PBS y se bloqueó con PBS 5 % albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se añadieron 100 µL de SN durante 1 h a Ta. Como control negativo se usó el SN- de la transfección o PBS en el caso del ELISA con SN de STAb-JK B12. Como control positivo empleamos el mAb IgG1 de ratón anti-CDH17 humana (5 µg/µL) (clon #141713) (MAB1032, R&D Systems, Mineápolis, MN, EE. UU.) y el mAb IgG1 de ratón anti B7-H3 humana marcado con APC (1,25 ng/µL) (clon 7-517) (# 17-2769-42, Invitrogen). Después de retirar el SN y lavar 3 veces con PBS-Tween 0.05 % y PBS, se incubó la placa con el mAb IgG1 de ratón anti-myc humana (2,4 µg/mL) 1h a Ta. Tras otros 3 lavados, se incubó 45 min a Ta con un pAb de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:1000) (GAM-HRP, del inglés *goat anti-mouse-horseradish peroxidase*) (A9917, Sigma-Aldrich). Después de 3 lavados se añadió diclorhidrato o-fenilendiamina (OPD, del inglés *o-Phenylendiamine dihydrochloride*) (Sigma) disuelto en tampón fosfato citrato (Sigma-Aldrich) con agua oxigenada (100 µL/pocillo). Cuando la HRP hizo efecto y cambió de color, se paró la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) (1N) (100 µL/pocillo) (ITW Reagents, Castellar del Vallès, Barcelona, España). Para analizar los resultados se midió la A₄₅₀ en el espectrofotómetro Multiskan Ex (Thermo Fisher Scientific).

4.7. Reconocimiento de los AAT en las células tumorales por citometría de flujo

Tras haber consultado los niveles de expresión de ARN de CDH17 y B7-H3 en las líneas tumorales disponibles en el laboratorio en la base de datos The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>), realizamos citometrías de flujo para comprobar la expresión de cada proteína en la membrana celular, ya que los niveles de ARN no se correlacionan proporcionalmente con los de proteína.

Como control positivo, se incubaron células MKN-45 y MCF-7 (1,5·10⁵ células/tubo) 30 min a 4 °C en 100 µL PBS 1 % BSA con el mAb IgG1 de ratón anti-CDH17 humana (5 µg/µL) o con el mAb IgG1 de ratón anti B7-H3 humana marcado con APC (1,25 ng/µL). Tras un lavado con PBS, las MKN-45 incubadas con el mAb αCDH17 se incubaron 30 min a 4 °C en 100 µL PBS 1 % BSA con un pAb de cabra anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (GAM-PE, del inglés *GAM-phycoerythrin*) (1:200) (115-116-071, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.). Como control negativo se incubaron células solo con el GAM-PE o con un anticuerpo inespecífico conjugado con APC.

Para estudiar el reconocimiento de CDH17 y B7-H3 en la membrana de las células tumorales por parte de LiTE E8, LiTE Nb289 y LiTE B12, se incubaron las células MKN-45 y MCF-7 (1,5·10⁵ células/tubo) con 100 µL de SN de células 293T transfectadas o STAb-JK B12 1 h a 4 °C. Tras un lavado con PBS, las células se incubaron 30 min a 4 °C con el mAb IgG1 de ratón anti-myc humana (2,4 µg/mL). Tras otro lavado, se añadió el GAM-PE (1:200) y se incubó 30 min a 4°C. Como control negativo se utilizaron células siguiendo el mismo procedimiento omitiendo la incubación con el SN.

Después de un último lavado con PBS se resuspendieron las células en PBS 1 % BSA, se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se pasaron por el citómetro de flujo MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Renania del Norte-Westfalia, Alemania). Los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo (BD Biosciences).

4.8. Ensayo de activación de Jurkat

Para estudiar la activación de células Jurkat (JK) por parte del LiTE B12 del SN de 293T transfectadas, se cocultivaron con células MKN-45 o MCF-7 y se detectó la expresión del marcador de

activación temprana CD69 en la superficie de JK mediante citometría de flujo.

Para ello, se sembraron MCF-7 en un placa de 96 pocillos ($2 \cdot 10^4$ células/pocillo) y 24 h después se añadieron las JK a una ratio efector-diana (E:T, del inglés *effector:target*) 5:1 junto con el SN. Tras 24 h, se recogieron las JK y se incubaron con un mAb IgG1 de ratón anti-CD69 humano conjugado con PE (4 μ L/tubo) (clon #FN50) (555531, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron, se resuspendieron en PBS 1 % BSA y se analizaron mediante citometría como en el apartado anterior. Como control negativo se emplearon JK en monocultivo o cocultivo con SN-. También se monitorizó la expresión de B7-H3 en JK activadas de la forma descrita en el apartado previo.

4.9. Generación de partículas lentivirales

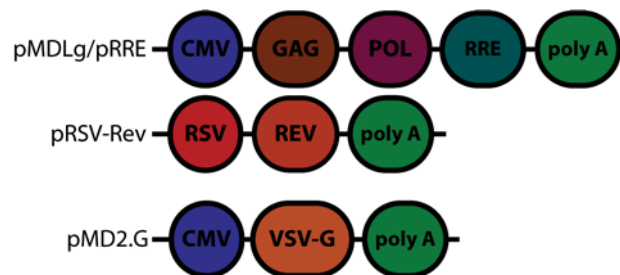


Figura 4. Esquema de los plásmidos empaquetadores de un lentivirus.

Con el objetivo de producir una transducción estable y duradera de células humanas se emplearon lentivirus como estrategia de terapia génica. El sistema disponible en el laboratorio para la producción de stocks lentivirales es de tercera generación, es decir, consta de cuatro plásmidos incluyendo el vector de transferencia:

- Plásmidos que forman el lentivirus *per se* (Fig. 4).
 - pMDLg/pRRE: porta los genes *gag*, codificante de las proteínas estructurales de la cápside del VIH, y *pol*, codificante de la retrotranscriptasa e integrasa del VIH.
 - pRSV-Rev: codifica el regulador post-transcripcional Rev, esencial para la expresión de *gag* y *pol*.
 - pMD2.G: codifica la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que forma parte de la envuelta.
- Vector de transferencia portador del gen de interés.
 - pRRL-luciferasa-IRES-EGFP o pCCL-B12-OKT3-T2A-EGFP. El lentivirus portador del gen reportero luciferasa se utilizó para infectar líneas tumorales, de modo que expresen dicha enzima. De esta forma, al añadir el sustrato luciferina reaccionan emitiendo bioluminiscencia, una habilidad parametrizable que usaremos para calcular indirectamente la viabilidad celular.

A partir de un glicerol stock existente en el laboratorio de bacterias transformadas con el ADN plasmídico, se lanzó un cultivo en 3 mL de medio 2xYT con ampicilina (100 mg/mL) y se incubó *overday* a 37 °C en agitación. Posteriormente se hizo una escalada 1:50 del cultivo y se incubó *overnight* a 37 °C en agitación.

El ADN plasmídico se aisló del cultivo líquido con el kit NZY Maxiprep (NZYtech), en lugar del kit NZY Miniprep, para obtener una mayor concentración de ADN, necesaria para transducir células. El ADN se cuantificó y se determinaron las ratios A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} para evaluar su pureza mediante el espectrofotómetro.

Para generar los lentivirus, se sembraron HEK293T en 6 placas p10 ($4,5 \cdot 10^6$ células/placa) (Corning Life Sciences). 24 h después se realizó la transfección siguiendo el método descrito previamente con el ADN de los 4 plásmidos, por cada placa 14,1 μ g del vector de transferencia, 9 μ g del pMDLg, 3,45 μ g del pRSV y 4,76 μ g del pMD2.G.

A las 48 h, haciendo uso del EPI requerido para manipular productos de biorriesgo tipo 2, se recogió el SN, se centrifugó y se filtró con un filtro de 0,45 µm para eliminar los restos celulares. A continuación, se ultracentrifugó 2 h a 4 °C a 26.500 rpm. El pélet se resuspendió en PBS y las alícuotas se almacenaron a -80 °C.

Para calcular el título del lentivirus se subcultivaron 293T en placa de 24 pocillos (1·10⁵ células/pocillo) y se infectaron haciendo diluciones seriadas del stock lentiviral. A las 48 h, se recogieron las células y se analizó su expresión de EGFP mediante citometría de flujo. El título se calculó en unidades transductoras por mililitro (UT/mL) con la siguiente fórmula, haciendo la media de las 3 diluciones consecutivas que seguían una relación lineal entre el volumen utilizado para la infección y la expresión de EGFP:

$$\text{Título} = \frac{\% \text{ células EGFP}^+}{100} \cdot \frac{\text{n}^\circ \text{ células sembradas}}{V \text{ lentivirus añadido (mL)}}$$

4.10. Transducción de células humanas

4.10.1. MCF-7

Se hizo un subcultivo de MCF-7 en placa 24 pocillos (5·10⁴ células/pocillo). A las 24 h se infectaron con el lentivirus luciferasa a una MOI de 8,6. Se monitorizó la expresión de EGFP de las células transducidas mediante microscopía de fluorescencia y se analizó el porcentaje de expresión mediante citometría de flujo.

4.10.2. Jurkat

Se hizo un subcultivo de JK en placa 24 pocillos (5,14·10⁵ células/pocillo) y se infectaron las células con el lentivirus LiTE B12 a una MOI de 1,5 para generar células STAb-JK B12 siguiendo el procedimiento anterior. A las 144 h y a las 168 h se recogió el SN con el LiTE B12 secretado y se caracterizó mediante ELISA y citometría de flujo de la misma forma que los LiTE presentes en el SN de células 293T transfectadas.

4.10.3. LT

Se hizo un subcultivo de LT en placa 24 pocillos (8,95·10⁵ células/pocillo) incubado durante 24 h con TransACT (20 µL/pocillo) (Miltenyi Biotec), para activar y expandir las células primarias estimulando el CD3 y el CD28. Se infectaron con el lentivirus LiTE B12 a una MOI de 10 para generar células STAb-T B12 siguiendo el procedimiento anterior.

4.11. Ensayo de citotoxicidad

Se sembraron células MCF-7 luc en placa blanca opaca de 96 pocillos (2·10⁴ células/pocillo) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Oberösterreich, Austria). A las 24 h se añadieron LT no transducidos como control negativo de lisis (C-), LT no transducidos junto con el SN LiTE B12 de STAb-JK 168 h o células STAb-T B12 a diferentes ratios E:T (1:25, 1:5, 1:1 y 5:1). Tras 48 horas de cocultivo se eliminó el sobrenadante y se añadió el sustrato de la enzima luciferasa, la β-luciferina (12,5 µg/pocillo) (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.). La bioluminiscencia se cuantificó midiendo las unidades relativas de luminiscencia (RLU, del inglés *relative light unit*) en el luminómetro Infinite 1200 (Tecan, Männedorf, ZH, Suiza).

Para analizar los datos de citotoxicidad, se transformaron los valores RLU para representar el porcentaje de lisis de cada condición respecto al C- utilizando esta ecuación en la que R_{muestra} es cada valor de bioluminiscencia obtenido en RLU para cada réplica de cada condición y R_{control} es la media de las 3 réplicas de la condición C- de cada ratio E:T:

$$\% \text{ lisis} = \left(1 - \frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{control}}} \right) \cdot 100$$

4.12. Análisis estadístico

El número de réplicas biológicas fue limitado por restricciones experimentales, los datos presentados del ensayo de citotoxicidad provienen de triplicados técnicos y deben considerarse como exploratorios. Los datos se analizaron con el software GraphPad PRISM versión 8.0.2. aplicando un test de normalidad Shapiro-Wilk y corroborando la distribución normal también con un gráfico Q-Q y aplicando después un ANOVA multifactorial de efectos fijos balanceado.

5. Resultados

5.1. Búsqueda bibliográfica de V_HH

En la tabla 2 se muestran las secuencias aa de los V_HH anti-cadherina 17 humana clones E8 y Nb289 y el anti-B7-H3 humana, clon B12.

V _H H	AAT diana	Secuencia aa
E8	CDH17	MAVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSILSFNSMGWHRQAPGRQRELVAGISIHKTSSNYANFVKGRFTISRDDAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVQQRGQSRISYWGQGTQVTVSS
Nb289		MAVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSNGMGWFRQAPGTGREFVAAISWNAGTTLYTDSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAREYYGGSYYPSREYEGYWGQGTQVTVSS
B12	B7-H3	QVQLVESGGGSVQVGGSLRLSCAASGFTYNSYSVGVWFRQAPGKEREGVAAINS GGSSTYYAA SVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAARSPSPLTFQTRTLREDSYNYWGQGTQVTVSS

Tabla 2. Secuencias aminoacídicas de los V_HH utilizados en este trabajo.

5.2. Diseño y generación del ADN del vector de expresión lentiviral del LiTE

Para generar el vector de transferencia lentiviral que codifique para los LiTE E8, Nb289 y B12 se disponía en el laboratorio del vector pCCL-Ega1-OKT3-T2A-EGFP (Fig. 5a), a partir del cual se subclonó cada secuencia V_HH del plásmido sintetizado por GeneArt, E8 (Fig. 5b), Nb289 (Fig. 5c) y B12 (Fig. 5d), generando, respectivamente, los plásmidos pCCL-E8-OKT3-T2A-EGFP, pCCL-Nb289-OKT3-T2A-EGFP y pCCL-B12-OKT3-T2A-EGFP.

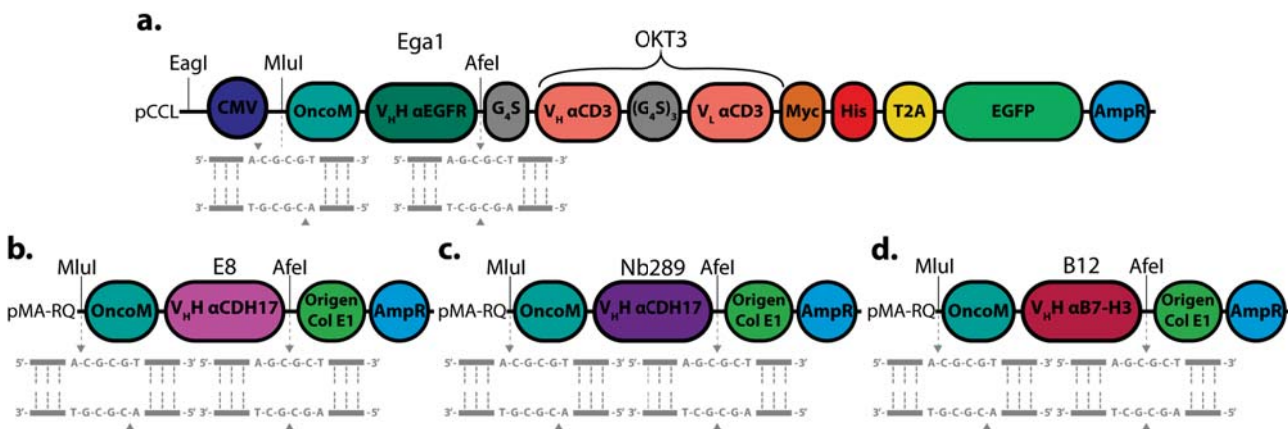


Figura 5. Esquema de la doble digestión con las ER MluI-HF y Afel del plásmido original del laboratorio pCCL-Ega1-OKT3-T2A-EGFP (a) y de cada plásmido sintetizado por GeneArt portador de cada V_HH: E8 (b), Nb289 (c) y B12 (d).

Se obtuvieron concentraciones de ADN plasmídico de cada vector de entre 90 y 272 ng/μL, ratio A_{260}/A_{280} de entre 1,85 y 1,95 y ratio A_{260}/A_{230} de entre 2,14 y 3,1.

5.3. Generación de LiTEs por 293T transfectadas

La línea 293T se transfectó con los plásmidos pCCL-E8-OKT3-T2A-EGFP (Fig. 6a), pCCL-Nb289-OKT3-T2A-EGFP (Fig. 6b) y pCCL-B12-OKT3-T2A-EGFP (Fig. 6c) y confirmó la expresión de EGFP por microscopía de fluorescencia a las 48 h. Se recogieron los sobrenadantes (SN) que contenían los LiTEs para caracterizarlos.

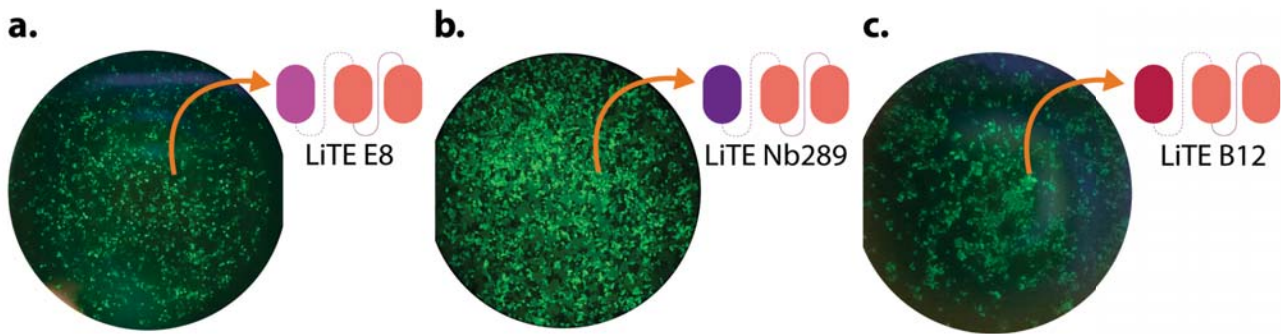


Figura 6. Células 293T transfectadas (48 h) con pCCL-E8-OKT3-T2A-EGFP (a), pCCL-Nb289-OKT3-T2A-EGFP (b) y pCCL-B12-OKT3-T2A-EGFP (c) con sus respectivos LiTEs secretados al sobrenadante.

5.4. Caracterización de los LiTE secretados por las 293T transfectadas

5.4.1. LiTE anti-CDH17

Para confirmar la presencia de los LiTEs anti-CDH17 (α CDH17) en el SN de 293T transfectadas se realizó un western blot (WB) para confirmar la presencia de los mismos y su peso molecular. Como podemos apreciar en la figura 7, únicamente el SN con LiTE E8 da una ligera señal de tamaño compatible con el teórico de 42,5 KDa, calculado con ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

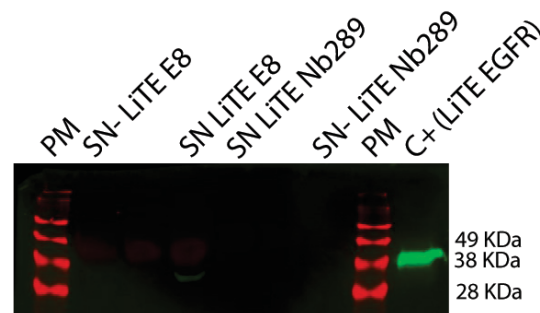


Figura 7. Imagen de WB del SN de 293T transfectadas para expresar LiTEs anti-CDH17. En color rojo el marcador de peso molecular (PM) y en verde 1 μ L del LiTE anti-EGFR como control positivo (C+) y 16 μ L de cada SN o SN- como control negativo.

Posteriormente se llevaron a cabo ensayos ELISA para evaluar el reconocimiento de CDH17 purificada. Tal como se muestra en la figura 8, parece que el LiTE E8 reconoce en cierta medida la CDH17 purificada, pues la absorbancia es ligeramente superior a la del C- (Fig. 8a). En cambio, el LiTE Nb289 no muestra un reconocimiento apreciable de la CDH17 purificada (Fig. 8b).

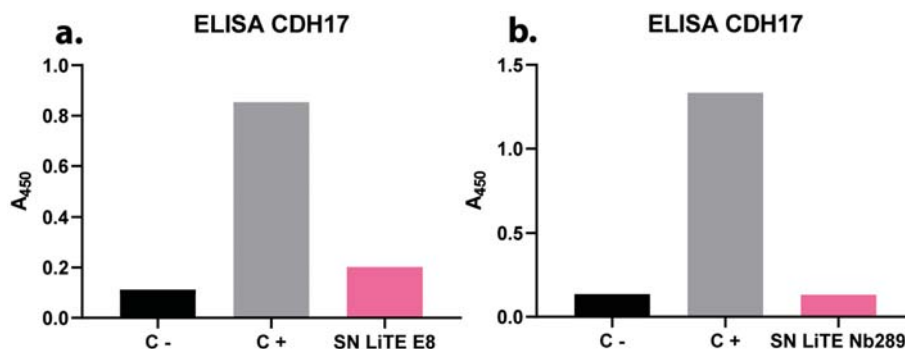


Figura 8. Análisis ELISA de la interacción del LiTE E8 (a) y del LiTE Nb289 (b) con la proteína CDH17 purificada. Como control negativo (C-) se usó el SN- y como control positivo (C+) el mAb IgG1 de ratón α CDH17 humana.

También se realizaron ensayos de citometría de flujo para caracterizar la expresión de CDH17

en la línea tumoral MKN-45 con el mAb IgG1 de ratón α CDH17 humana como control positivo. Para testar la unión de los LiTEs a la CDH17 expresada en la membrana de MKN-45, estas se incubaron con los SN LiTE E8 y SN LiTE Nb289. Para analizar la unión al CD3 en la membrana de células Jurkat (JK), estas células también se incubaron con los SN LiTE E8 y SN LiTE Nb289. En la figura 9 podemos observar que el 99,1 % de MKN-45 expresan CDH17 (Fig. 9a), como era de esperar según los niveles de ARNm de la línea consultados en The Human Protein Atlas, 22,6 *normalized transcripts per million* (nTPM). Sin embargo, tanto el SN LiTE E8 (Fig. 9b) como del SN LiTE Nb289 (Fig. 9c) no llegan a unirse a un 1 % de las células CDH17⁺. Contrariamente, los LiTE sí reconocen el CD3 de JK, uniéndose el SN LiTE E8 (Fig. 9d) al 51,3 % de las mismas y el SN LiTE Nb289 (Fig. 9e) al 28 %. Esto indica finalmente que los LiTE han sido secretados al medio por las 293T y que el dominio de unión α CD3 es funcional, pero los V_HHs E8 y Nb289 no lo son.

Basándonos en estos resultados, no se seleccionó ningún LiTE α CDH17 para llevar a cabo los ensayos funcionales con linfocitos T primarios.

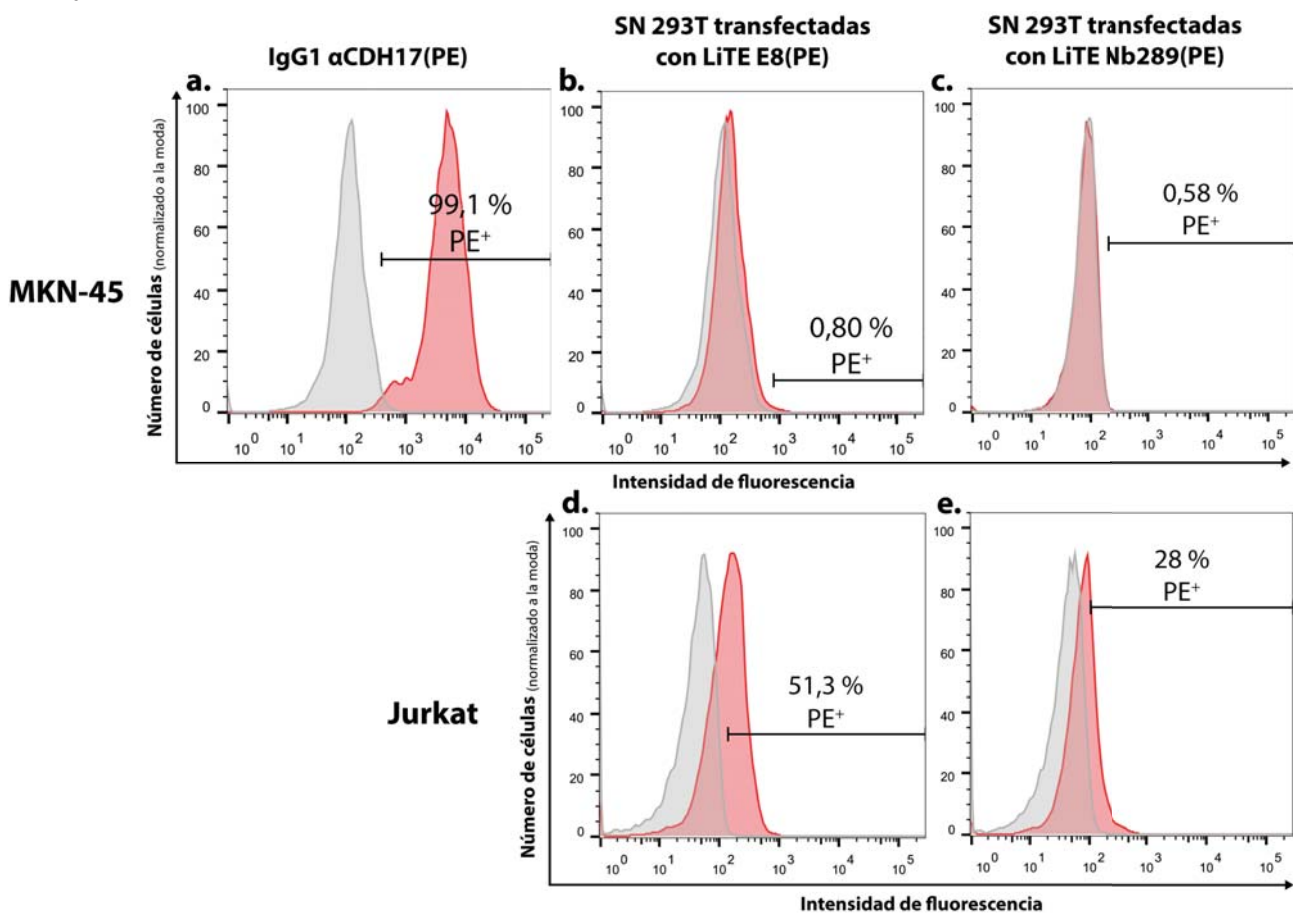
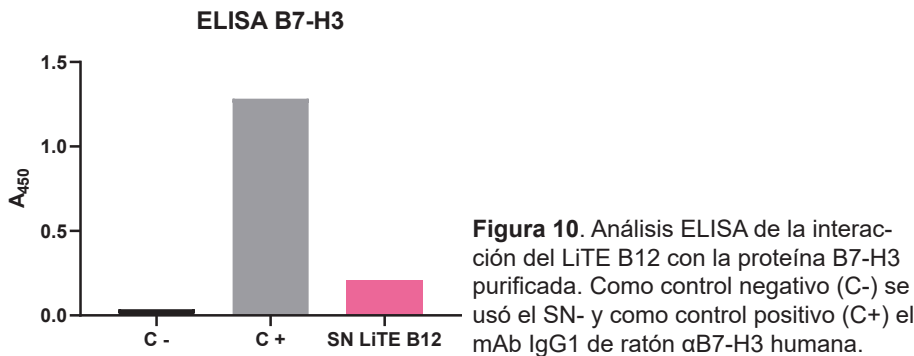


Figura 9. Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de CDH17 en MKN-45 (a) y de la unión a CDH17 de los LiTE E8 (b) y Nb289 (c) presentes en el SN. Análisis de unión a CD3 de Jurkat del LiTE E8 (d) y Nb289 (e).

5.4.2. LiTE anti-B7-H3

Una vez recogido el SN de 293T transfectadas que contenía el LiTE B12 se procedió a hacer ELISA frente a B7-H3 inmovilizada en placa para comprobar el reconocimiento del AAT purificado. Como podemos ver en la figura 10, parece que el LiTE B12 reconoce levemente la B7-H3 purificada.

Con el fin de explorar si este reconocimiento se traduce también en unión a células que expresan B7-H3 en su superficie celular, se consultaron los niveles de expresión génica y se analizaron mediante citometría de flujo los niveles proteicos de B7-H3 en distintas líneas celulares. Según The Human Protein Atlas, los niveles de expresión de ARN de B7-H3 son de 40,8 nTPMs en MKN-45 y



y 68,7 nTPMs en MCF-7. Los niveles de expresión proteica en estas líneas fueron comprobados mediante citometría de flujo, incubando las células con el mAb IgG1 de ratón anti-B7-H3 humana. Se observó que prácticamente la totalidad de MKN-45 (Fig. 11a) y MCF-7 (Fig. 11b) expresan B7-H3, aunque las MCF-7 presentan una intensidad de fluorescencia un orden de magnitud mayor que en el caso de MKN-45, lo que indica una mayor densidad de B7-H3 en su superficie. Esto podría explicar que el SN LiTE B12 se una en menor medida a las MKN-45 (5,08%, Fig. 11c), que a las MCF-7 (50,6 %, Fig. 11d). Como cabía esperar, el SN LiTE B12 se une eficazmente al CD3 de JK, con un 43,3 % de células positivas (Fig. 11e), un resultado comparable al de los LiTES α CDH17.

Teniendo en cuenta los resultados prometedores del SN LiTE B12 en citometría de flujo, se seleccionó este LiTE para proceder con los ensayos funcionales con linfocitos T primarios.

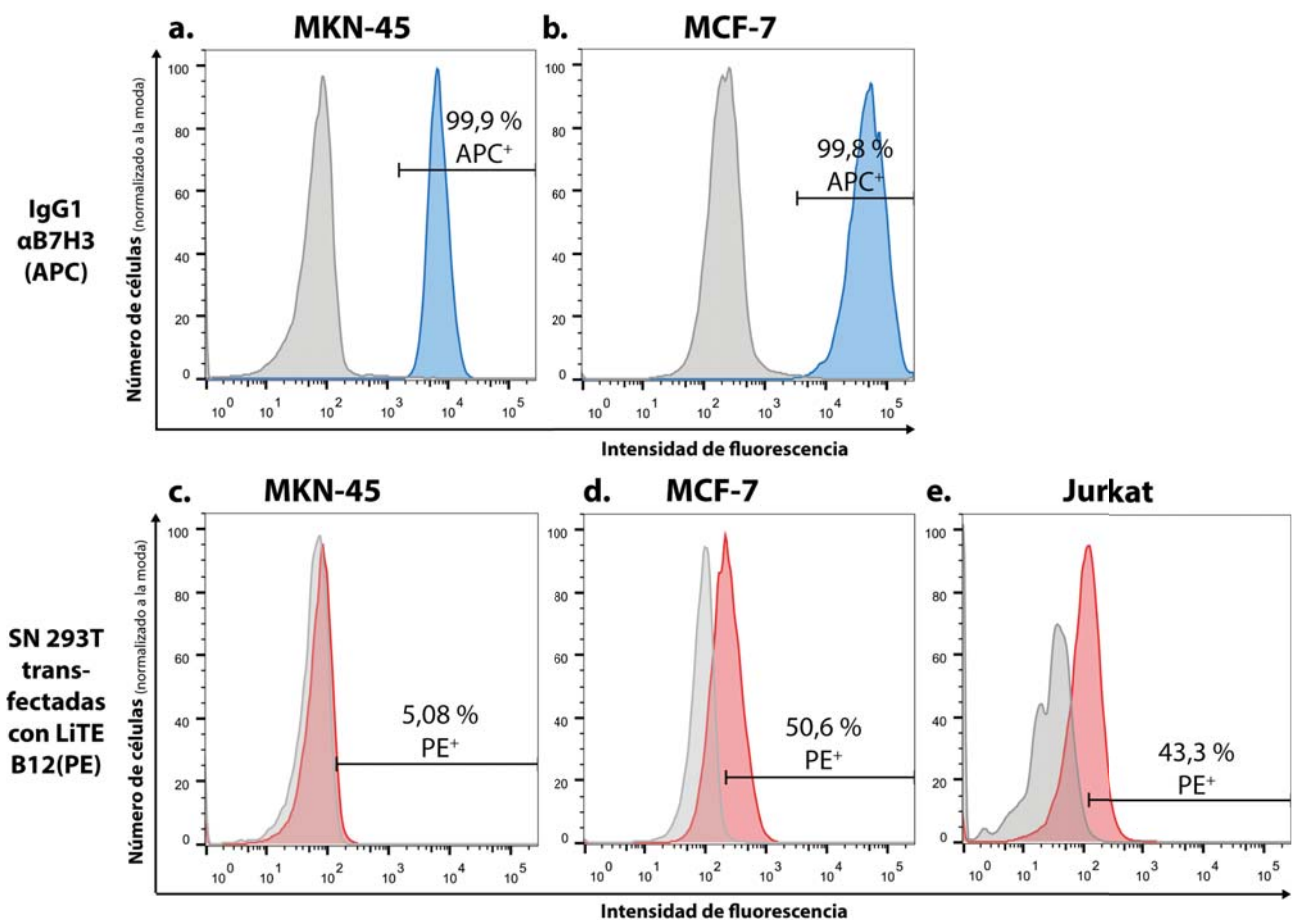


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de B7-H3 en MKN-45 (a) y MCF-7 (b) y de la unión a B7-H3 del SN LiTE B12 en MKN-45 (c) y MCF-7 (d). Análisis de unión al CD3 de Jurkat del SN LiTE B12 (e).

5.5. Activación de Jurkat

Con el objetivo de evaluar la capacidad del LiTE B12 secretado por las 293T transfectadas para activar

específicamente las células T en presencia de células tumorales B7-H3⁺, se analizó la expresión del marcador de activación temprano CD69 de células JK cocultivadas con MKN-45 o MCF-7 por citometría de flujo. Asimismo, se monitorizó la expresión de B7-H3 en las JK, puesto que se ha descrito la inducción de puntos de control inmunitario utilizados como AAT en células T activadas [27]. Como controles negativos se incluyeron condiciones en monocultivo y cocultivo con SN-.

En la figura 12 podemos observar que el 14,6 % de las JK expresan basalmente CD69 (Fig. 12a) sin expresar B7-H3 (Fig. 12b).

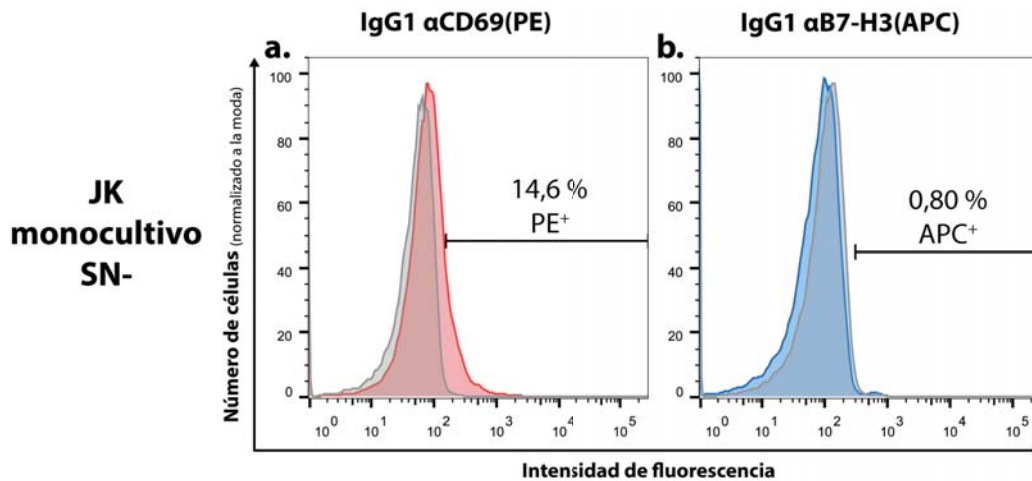


Figura 12. Análisis por citometría de flujo de los niveles de CD69 (a) y B7-H3 (b) de JK incubadas con SN- en ausencia de LiTE B12.

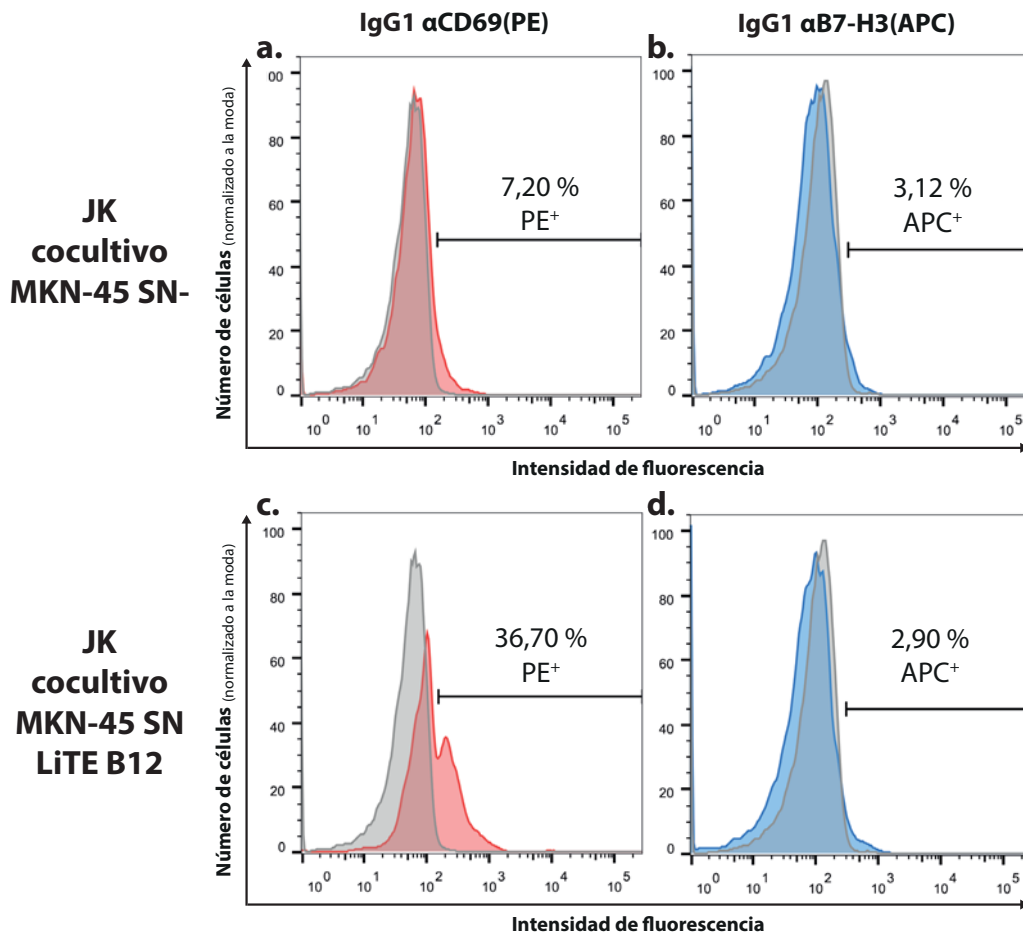


Figura 13. Análisis por citometría de flujo de los niveles de CD69 y B7-H3 de JK cocultivadas con MKN45: a. nivel de CD69 basal; b. nivel de B7-H3 basal; c. expresión de CD69 en presencia de SN LiTE B12; d. nivel de B7-H3 en presencia de SN LiTE B12.

En el caso del cocultivo con MKN-45 con SN-, se activan basalmente el 7,2 % de las JK (Fig.13a) y un 3,12 % expresan B7-H3 (Fig.13b); mientras que cuando se cocultivan en presencia del SN LiTE B12, el 36,7 % se activan (Fig. 13c) e igualmente siguen sin expresar B7-H3 (2,9 %, Fig. 13d).

Cuando las JK se cocultivan con MCF-7 con SN-, el 9,47 % expresan CD69 de forma basal (Fig.14a) y un 24,9 % expresan B7-H3 (Fig. 14b); mientras que cuando se cocultivan en presencia del SN LiTE B12, se activan en gran medida (85,2 %, Fig. 14c) y el 38,3 % expresan B7-H3 (Fig. 14d).

La expresión basal de CD69 en JK en ausencia de SN LiTE B12 puede deberse a que las células estaban contaminadas por *Mycoplasma spp.*, información que reveló una PCR hecha *a posteriori*.

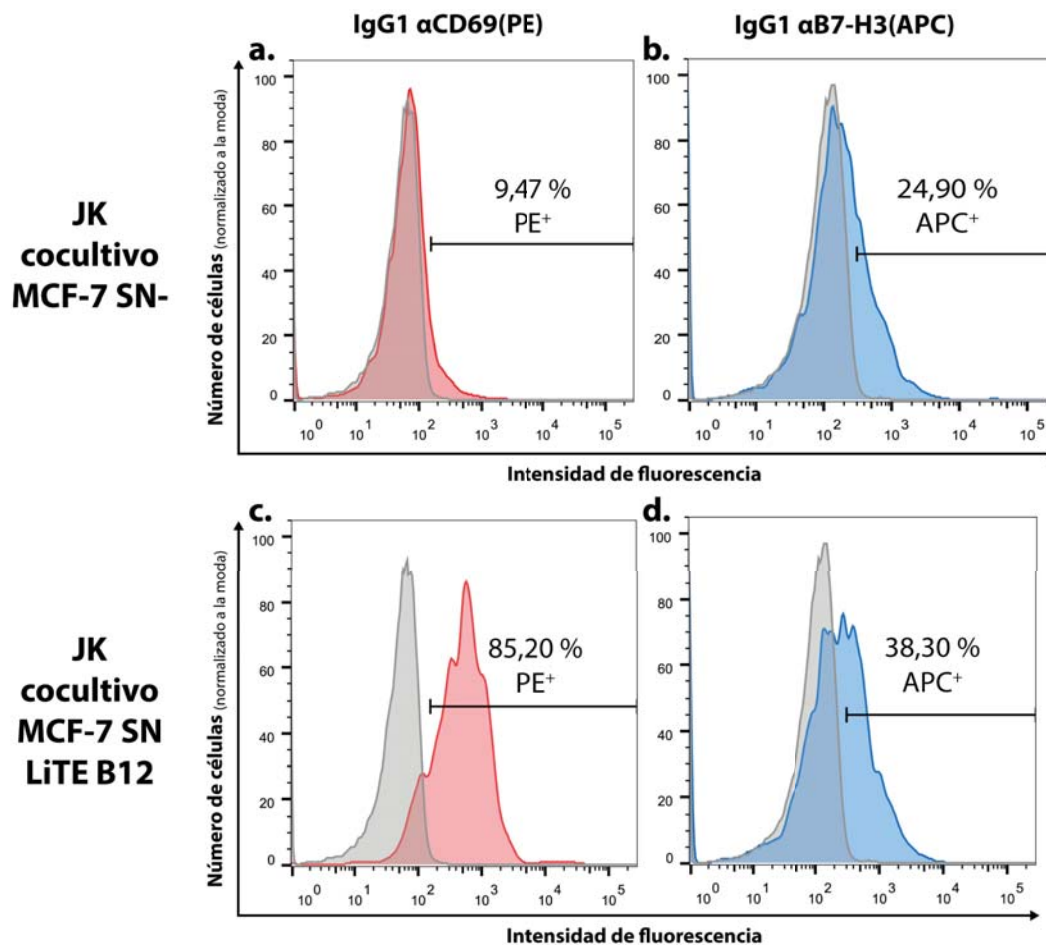


Figura 14. Análisis por citometría de flujo de los niveles de CD69 y B7-H3 de JK cocultivadas con MCF-7: a. expresión basal de CD69 ; b. nivel de B7-H3 en ausencia de SN LiTE B12; c. expresión de CD69 en presencia de SN LiTE B12; d. nivel de B7-H3 en presencia de SN LiTE B12 .

5.6. Generación de partículas lentivirales

Con el objetivo de producir células tumorales con el gen reportero luciferasa y células secretoras del LiTE B12 (STAb B12) de forma estable y duradera, se empleó la terapia génica lentiviral de tercera generación.

Comenzamos obteniendo concentraciones de ADN plasmídico de entre 1218 y 3595 ng/μL, ratio A_{260}/A_{280} de entre 1,88 y 2,32 y ratio A_{260}/A_{230} de entre 1,90 y 2,32. Se cotransfectaron células 293T con los 3 plásmidos empaquetadores, pMDLg/pRRE, pRSV-Rev y pMD2.G, y el vector de transferencia génica, pRRL-luciferasa-IRES-EGFP o pCCL-B12-OKT3-T2A-EGFP, para generar las partículas lentivirales. El SN se ultracentrifugó para concentrar las partículas lentivirales y los stocks se titularon midiendo por citometría de flujo la expresión de EGFP de las 293T infectadas con diluciones seriadas de cada uno (Fig. 15).

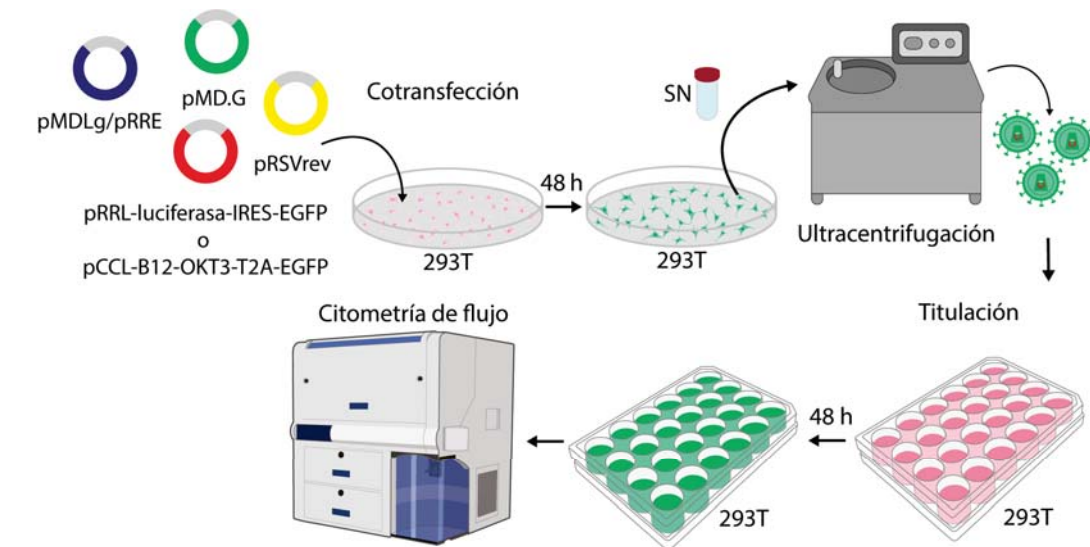


Figura 15. Esquema generación partículas lentivirales.

Para el lentivirus luciferasa (Fig. 16a) se seleccionaron las células infectadas con las diluciones 1/1000, 1/2000 y 1/4000, se calculó el título para cada una de ellas y se hizo la media, obteniendo un título de $2,854 \cdot 10^7$ UT/mL. En el caso del lentivirus LiTE B12 (Fig. 16b) se seleccionaron las células infectadas con las diluciones 1/4000, 1/8000 y 1/16000, obteniendo un título de $1,2841 \cdot 10^8$ UT/mL.

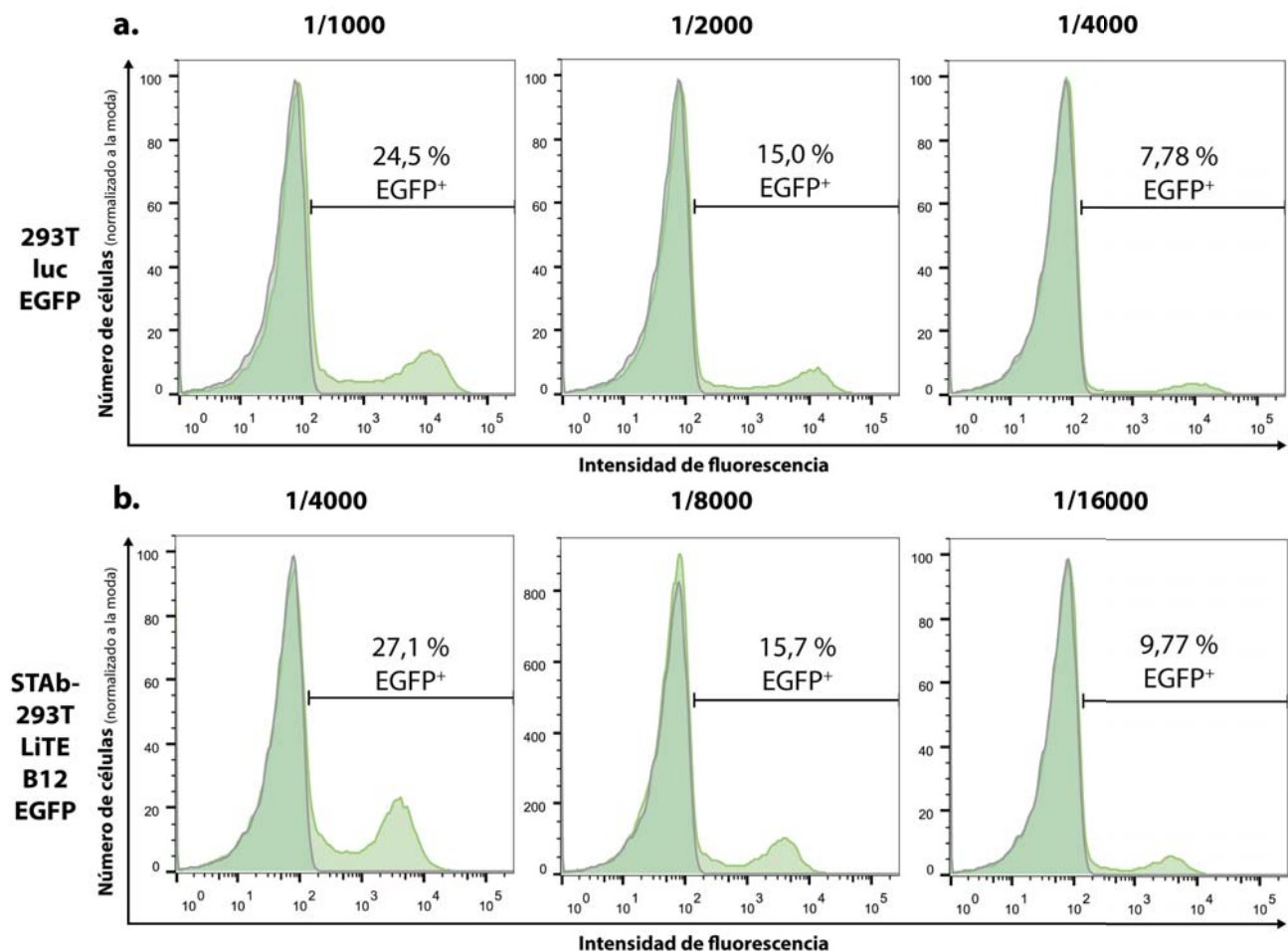


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de la expresión de EGFP de células 293T transducidas con diluciones seriadas de los stocks lentivirales luciferasa y LiTE B12. Se seleccionaron las células infectadas con las diluciones 1/1000, 1/2000 y 1/4000 para calcular el título del lentivirus luciferasa (a) y las infectadas con las diluciones 1/4000, 1/8000 y 1/16000 para calcular el título del lentivirus LiTE B12 (b).

5.7. Transducción de células humanas

Después de transducir en dos ocasiones las células MCF-7 con el lentivirus luciferasa a una MOI de 8,6, el 7,66 % de las MCF-7 expresaba EGFP (Fig. 17). Este nivel de eficacia de transducción fue suficiente para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad basados en bioluminiscencia.

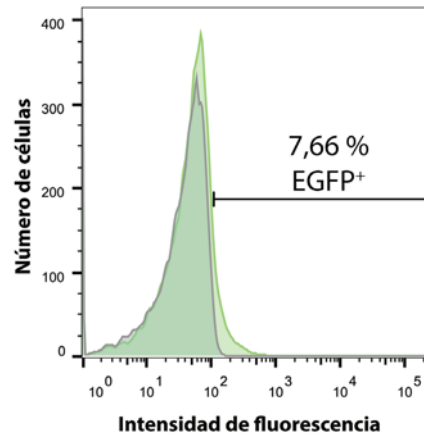


Figura 17. Análisis por citometría de flujo de la expresión de EGFP en células MCF-7 infectadas con el lentivirus luciferasa.

La eficacia de transducción de JK con el lentivirus LiTE B12 a una MOI de 1,5 fue del 84,7 % (Fig. 18a). En el caso de linfocitos T primarios (LT), utilizando una MOI de 10 la eficiencia fue de 1,67 % (Fig. 18b), ya que este valor varía mucho dependiendo de la calidad de los LT de cada paciente.

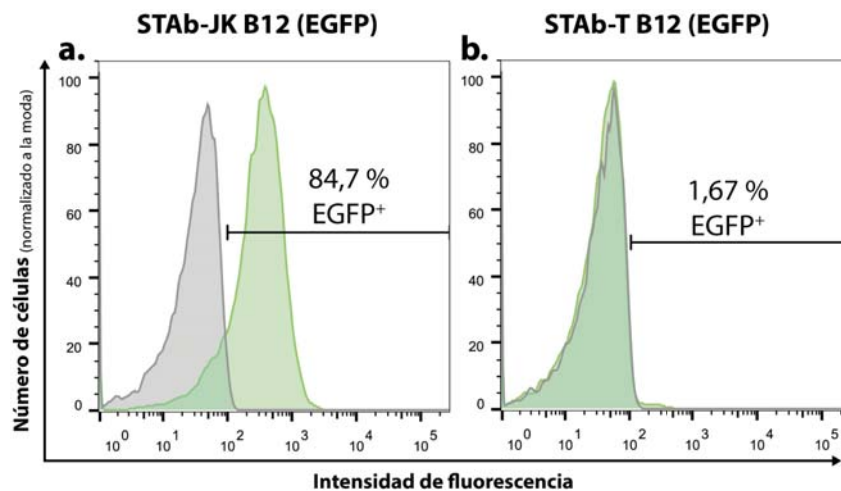


Figura 18. Análisis por citometría de flujo de la expresión de EGFP en células STAb-JK B12 (a) y STAb-T B12 (b).

5.7.1. Caracterización del LiTE anti-B7-H3 secretado por las STAb-JK B12

Se recogió el SN secretado por las STAb-JK B12 a las 144 h y a las 168 h para posteriormente ser utilizado en el ensayo de citotoxicidad.

Se llevó a cabo ELISA de B7-H3 para comprobar el reconocimiento del AAT purificado. A pesar de que mediante esta técnica no se detectó una señal evidente (Fig. 19a), mediante citometría de flujo los LiTE B12 secretados por las STAb-JK a las 168 h mostraron la unión a B7-H3, expresada en la membrana de la línea tumoral MCF-7 (11,9 %, Fig. 19b), así como al CD3 de LT (16 %, Fig. 19c). El SN de STAb-JK recogido a las 144 h no mostró reconocimiento por ninguna de sus dianas.

El menor porcentaje de unión a la superficie de las células diana entre LiTE B12 secretado por

STAb-JK B12 y el secretado por las 293T transfectadas podría deberse a que la línea celular 293T está optimizada para la producción de proteínas y las JK no.

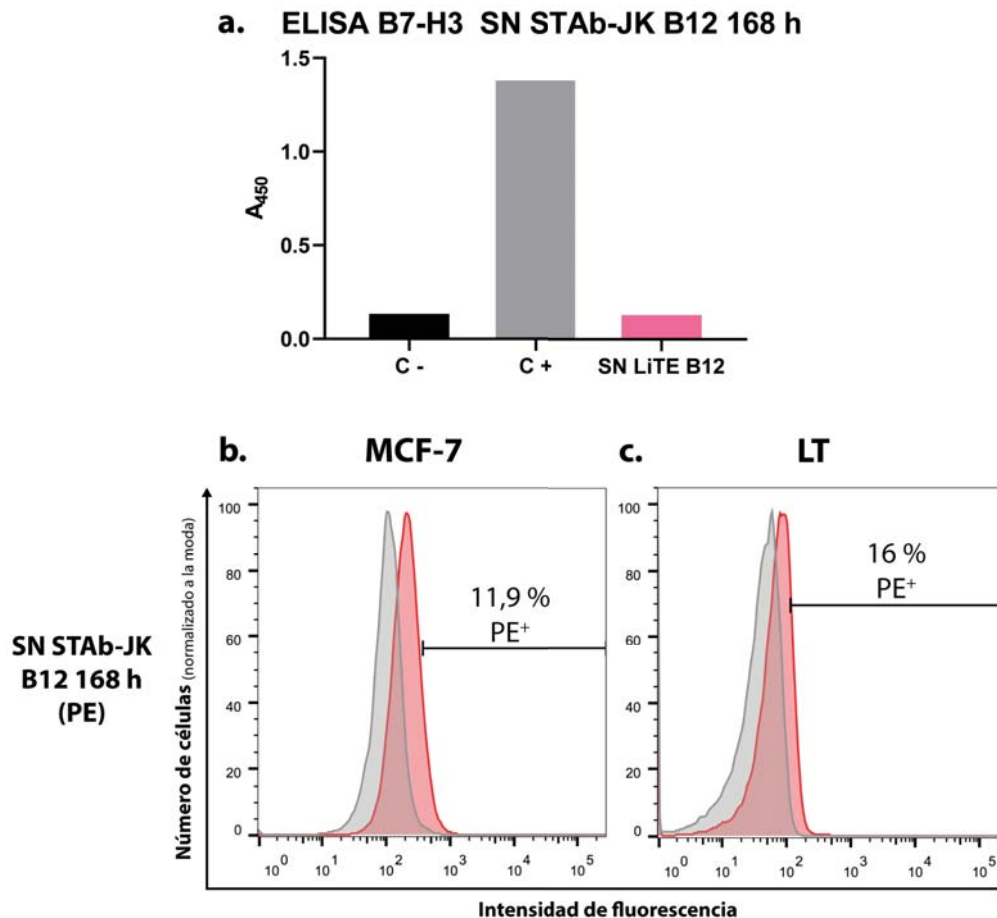


Figura 19. Caracterización del LiTE B12 secretado por STAb-JK B12. Ensayo ELISA de la interacción del LiTE B12 con la proteína B7-H3 purificada. Como control negativo (C-) se usó PBS y como control positivo (C+) el mAb IgG1 de ratón α B7-H3 humana (1,25 ng/ μ L) (a). Análisis por citometría de flujo de la unión del SN LiTE B12 secretado por STAb-JK B12 a las 168 h de la transducción en MCF-7 (b) y LT (c).

5.8. Citotoxicidad

Finalmente, se evaluó la capacidad citotóxica de las células STAb-T B12 y de LT no transducidos (NT) en presencia del SN LiTE B12 de STAb-JK B12 168 h en cocultivo con las células MCF-7 luc frente a los LT NT también en cocultivo como control negativo de lisis. Se testaron 4 ratios E:T (1:25, 1:5, 1:1, 5:1).

Dado que en el análisis de citotoxicidad el tamaño muestral ($n=3$) es demasiado reducido para que el test de normalidad Shapiro-Wilk sea completamente robusto, se complementó con el gráfico QQ (Fig. 20), que concuerda con el resultado no significativo del test de Shapiro-Wilk (p -valor $>0,05$). De esta forma se confirma la adecuación de los datos a una distribución normal.

En la figura 21 podemos observar que los LT NT en presencia del SN LiTE B12 produjeron la lisis significativa de MCF-7 igual o superior al 50%, desde la ratio menos favorable hasta la más favorable (p -valor $<0,0001$). Por su parte, las STAb-T B12 también produjeron una lisis significativa del 28 % de las MCF-7 en la ratio 1:25 (p -valor=0,0012), aumentando este valor por encima del 70 % de lisis a ratios 1:5, 1:1 y 5:1 (p -valor $<0,0001$).

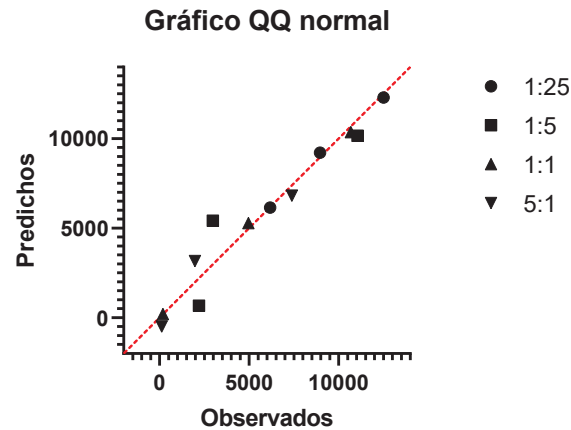


Figura 20. Gráfico QQ que muestra la distribución de los residuos del ensayo de citotoxicidad en células MCF-7 frente a la distribución normal teórica. Los puntos siguen aproximadamente la línea diagonal, lo que indica la ausencia de desviaciones importantes respecto a la normalidad, así como de valores atípicos extremos.

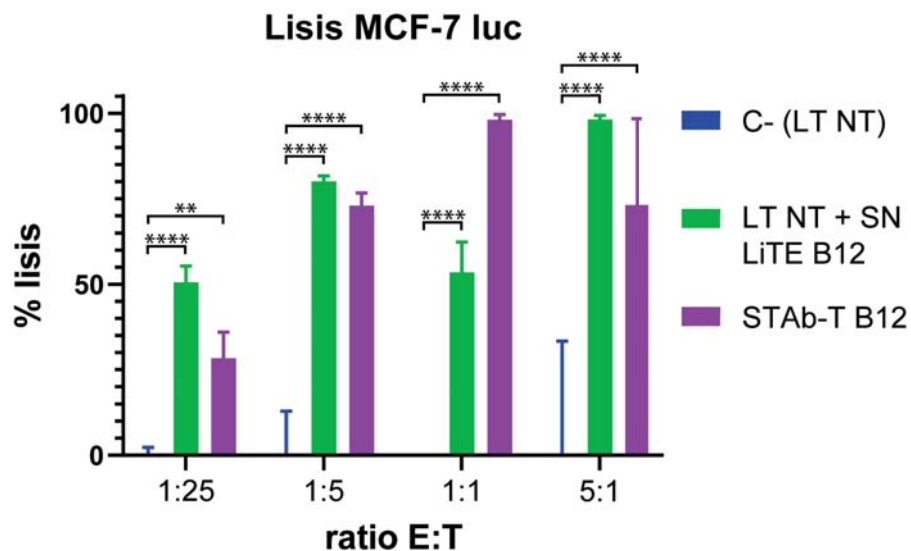


Figura 21. Ensayo de citotoxicidad de células MCF-7 por parte de linfocitos T primarios en presencia del LiTE B12 del SN de STAb-JK B12 a 168 h de incubación (verde) y de células STAb-T B12 (violeta) a distintos ratios E:T (1:25, 1:5, 1:1 y 5:1). Los valores RLU se muestran transformados para representar el porcentaje de lisis respecto al control negativo (C-), la bioluminiscencia de las células tumorales en cocultivo con linfocitos T primarios no transducidos en ausencia de LiTE B12: **, p-valor=0,0012; ****, p-valor<0,0001.

6. Discusión

La inmunoterapia del cáncer surgió en la década de 1990 como una alternativa terapéutica que activa o estimula el sistema inmunitario para atacar a las células tumorales, presentando en muchos casos menos efectos secundarios que las terapias convencionales [1]. Entre las herramientas inmunoterapéuticas más destacadas se encuentran los mAb monoespecíficos, en especial las IgG1, gracias a su larga vida media, su potente función efectora y su elevada homogeneidad estructural. Con un tamaño aproximado 146 KDa, las IgG1 han servido como base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, modificando cada parte de su estructura para mejorar sus características. Un ejemplo es la generación de anticuerpos biespecíficos (BsAb) [3].

Los BsAb se unen de forma monovalente a dos epítomos diferentes. Dentro de esta categoría, los *T cell engagers* (TCE) han cobrado gran relevancia por su capacidad para redirigir linfocitos T (LT) frente a un antígeno de una célula tumoral. Promueven la activación de LT mediante la formación de una sinapsis inmune (SI), desencadenando la expansión policlonal de los LT y un potente efecto citotóxico [3].

Sin embargo, los TCE no están exentos de inconvenientes, principalmente por la potencial toxicidad *on-target off-tumor*. La toxicidad asociada a los TCE también puede producirse por la activación inespecífica de los LT debido a la agregación del TCE o la unión de la región Fc al FcγR de las APCs que induce CRS por la sobreactivación de LT [5]. Para paliar estos efectos adversos, los TCE de nueva generación tienen silenciada esta parte de la región Fc, lo que reduce la activación inespecífica. Actualmente, se han generado TCE de menor tamaño eliminado la región Fc, lo que acorta su vida media al eliminar el reciclaje asociado a la región FcRn [4]. El blinatumomab, el único TCE sin Fc comercializado, requiere administración cada 2 h para mantener la concentración plasmática terapéutica [2].

Los BsAbs sin Fc pueden estar formados por diferentes tipos de fragmentos de anticuerpo. En este trabajo generamos TCE biespecíficos de pequeño tamaño en formato LiTE, con un dominio scFv anti-CD3 y un V_H anti-AAT. Este formato presenta ventajas para tratar tumores sólidos, puesto que penetran mejor en el tejido tumoral [5].

En el presente estudio se evaluaron dos AAT como dianas terapéuticas: CDH17 y B7-H3, ambos sobreexpresados en diversos tipos de tumores sólidos, entre ellos cáncer gástrico (CG) y cáncer de mama (CM). La CDH17 participa en la adhesión intercelular y, en tejidos sanos, se localiza en las membranas laterales de las células epiteliales del intestino delgado y el colon. En contraste, su expresión se ve aumentada en tumores en estado avanzado y metastásicos debido a su implicación en la TEM, adoptando una disposición difusa a lo largo de toda su membrana [21]. Esto hace que la CDH17 sea una diana atractiva porque no provocaría toxicidad *on-target off-tumor*. Por su parte, la B7-H3 principalmente cumple funciones inmunomoduladoras, inhibiendo la inmunidad adaptativa al suprimir la activación y proliferación de LT en adultos. Su expresión en tejidos sanos es muy limitada debido a mecanismos de regulación postraduccional, mientras que en células tumorales no solo inhibe la respuesta inmune específica frente al AT, sino que también promueve la tumorigénesis a través de mecanismos no inmunológicos, como la activación de la vía JAK/STAT.

Con el objetivo de generar TCE específicos frente a estos AAT, se diseñaron tres construcciones en formato LiTE: LiTE E8 y LiTE Nb289 —dirigidos contra CDH17— y LiTE B12 —anti-B7-H3.

Nuestros resultados muestran que, aunque los LiTEs dirigidos contra CDH17 (E8 y Nb289) eran capaces de unirse a la línea celular Jurkat mediante el dominio scFv anti-CD3, los V_H anti-CDH17 no reconocían de forma eficaz a la línea tumoral CDH17⁺ empleada, lo que sugiere una baja afinidad de ambos V_H por el AAT, pero esta puede ser suficiente para otras aproximaciones terapéuticas [24, 25]. En contraste, el LiTE B12 sí mostró unión específica a líneas tumorales B7-H3⁺, por lo que fue seleccionado para continuar con los ensayos funcionales con LT.

El uso de la terapia celular adoptiva (TCA) modificando genéticamente LT permite el tratamiento con una dosis única [13]. Es conocido el éxito clínico de la TCA mediante células CAR-T en tumores

hematológicos. Sin embargo, esta terapia está asociada a un CRS más severo que el de los TCE, su eficacia se reduce cuando se aplica a tumores sólidos [5] e inducen una SI no canónica [13, 15].

La combinación de terapias basadas en anticuerpos y células inmunes es una estrategia de inmunoterapia prometedora. En este trabajo generamos células STAb-T modificando LT mediante terapia génica lentiviral para que integren el gen codificante del LiTE y lo secreten. El formato LiTE de pequeño tamaño facilita la manipulación genética de los LT y su producción. La TCA con STAb-T presenta dos principales ventajas frente a la CAR-T, producen una SI canónica y, a mayores, producen el conocido como efecto *bystander*, reclutando con el TCE secretado LT no modificados. Un estudio publicado en 2025 [17] demuestra que células STAb-T con la misma diana que células CAR-T tienen mayor eficacia a ratios E:T bajas, lo que podría reducir la dosis de administración.

La terapia génica *ex vivo* con vectores retrovirales es la más usada y efectiva actualmente para generar CAR-T, ya que el transgén se integra en el genoma de la célula y permite una expresión sostenida en el tiempo. Podemos observar el efecto de este fenómeno en el análisis de la secreción del LiTE B12 en el SN de células STAb-JK B12, pues aumenta con el tiempo de incubación.

No obstante, esta técnica presenta algunas limitaciones, como la posibilidad de mutagénesis insercional (aunque no se han documentado casos clínicos), el tamaño límite del transgén (~ 10 kb) y una eficiencia variable de transducción entre pacientes, debida a diferencias de calidad de los LT obtenidos [28].

Un requisito necesario para infectar LT con el lentivirus así como para desencadenar su efecto citotóxico, es activar estas células. Para evaluar la capacidad de activación de JK por parte del LiTE B12, se realizaron cocultivos de JK con líneas tumorales B7-H3⁺. Además, también se ha analizado la expresión de la propia B7-H3 en las JK activadas, ya que se ha descrito su inducción en células T, B y NK estimuladas *in vitro* [29], así como la de otros puntos de control inmunitarios utilizados como AAT en inmunoterapia del cáncer [27]. En cocultivo con la línea de CG MKN-45 el TCE es capaz de inducir activación de LT de forma específica sin promover la expresión significativa de B7-H3. Por otro lado, en el cocultivo con la línea de CM MCF-7 refleja una mayor activación global de las JK, así como una regulación inducida de B7-H3 como respuesta secundaria a la estimulación.

En el ensayo de citotoxicidad, las células STAb-T B12 mostraron una potente capacidad lítica frente a células MCF-7 B7-H3⁺ ya desde la ratio E:T 1:25. Esto indica que los LT modificados con el transgén LiTE B12 no solo secretan activamente el TCE, sino que además son capaces de inducir muerte celular en células de CM, confirmando su funcionalidad *in vitro*. Esto no es compatible con el fratricidio que sugerirían los resultados de expresión de B7-H3 del experimento de activación, sobre todo a los ratios E:T más bajos. Una posible explicación sería que el nivel de B7-H3 inducido en JK por las MCF-7 puede ser transitorio e insuficiente para provocar una respuesta citotóxica significativa por parte de células STAb-T.

En el futuro sería interesante generar una construcción en formato TriTE que combine el LiTE anti-B7-H3 desarrollado en este trabajo con un LiTE anti-HER2 que actualmente está siendo estudiado en el laboratorio, con el objetivo de evitar el escape tumoral por pérdida de AAT y reducir aún más la posible toxicidad *on-target off-tumor*. Sin embargo, este diseño del nuevo transgén deberá optimizarse cuidadosamente debido a la limitada capacidad de inserción de los vectores lentivirales.

Asimismo, varios estudios previos han demostrado que la topología de los V_HH en construcciones multiespecíficas influye notablemente en su afinidad y estabilidad. Dependiendo de la posición del V_HH en el extremo N-terminal o C-terminal pueden variar la accesibilidad de los CDRs y la interacción con el antígeno. En próximos estudios se podrían rediseñar los LiTE E8 y Nb289 colocando los V_HH en posición C-terminal para determinar si su afinidad por la proteína CDH17 mejora. Aunque algunos trabajos sugieren que los V_HH dirigidos contra AAT tienden a funcionar mejor en la posición N-terminal, mientras que los dirigidos frente a CD3 presentan mayor tolerancia posicional [9, 30], estas preferencias podrían depender de las propiedades específicas de cada V_HH.

7. Conclusiones

La modificación de LT autólogos para codificar un LiTE —capaz de redirigir LT modificados y no modificados contra células tumorales específicamente— podría suponer una alternativa terapéutica a la administración intravenosa de TCE y la terapia CAR-T.

1. Se localizaron V_HH frente a los AAT CDH17 —E8 y Nb289— y B7-H3 —B12.
2. Cada V_HH se subclonó en un vector de transferencia lentiviral junto al scFv anti-CD3, resultando en los plásmidos codificantes de los TCE en formato LiTE.
3. La transfección de HEK293T con el ADN plasmídico permitió la expresión del LiTE en el sobrenadante.
4. Caracterización de los LiTE:
 - LiTE E8
 - Detectado débilmente mediante WB y ELISA.
 - No mostró una unión a CDH17 en MKN-45 pero sí al CD3 de Jurkat.
 - LiTE Nb289
 - No detectado mediante WB ni ELISA.
 - No mostró unión a CDH17 en MKN-45 pero sí al CD3 de Jurkat.
 - LiTE B12
 - Unión moderada a B7-H3 mediante ELISA.
 - Unión bastante significativa a B7-H3 en MCF-7. En comparación, su unión a MKN-45 fue notablemente menor. También se unió al CD3 de Jurkat.
5. El LiTE B12 activó Jurkat cocultivadas con MKN-45 y más intensamente con MCF-7, dada su mayor densidad de B7-H3.
6. La producción de stocks lentivirales luciferasa y LiTE B12 fue eficiente, obteniendo títulos elevados.
7. Se generaron STAb-Jurkat y STAb-T mediante transducción lentiviral eficiente en Jurkat y limitada en LT primarios.
8. Las STAb-T B12 mostraron citotoxicidad frente a MCF-7 en todas las condiciones testadas.

7. Conclusions

Genetic modification of autologous T cells in order to encode a LiTE —capable of redirecting both modified and unmodified T cells specifically against tumor cells— could represent a therapeutic alternative to the intravenous administration of TCE and CAR-T therapy.

1. V_H targeting TAA CDH17 —E8 and Nb289—, and B7-H3 —B12— were selected.
2. Each V_H sequence was subcloned into a lentiviral transfer vector with the anti-CD3 scFv, resulting in the plasmids encoding for TCE in LiTE format.
3. HEK293T were transfected with plasmid DNA leading to the presence of LiTE in cell supernatant.
4. LiTEs characterization:
 - E8 LiTE
 - Slightly detected by WB and ELISA.
 - Inefficient binding to CDH17 on MKN-45, but effective binding to CD3 Jurkat.
 - Nb289 LiTE
 - Not detected by WB nor CDH17 ELISA.
 - It did not bind to CDH17 on MKN-45 but did bind to CD3 on Jurkat.
 - B12 LiTE
 - Moderate binding to B7-H3 by ELISA.
 - Significantly stronger binding to B7-H3 on MCF-7. In contrast, its binding to MKN-45 was notably subtler. It also bind to Jurkat CD3.
5. B12 LiTE activates Jurkat when cocultured with MKN-45, and strongly with MCF-7, given their higher density of B7-H3.
6. Luciferase and LiTE B12 lentiviral stocks were efficiently produced, yielding high titers.
7. STAb-Jurkat and STAb-T cells were generated by lentiviral transduction, which was efficient in Jurkat and limited in primary T cells.
8. B12 STAb-T cells exhibited cytotoxicity against MCF-7 under all tested conditions.

8. Bibliografía

1. Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J. (2019). *Delivery technologies for cancer immunotherapy*. Nature reviews. Drug discovery, 18(3), 175–196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>
2. Paul, S., Konig, M. F., Pardoll, D. M., Bettgeowda, C., Papadopoulos, N., Wright, K. M., Gabelli, S. B., Ho, M., van Elsas, A., & Zhou, S. (2024). *Cancer therapy with antibodies*. Nature reviews. Cancer, 24(6), 399–426. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00690-x>
3. Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2020). *Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics*. Journal of pharmaceutical sciences, 109(1), 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>
4. Klein, C., Brinkmann, U., Reichert, J. M., & Kontermann, R. E. (2024). *The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy*. Nature reviews. Drug discovery, 23(4), 301–319. <https://doi.org/10.1038/s41573-024-00896-6>
5. Baeuerle, P. A., & Wesche, H. (2022). *T-cell-engaging antibodies for the treatment of solid tumors: challenges and opportunities*. Current opinion in oncology, 34(5), 552–558. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000869>
6. Duell, J., Dittrich, M., Bedke, T., Mueller, T., Eisele, F., Rosenwald, A., Rasche, L., Hartmann, E., Dandekar, T., Einsele, H., & Topp, M. S. (2017). *Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL*. Leukemia, 31(10), 2181–2190. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.41>
7. Dicara, D. M., Bhakta, S., Go, M. A., Ziai, J., Firestein, R., Forrest, B., Gu, C., Leong, S. R., Lee, G., Yu, S. F., Polson, A. G., & Agard, N. J. (2022). *Development of T-cell engagers selective for cells co-expressing two antigens*. mAbs, 14(1), 2115213. <https://doi.org/10.1080/19420862.2022.2115213>
8. Liu, C., Liu, N., Zhang, T., & Tu, Y. (2025). *Adoptive immune cell therapy for colorectal cancer*. Frontiers in immunology, 16, 1557906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1557906>
9. Mullin, M., McClory, J., Haynes, W., Grace, J., Robertson, N., & van Heeke, G. (2024). *Applications and challenges in designing VHH-based bispecific antibodies: leveraging machine learning solutions*. mAbs, 16(1), 2341443. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2341443>
10. Manoutcharian, K., & Gevorkian, G. (2023). *Shark VNAR phage display libraries: An alternative source for therapeutic and diagnostic recombinant antibody fragments*. Fish & shellfish immunology, 138, 108808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108808>
11. Xi, X., Wang, Y., An, G., Feng, S., Zhu, Q., Wu, Z., Chen, J., Zuo, Z., Wang, Q., Wang, M. W., & Gu, Y. (2024). *A novel shark VNAR antibody-based immunotoxin targeting TROP-2 for cancer therapy*. Acta pharmaceutica Sinica. B, 14(11), 4806–4818. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.08.023>
12. Li, D., English, H., Hong, J., Liang, T., Merlino, G., Day, C. P., & Ho, M. (2022). *A novel PD-L1-targeted shark VNAR single-domain-based CAR-T cell strategy for treating breast cancer and liver cancer*. Molecular therapy oncolytics, 24, 849–863. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.02.015>
13. Blanco, B., Compte, M., Lykkemark, S., Sanz, L., & Alvarez-Vallina, L. (2019). *T Cell-Redirecting Strategies to ‘STAb’ Tumors: Beyond CARs and Bispecific Antibodies*. Trends in immunology, 40(3), 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.01.008>
14. Rokade, S., Damani, A. M., Oft, M., & Emmerich, J. (2024). *IL-2 based cancer immunotherapies: an evolving paradigm*. Frontiers in immunology, 15, 1433989. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1433989>
15. Carrasco-Padilla, C., Hernaiz-Esteban, A., Álvarez-Vallina, L., Aguilar-Sopeña, O., & Roda-Navarro, P. (2022). *Bispecific Antibody Format and the Organization of Immunological Synapses in T Cell-Redirecting Strategies for Cancer Immunotherapy*. Pharmaceutics, 15(1), 132. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010132>
16. Martín-Antonio, B., Blanco, B., González-Murillo, Á., Hidalgo, L., Minguillón, J., Pérez-Chacón, G., & Next Generation CART MAD Consortium (2024). *Newer generations of multi-target CAR and STAb-T immunotherapeutics: NEXT CART Consortium as a cooperative effort to overcome current limitations*. Frontiers in immunology, 15, 1386856. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1386856>
17. Velasco-Sidro, M., Arroyo-Ródenas, J., Díez-Alonso, L., Ramírez-Fernández, Á., & Álvarez-Vallina, L. (2025). *Dual-targeted STAb-T cells secreting BCMA and CD19 T cell engagers for improved control of haematological cancers*. Oncoimmunology, 14(1), 2444701. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2444701>
18. Jiménez-Reinoso, A., Molero-Abraham, M., Cirauqui, C., Blanco, B., Garrido-Martin, E. M., Nehme-Álvarez, D., Domínguez-Alonso, C., Ramírez-Fernández, Á., Díez-Alonso, L., Nuñez-Buiza, Á., González-Murillo, Á., Tobes, R., Pareja, E., Ramírez-Orellana, M., Rodríguez-Peralto, J. L., Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Paz-Ares, L., & Álvarez-Vallina, L. (2024). *CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes secreting T cell-engagers induce regression of autologous patient-derived non-small cell lung cancer xenografts*. Oncoimmunology, 13(1), 2392897. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2392897>
19. Casal, J. I., & Bartolomé, R. A. (2019). *Beyond N-Cadherin, Relevance of Cadherins 5, 6 and 17 in Cancer Progression and Metastasis*. International journal of molecular sciences, 20(13), 3373. <https://doi.org/10.3390/ijms20133373>
20. Feng, Z., He, X., Zhang, X., Wu, Y., Xing, B., Knowles, A., Shan, Q., Miller, S., Hojnacki, T., Ma, J., Katona, B. W.,

- Gade, T. P. F., Siegel, D. L., Schrader, J., Metz, D. C., June, C. H., & Hua, X. (2022). *Potent suppression of neuroendocrine tumors and gastrointestinal cancers by CDH17CAR T cells without toxicity to normal tissues*. *Nature cancer*, 3(5), 581–594. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00344-7>
21. García-Martínez, J. M., Wang, S., Weishaepfl, C., Wernitznig, A., Chetta, P., Pinto, C., Ho, J., Dutcher, D., Gorman, P. N., Kroe-Barrett, R., Rinnenthal, J., Giragossian, C., Impagnatiello, M. A., Tirapu, I., Hilberg, F., Kraut, N., Pearson, M., & Kuenkele, K. P. (2021). *Selective Tumor Cell Apoptosis and Tumor Regression in CDH17-Positive Colorectal Cancer Models using BI 905711, a Novel Liver-Sparing TRAILR2 Agonist*. *Molecular cancer therapeutics*, 20(1), 96–108. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0253>
22. Tian, W., Zhao, J., & Wang, W. (2023). *Targeting CDH17 with Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells in Small Cell Lung Cancer*. *Lung*, 201(5), 489–497. <https://doi.org/10.1007/s00408-023-00648-0>
23. Kontos, F., Michelakos, T., Kurokawa, T., Sadagopan, A., Schwab, J. H., Ferrone, C. R., & Ferrone, S. (2021). *B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 27(5), 1227–1235. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2584>
24. Ma, J., Xu, X., Fu, C., Xia, P., Tian, M., Zheng, L., Chen, K., Liu, X., Li, Y., Yu, L., Zhu, Q., Yu, Y., Fan, R., Jiang, H., Li, Z., Yang, C., Xu, C., Long, Y., Wang, J., & Li, Z. (2022). *CDH17 nanobodies facilitate rapid imaging of gastric cancer and efficient delivery of immunotoxin*. *Biomaterials research*, 26(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00312-3>
25. Xu, X., Ding, Y., Dong, Y., Yuan, H., Xia, P., Qu, C., Ma, J., Wang, H., Zhang, X., Zhao, L., Li, Z., Liang, Z., & Wang, J. (2024). *Nanobody-Engineered Biohybrid Bacteria Targeting Gastrointestinal Cancers Induce Robust STING-Mediated Anti-Tumor Immunity*. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 11(31), e2401905. <https://doi.org/10.1002/advs.202401905>
26. Li, D., Wang, R., Liang, T., Ren, H., Park, C., Tai, C. H., Ni, W., Zhou, J., Mackay, S., Edmondson, E., Khan, J., Croix, B. S., & Ho, M. (2023). *Camel nanobody-based B7-H3 CAR-T cells show high efficacy against large solid tumours*. *Nature communications*, 14(1), 5920. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41631-w>
27. Domínguez Alonso, C. (2024). *Desarrollo de estrategias de optimización de la inmunoterapia “STAb”* [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. Docta, Repositorio Institucional-Universidad Complutense de Madrid.
28. Harris, E., & Elmer, J. J. (2021). *Optimization of electroporation and other non-viral gene delivery strategies for T cells*. *Biotechnology progress*, 37(1), e3066. <https://doi.org/10.1002/btpr.3066>
29. Steinberger, P., Majdic, O., Derdak, S. V., Pfistershammer, K., Kirchberger, S., Klauser, C., Zlabinger, G., Pickl, W. F., Stöckl, J., & Knapp, W. (2004). *Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(4), 2352–2359. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2352>
30. Tapia-Galisteo, A., Sánchez Rodríguez, Í., Aguilar-Sopeña, O., Harwood, S. L., Narbona, J., Ferreras Gutierrez, M., Navarro, R., Martín-García, L., Corbacho, C., Compte, M., Lacadena, J., Blanco, F. J., Chames, P., Roda-Navarro, P., Álvarez-Vallina, L., & Sanz, L. (2022). *Trispecific T-cell engagers for dual tumor-targeting of colorectal cancer*. *Oncoimmunology*, 11(1), 2034355. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2034355>