

Patricia Alexandra Guerrero Ochoa

Efecto antitumoral de inmunotoxinas anti-tn conjugadas con granulisinina

Director/es

Anel Bernal, Luis Alberto

EXTRACTO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.

Tesis Doctoral [Extracto]

**EFFECTO ANTITUMORAL DE INMUNOTOXINAS
ANTI-TN CONJUGADAS CON GRANULISINA**

Autor

Patricia Alexandra Guerrero Ochoa

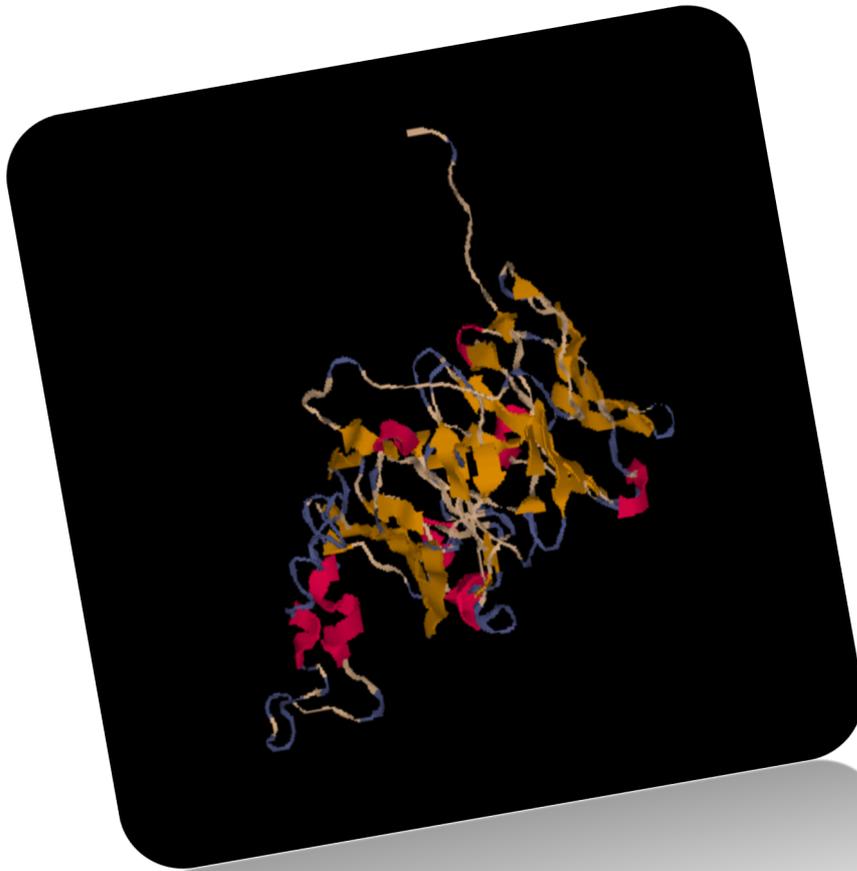
Director/es

Anel Bernal, Luis Alberto

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2021



EFFECTO ANTITUMORAL DE
INMUNOTOXINAS ANTI-TN
CONJUGADAS CON
GRANULISINA

Tesis doctoral



Universidad Zaragoza

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE

BIOQUÍMICA Y BIOL

MOLECULAR Y CELU

Patricia A. Guerrero O

2021



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR

TESIS DOCTORAL

**EFECTO ANTITUMORAL DE INMUNOTOXINAS
ANTI-TN CONJUGADAS CON GRANULISINA**

Memoria presentada por

Patricia Alexandra Guerrero Ochoa

Director: Dr. Alberto Anel Bernal

2021

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 TRANSFORMACIÓN TUMORAL.....	15
1.2 MARCADORES TUMORALES	16
1.2.1 <i>Mucina 1 (MUC1)</i>	18
1.2.2 <i>Glicosilaciones aberrantes de MUC1 y consecuencias moleculares asociadas</i>	22
1.2.3 <i>Antígeno Tn</i>	25
1.3 RESPUESTA INMUNE EN EL CÁNCER.....	29
1.3.1 <i>Respuesta inmune humoral contra MUC1</i>	30
1.3.2 <i>Papel inmuno-regulador de MUC1</i>	31
1.4 GRANULISINA	35
1.5 ANTICUERPOS ANTI-TN: SM3 Y AR20.5	40
1.6 DESARROLLO DE INMUNOTOXINAS SM3GRNLY Y AR20.5GRNLY COMO ESTRATEGIA ANTITUMORAL	45
1.7 PICHIA PASTORIS (KOMAGATAELLA PHAFFII) COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN DE SM3GRNLY Y AR20.5GRNLY	47
1.8 CAMPOS ELÉCTRICOS PULSADOS (PEF) PARA MEJORAR LA EXTRACCIÓN DE SM3GRNLY Y AR2.5GRNLY	54
1.8.1 <i>¿Qué es PEF y cómo actúa?</i>	54
1.8.2 <i>¿Cómo se generan los PEF?</i>	57
1.8.3 <i>Efectos de los PEF sobre las células microbianas</i>	59
1.9 ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS	60
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	64
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
3.1 CULTIVOS CELULARES.....	67
3.2 LÍNEAS CELULARES	67
3.3 CLONAJE DE LAS INMUNOTOXINAS ANTI TN	69
3.4 CULTIVO DE P.PASTORIS.....	74
3.4.1 <i>Protocolo inicial</i>	74
3.4.2 <i>Protocolo optimizado</i>	75
3.5 ELECTROPORACIÓN POR CAMPO ELÉCTRICO PULSADO	76
3.6 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	78
3.6.1 <i>Protocolo inicial</i>	78

3.6.2	<i>Protocolo optimizado</i>	82
3.7	CONSERVACIÓN DE LA PROTEÍNA	83
3.8	ENSAYOS DE ESTABILIDAD TÉRMICA.....	83
3.8.1	<i>Calorimetría Diferencial de Barrido</i>	83
3.8.2	<i>Dispersión Dinámica de luz</i>	85
3.9	CONSERVANTES/CRIOPROTECTORES Y LA CONGELACIÓN.....	85
3.10	LIOFILIZACIÓN.....	87
3.11	GEL DE AGAROSA	87
3.12	ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA E INMUNOBLOT.....	88
3.13	ANÁLISIS DE MASAS	90
3.14	ESTUDIOS DE UNIÓN DE LAS INMUNOTOXINAS AL ANTÍGENO T _N	90
3.15	ENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL RECONOCIMIENTO DE T _N POR CÍTOMETRÍA DE FLUJO ..	91
3.16	ENSAYOS DE FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	92
3.16.1	<i>Ensayos de citotoxicidad in vitro</i>	92
3.16.2	<i>Ensayos de citotoxicidad in vivo</i>	93
3.17	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS.....	97
3.17.1	<i>Tinción con Hematoxilina-Eosina</i>	98
3.17.2	<i>Tinción nuclear con DAPI</i>	98
3.17.3	<i>Tinción inmunohistoquímica con Caspasa 3</i>	99
4.	DISCUSIÓN	101
5.	CONCLUSIONES	116
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
7.	ANEXOS	139
7.1	ANEXO 1	139
7.2	ANEXO 2.....	141
7.3	ANEXO 3.....	142
7.4	ANEXO 4.....	143
7.5	ANEXO 5.....	144

Dedico esta tesis a mis abuelos, Carlos, Rosa, Leonidas y Delia María, a mis padres, Trotsky y Nelly y a mi suegra, Betty. Ustedes me impulsan con su recuerdo.



Mi estancia en este precioso país ha sido financiada por una beca de la SENESCYT (Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología, Investigación e Innovación) del gobierno del Ecuador. Mi agradecimiento sincero por permitir que los ecuatorianos podamos ser partícipes del desarrollo académico y cultural que surge de esta maravillosa experiencia.

Agradezco el apoyo económico de la empresa Peaches Biotech que ha financiado el último periodo de mi estancia para realizar esta tesis doctoral.

A Alberto Anel Bernal agradezco mucho su acompañamiento desde el primer día que llegué a España, por recibirme en su laboratorio, ser un ejemplo de trabajo y eficiencia, estar dispuesto a recibirme cada vez que lo necesité, revisar con prontitud y esmero este trabajo y ser paciente. Además, agradezco su buen ánimo para todas las personas que trabajamos en el laboratorio.

A Javier Raso, Diéderich Aguilar y Carlota Delso, muchas gracias por su asesoramiento en la parte biotecnológica de esta tesis y por permitirme trabajar con la técnica PEF, que ha dado buenos frutos. Su buen ánimo y disposición me inspiraron a seguir adelante cuando había muchos obstáculos en el proceso investigativo. A Diéderich gracias por su amistad.

A Blanca Conde y Eva Barrio, muchas gracias por permitirnos trabajar en el Laboratorio de Experimentación animal de la Facultad de Medicina pero sobre todo por tener

siempre una buena charla para compartir, la disposición para resolver los problemas de la investigación en los ratoncitos pero sobre todo por darnos su amistad.

A Miguel Sanmamed y María Campos Terrón, agradezco toda su ayuda para la realización de los experimentos en los ratoncitos humanizados. Fue de las mejores experiencias en investigación y me acercó al mundo de la investigación más avanzada.

A Ramón Hurtado Guerrero y Javier Macías, gracias por ser el artífice de las inmunotoxinas, permitirnos entrar su laboratorio y trabajar en los estudios de la estabilidad de las proteínas.

A Javier Naval e Isabel Marzo gracias por sus consejos cuando los requerí.

A Marisa Peleato y Cristina, por su asesoramiento en la liofilización de proteínas. Fuimos acogidas en su laboratorio y se nos proporcionó la información y los equipos con gran cariño y disposición.

A Marta Minjarez, Ruth Soler y Raquel Ibáñez, gracias por su amistad y por soportarme mis defectos. Cada una me ha dado una enseñanza valiosa que atesoro. He compartido con ustedes mucho más que el tiempo en el laboratorio, pero si tengo que decir que alguien ha ocupado más ese tiempo ha sido Marta, siempre trabajando al lado hasta altas horas. Un alivio contar con tu compañía y tu ayuda con las Pichia. A Ruth gracias por enseñarme con tu ejemplo lecciones de trabajo y de relaciones humanas. A Raquel porque tu amor por la vida me ha hecho mirar de diferente manera la mía. De igual manera gracias a Andrés por su amistad y a Germán, con quien compartí por poco tiempo pero me enseñó una importante lección.

A Pili, Fina, Marta y Manoli, son un ejemplo de trabajo eficiente y disposición de colaborar simple. Gracias por todo.

A Francisco Corzana muchas gracias por los experimentos de SRP y despejar mis dudas sobre esta interesante técnica.

A Adrián Velásquez, quien nos asesoró y permitió el uso de sus equipos para la técnica DLS.

A Luis Martínez Lostao, José Antonio Aínsa muchas gracias por darme su opinión y asesoramiento cuando lo pedí.

A Patricia Ferrerira, Milagros Medina y Marta Martínez, gracias por aconsejarnos a cerca de la producción de proteínas.

Al Dr. Marco, gracias por su buena vibra y disposición a colaborar con lo experimental cuando lo he necesitado. Y gracias por sacarme una sonrisa cada día.

A Andrea, gracias por tu pulcritud y sobre todo por tu buena actitud en el laboratorio.

A Manu, David, Chantal, Nelia, Javier, Paula, Alfonso, Ana, Oscar, Natalia, Leo, gracias por los momentos compartidos y estar dispuestos a dar un consejo cuando lo necesité.

A mi hija y a mi esposo, gracias por estar en mi vida, alegrándola y enseñándome valiosas lecciones.

A mi madre, mis hermanos, abuelos, tías y sobrinos, gracias por estar aunque no estén.

RESUMEN

Este grupo de investigación ha venido estudiando por más de dos décadas la granusilina recombinante de 9 KDa (GRNLY), a partir de una colaboración con el laboratorio del Dr. Krensky, descubridor de la molécula. Se demostró la capacidad antitumoral de la GRNLY recombinante en estudios *in vitro* y en modelos de desarrollo de tumores humanos xenotransplantados en ratones atímicos, mediante administración intratumoral. Posteriormente, se desarrolló una estrategia para direccionar la molécula con miras a el uso sistémico. Como prueba de concepto, se generó en colaboración con la Dra. Laura Sanz una inmunotoxina dirigida contra el antígeno carcino embrionario (CEA) y se demostró su capacidad de direccionar el tratamiento hacia el tumor en un modelo atímico xenotransplantado con células tumorales que expresaban CEA. La GRNLY en solitario no era capaz de detener el crecimiento tumoral por inyección sistémica. Más adelante, en colaboración con el Dr. Ramón Hurtado, experto en el estudio de las glicosilaciones proteicas, se desarrollaron dos inmunotoxinas dirigidas contra el antígeno asociado a tumor Tn, encaminadas a su uso sistémico en un número mayor de tumores que la inmunotoxina anti-CEA.

El modelo de expresión que usamos fue *P. pastoris*, que genera proteínas plegadas y glicosiladas que no contienen lipopolisacáricos (LPS), problemas éstos asociados con las proteínas recombinantes producidas en *E.coli*. Fue necesaria la optimización del protocolo y en ese proceso, el Dr. Javier Raso nos asesoró para mejorar los procesos biotecnológicos asociados y se innovó mediante la técnica de electroporación por campos eléctricos pulsados o PEF. El exitoso proceso incrementó el rendimiento y además se introdujeron protocolos adecuados de estabilización de las inmunotoxinas para su conservación a largo plazo.

Inicialmente, se demostró que la fracción scFv de la inmunotoxina mantiene su afinidad por su antígeno purificado o expresado en la superficie de células tumorales. En general, las inmunotoxinas resultaron más citotóxicas sobre las líneas celulares a las que se unía con mayor afinidad la inmunotoxina, debido a una mayor expresión del antígeno Tn. Estudios previos mostraron que la GRNLY actúa mediante activación de la vía intrínseca de la apoptosis y en menor proporción, activación de la vía de la necroptosis y la esfingomielininasa. Se demostró que las inmunotoxinas, aunque también ejercen muerte celular al menos parcialmente

a través de mecanismos apoptóticos y necroptóticos, son capaces de activar además un mecanismo necróticos que actúa con mayor rapidez.

Gracias a las mejoras al rendimiento de producción de las proteínas, se pudieron realizar los ensayos *in vivo* en un modelo NUDE xenotransplantado con el adenocarcinoma de páncreas humano CAPAN-2. En este modelo se demostró que las inmunotoxinas SM3GRNLY y AR20.5GRNLY fueron eficientes tras inyección sistémica, disminuyendo el volumen tumoral en un 40 y un 60% respectivamente. En consonancia con el mecanismo apoptótico señalado, los cortes histológicos de tumores derivados de los ratones atímicos mostraron morfología nuclear compatible con apoptosis y marcaje positivo en inmunohistoquímica de Caspasa-3 activada.

Un aspecto a considerar acerca de los resultados obtenidos en los modelos atímicos heterólogos es la falta de certeza respecto a la respuesta inmunogénica, debido a que las células inmunitarias, citocinas y matriz extracelular derivan de ratón mientras que el tumor y la granulicina son humanos. En este contexto, como primer acercamiento, se ensayó la GRNLY intratumoral en un modelo murino humanizado, los ratones NOD Rag gamma (NRG) xenotransplantados con la línea de adenocarcinoma de colon humano HT-29. Estos experimentos demostraron que se puede utilizar este modelo para futuros estudios sobre el auténtico potencial inmunogénico de la granulicina y sus inmunotoxinas.

La optimización de los protocolos biotecnológicos y la introducción de la técnica PEF para la producción/purificación de las proteínas recombinantes en el sistema de expresión *P. pastoris* permite continuar con la investigación de los mecanismos de acción de las inmunotoxinas y trasladar la experimentación a un modelo murino humanizado para corroborar su inmunogenicidad. La patente de las proteínas recombinantes usadas en este estudio fue adquirida por la empresa Peaches Biotech, de modo que esta investigación ha despertado el interés de las empresas farmacéuticas con perspectivas para su uso en humanos.

ABSTRACT

Our research group has been studying recombinant 9 KDa granusilin (GRNLY) for more than two decades, in collaboration with the laboratory of Dr. Krensky, the discoverer of the molecule. The antitumor capacity of recombinant GRNLY was demonstrated in *in vitro* studies and xenograft human tumor development models in nude mice by intratumoral administration. Subsequently, a strategy was developed to target the molecule for systemic use. An immunotoxin directed against the carcino embryonic antigen (CEA) was generated as a proof of concept in collaboration with Dr. Laura Sanz. The immunotoxin's ability to direct the treatment towards the tumor was demonstrated using a xenotransplanted athymic model with CEA-expressing tumor cells. GRNLY alone was not able to stop tumor growth by systemic injection. Later, in collaboration with Dr. Ramón Hurtado, an expert in the study of protein glycosylations, two immunotoxins directed against the tumor-associated antigen Tn were developed, aimed at their systemic use in a greater number of tumors than the anti-CEA immunotoxin.

The expression model used was *P. pastoris*, which generates folded and glycosylated proteins that do not contain lipopolisaccaride (LPS), which is a problem associated with recombinant proteins produced in *E. coli*. It was necessary to optimize the protocol and, in that process, Dr. Javier Raso advised us to improve the associated biotechnological processes by using the electroporation technique of pulsed electric fields (PEF). The process increased the yield and, in addition, adequate immunotoxin stabilization protocols were introduced for their long-term preservation.

Initially, the scFv fraction of the immunotoxin was shown to maintain its affinity for its purified antigen or expressed on tumor cells' surface. In general, the immunotoxins were more cytotoxic on the cell lines to which the immunotoxin bound with higher affinity due to a higher expression of the Tn antigen. Previous studies had shown that GRNLY acts by activating the intrinsic apoptosis pathway and, to a lesser extent, activating the necroptosis pathway and sphingomyelinase. This study shows that immunotoxins, although capable of exerting cell death at least partially through apoptotic and necroptotic mechanisms, are also able of activating a more rapidly functioning necrotic mechanism.

Thanks to the improvements in protein production yield, in vivo tests could be performed on a nude model xenotransplanted with CAPAN-2 human pancreatic adenocarcinoma. In this model, the immunotoxins SM3GRNLY and AR20.5GRNLY were shown to be efficient after systemic injection, decreasing tumor volume by 40% and 60%, respectively. Consistent with the apoptotic mechanism, histological sections of tumors derived from nude mice showed nuclear morphology compatible with apoptosis and positive labeling in immunohistochemistry of activated Caspase-3.

One aspect to consider about the results obtained in heterologous athymic models is the lack of certainty regarding the immunogenic response, since the immune cells, cytokines, and extracellular matrix are derived from the mouse while the tumor and granulysin are human. In this context, as a first approach, intratumoral GRNLY was tested in a humanized murine model, NOD Rag gamma (NRG) mice xenotransplanted with the HT-29 human colon adenocarcinoma line. These experiments demonstrated this model could be used for future studies on the true immunogenic potential of granulysin and its immunotoxins.

The optimization of biotechnological protocols and the introduction of the PEF technique for the production/purification of recombinant proteins in the *P. pastoris* expression system will allow us to continue investigating the mechanisms of immunotoxins' action, and to transfer the experimentation to a humanized murine model to corroborate its immunogenicity. Peaches Biotech acquired the patent for the recombinant proteins used in this study, so this research has sparked the interest of pharmaceutical companies with prospects for their use in humans.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Transformación tumoral

La transformación tumoral, neoplasia o cáncer es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de masas que crecen dañando tejidos vecinos y alteran su anatomo-fisiología. Además, estas células pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis (Mitrus et al., 2012).

Las células cancerosas son autosuficientes para crecer sin regulación, son resistentes a la apoptosis, tienen un mayor potencial replicativo, angiogénesis sostenida y han desarrollado estrategias para invadir tejidos vecinos (Hanahan & Weinberg, 2011). Sobreviven a condiciones de estrés, hipoxia, privación de nutrientes, daño al ADN, plegamiento aberrante de proteínas y errores en la mitosis como por ejemplo la desigual distribución de cromosomas (Luo et al., 2009). Además, la respuesta inmune en contra de éstas es evadida a través de la transformación de microambientes que favorecen su desarrollo. Todo esto constituye los denominados “Características distintivas del cáncer” (del inglés Hallmarkers of cancer) (Hanahan & Weinberg, 2011; Mitrus et al., 2012).

Como consecuencia de estos procesos, las células tumorales acumulan nuevas mutaciones en cada generación. Estos cambios genéticos les permiten adaptarse mejor a la evasión de la respuesta inmunitaria y a las condiciones metabólicas del entorno, que seleccionan clones cada vez más autónomos e invasivos. La inestabilidad genómica es una característica que suele asociarse a estos clones especialmente agresivos (Negrini et al., 2010). Así mismo, se ha reportado la fusión celular como un mecanismo de gran relevancia en el origen y progresión del cáncer (Jiang et al., 2019).

Para mantener el crecimiento, las células cancerosas se someten a un reordenamiento metabólico complejo caracterizado por cambios en las vías metabólicas

involucradas en la producción de energía y los procesos biosintéticos. Recientemente, las mutaciones de las enzimas mitocondriales y citosólicas involucradas en vías metabólicas clave se han asociado con formas hereditarias y esporádicas de cáncer. Estos resultados sugieren que el metabolismo aberrante, *per se*, juega un papel clave en la oncogénesis (Hirschey et al., 2016; Marco-Brualla et al., 2019).

En este contexto, la expresión de proteínas se ve alterada en los tumores (Mitrus et al., 2012) y éstos expresan proteínas alteradas, fruto de las mutaciones descritas. De esta manera se generan lo que se denomina marcadores tumorales, como indicadores de la transformación maligna de un tejido.

1.2 Marcadores tumorales

Un marcador tumoral (MT) es toda aquella sustancia producida por las células tumorales o por el propio organismo en respuesta al tumor, cuya presencia puede ser detectada en el propio tejido tumoral, en el suero o en otros fluidos biológicos y que refleja el crecimiento o actividad tumoral. Lamentablemente, estos marcadores no son específicos de las neoplasias, y pueden encontrarse concentraciones apreciables en situaciones fisiológicas o patológicas no tumorales. Por ello, el principal dato a tener en cuenta es el cambio cuantitativo de los marcadores tumorales (Aggarwal & Kehoe, 2010; Perkins et.al., 2003; Seleznick, 1992).

Probablemente la primera referencia histórica a un MT se remonta al descubrimiento por Bence Jones en 1846 de un precipitado de la orina en pacientes afectados de lo que antes se denominaba mellitis osseum (osteomalacia), que más de 100 años después se identificaron como cadenas ligeras monoclonales de inmunoglobulinas en los pacientes con Mieloma Múltiple y que hoy conocemos como “proteínas de Bence Jones”. Sin embargo, a pesar de esta lejana referencia, la historia de los Marcadores Tumorales arranca fundamentalmente en la segunda mitad del siglo XX; coincidiendo con el descubrimiento de la gonadotropina coriónica humana (HCG) en 1927 como marcador de tumores germinales y coriocarcinoma (Kaplan, 1929); alfa-fetoproteína (AFP) en 1963 como marcador de tumores germinales y hepatocarcinoma (Alpert

et al., 1968); antígeno carcino- embrionario (CEA) en 1965 como marcador de cáncer de colon y recto (Gold & Freedman, 1965).

Existe una amplia variedad de sustancias que pueden ser clasificadas como MT, que incluyen enzimas, proteínas específicas, metabolitos y antígenos asociados a tumores (Lech et al., 2016). Los antígenos asociados a tumor son productos generados como consecuencia de la inestabilidad génica de los tumores, generalmente de tipo proteico y glicoproteico (Varki, 2017). Dentro del grupo de antígenos asociados a tumor se hallan determinados glicanos, los cuales se generan a partir de la glicosilación, la modificación postraducciona l más abundante (Corfield & Berry, 2015). La glicosilación es un proceso enzimático complejo que genera estructuras de carbohidratos covalentemente unidas a proteínas o lípidos. Esto ocurre preferentemente en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, pero también se han descrito glicosilaciones en el citoplasma. De todas las glicosilaciones, el *O-enlace* GlcNAc, una modificación nucleocitoplásmica, es la más común para las células eucarióticas (Varki, 2017).

Actualmente está bien establecido que la glicosilación aberrante puede promover la capacidad invasiva de la célula tumoral en procesos ligados a la separación de las células de su matriz, la intravasación, transporte, fijación, extravasación y angiogénesis (Häuselmann & Borsig, 2014). Sin embargo, una pregunta sin respuesta es si la glicosilación aberrante es causa o consecuencia de la tumorigénesis (Cagnoni et al., 2016).

La sobreexpresión de las mucinas o MUC, proteínas de membrana altamente glicosiladas, y sus glicosilaciones aberrantes están asociadas con el desarrollo y progresión del cáncer. Por consiguiente, las mucinas pueden usarse como valiosos marcadores tumorales, así, MUC1 es un marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, próstata y pulmón, MUC4 y MUC16 se usan para detectar cáncer pancreático o de ovario respectivamente y MUC2 MUC5AC, MUC5B y MUC6 han sido hallados en cáncer colorrectal (Martínez-Sáez et al., 2016).

Existen dos tipos principales de mucinas, aquellas que son secretadas a la región extracelular y cuyo rol biológico es primordialmente protección epitelial: se incluye en este

grupo MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-9 y MUC19; y por otro lado glicoproteínas transmembrana caracterizadas por un dominio extracelular N-terminal y una cola intracitoplasmática C-terminal, ambas conectadas a un solo dominio transmembrana: en este grupo se incluye MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11-18, MUC20 y MUC21 (Martínez-Sáez et al., 2017).

Las MUC son parte de las secreciones de las células epiteliales de mucosas y de la superficie de todas células animales, incluidos los eritrocitos. La glicosilación puede ser clasificada en dos grandes grupos, la N-glicosilación y la O-glicosilación, en esta última la MUC contiene más del 80% de su masa constituida por O-glicanos y puede dar paso a la formación de cinco núcleos o cores, el núcleo 1 y 2 expresados en muchos tejidos normales pero el 3, 4 y 5 especializados en células epiteliales del tracto gastrointestinal (Fu et al., 2016).

Las mucinas de núcleo 2 *O-glicosiladas* intervienen en funciones biológicas importantes como el tráfico leucocitario, reconociendo las selectinas y especialmente uniéndose a la P-selectina ligando de glicoproteína (de sus siglas en inglés PSGL-1) a P-, L- o E-selectinas (Ju et al., 2011). Las selectinas reconocen un motivo común, consistente en un glicano sialilado fucosilado (Varki, 2017).

1.2.1 Mucina 1 (MUC1)

Entre las mucinas, MUC1 es, con mucho, una de las más estudiadas. De una molécula de MUC1 de 1000 aminoácidos, las *O-glicosilaciones* pueden incrementar su peso alrededor de 2 millones de Da (Ju et al., 2011). MUC1 es también conocida como episialina, PEM (polymorphic epithelial mucin), CD-227, (Cluster Differentiation 227), PUM (Peanut-reactive urinary mucin), KL-6 (Krebs von den Lungen-6), DF3 (Breast Carcinoma-Associated Antigen), H23Ag, EMA (Tumor-Associated Epithelial Membrane Antigen), CA15-3 (Cancer Antigen 15-3) y MCA (Mucin-like carcinoma-associated antigen). Se extiende 200-100nm por encima de la superficie celular. Se expresa normalmente en los epitelios luminal o glandular de la glándula mamaria, esófago, estómago, duodeno, páncreas, útero, próstata, pulmones y, en menor proporción en células hematopoyéticas. Está ausente en epitelio de la piel y células

mesenquimales. Las prolongaciones de azúcares cargadas negativamente que se extienden a lo largo de la columna principal de MUC1 crean una barrera física con propiedades antiadhesivas limitando la accesibilidad y evitando la colonización por microorganismos patógenos. La MUC1 del ratón tiene un 34% de homología con la humana. La O-glicosilación se correlaciona con las propiedades biológicas de MUC1, mientras que la N-glicosilación es vital para su plegamiento proteico, clasificación, secreción y expresión apical en células polarizadas (Nath & Mukherjee, 2014).

El gen *MUC1* codifica una cadena simple de polipéptidos los cuales, debido a estrés conformacional, son escindidos proteolíticamente luego de la traducción a nivel del motivo GSVVV, localizado junto al dominio SEA, de forma que se originan dos fragmentos: uno largo, la subunidad N-terminal (MUC1-N) y uno corto, la subunidad C-terminal (MUC1-C). Extracelularmente, las dos unidades permanecen asociadas a través de puentes de hidrógeno como se observa en la siguiente figura (Nath & Mukherjee, 2014).

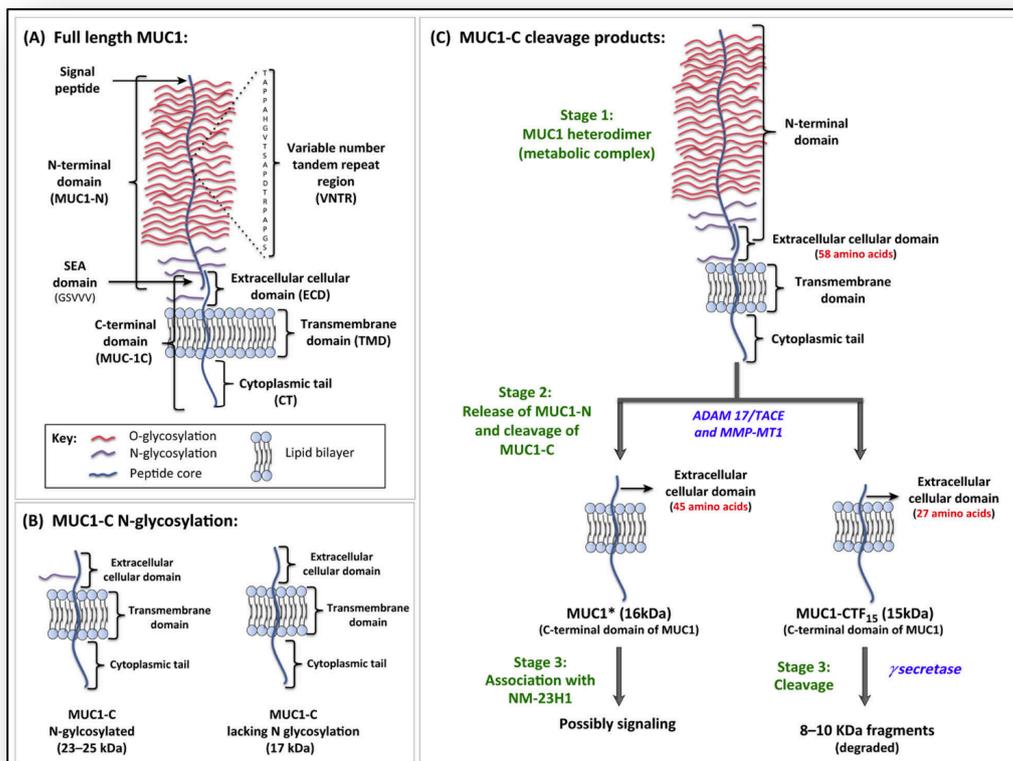


Fig. 1 Estructura de MUC1. Nath S. & Mukherjee P. (2014).

MUC1-N consiste en un dominio extracelular que comprende una región VNTR (del inglés variable number tandem repeat) o PTS (del inglés proline-threonine-serine) de 20-21 aminoácidos que se puede repetir de 20 a 125 veces. Esta región VNTR incluye 5 sitios potenciales de *O*-glicosilación, tres con residuos Thr y dos residuos Ser (Martínez-Sáez et al., 2017). La región VNTR está delimitada en sus dos extremos por secuencias pequeñas degeneradas que poseen una similitud con la región VNTR (Nath & Mukherjee, 2014).

MUC1-C tiene un dominio extracelular (ECD) de 58 aminoácidos, un dominio transmembrana (TMD) de 28 aminoácidos y un tallo citoplasmático (CT) de 72 aminoácidos. El complejo MUC1-N se disocia de MUC1-C después de la estimulación con las citocinas proinflamatorias interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y esto es catalizado por las actividades sheddasa de las enzimas, incluida la enzima convertidora de TNF- α (TACE, también llamado dominio desintegrina y metaloproteasa que contiene proteína-17; ADAM17) y por metaloproteasas de matriz (MMP). Estas enzimas causan la liberación de MUC1-N de MUC1-C y también catalizan la escisión de la ECD de MUC1-C, generando así fragmentos de péptidos más pequeños MUC1* y MUC1-CTF15 (Figura 2). MUC1*, consiste en un dipéptido de 45 aminoácidos que promueve el crecimiento tumoral y que también se ha detectado en células madre embrionarias humanas, donde funciona como un receptor del factor de crecimiento para una proteína asociada a metástasis (NM23-H1). MUC1 CTF15 es un polipéptido de 27 aminoácidos que es escindido por la γ -secretasa en fragmentos peptídicos más cortos con una masa molecular de 8-10 KDa, que se degradan rápidamente (Figura 1). En la mayoría de las células normales y tumorales, MUC1 CTF15 es indetectable ya que se degrada rápidamente (Nath & Mukherjee, 2014).

MUC1 es codificado por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 1 en la posición 21 (1q21). MUC1 contiene 7 exones, los exones 1-4 codifican MUC1-N y los exones 4-7 codifican MUC1-C. En humanos se han identificado 78 isoformas de MUC1, siendo las más comunes 6 MUC1/A, MUC1/B, MUC1/C y MUC1/D cuya diferencia radica en que varía la longitud del segmento VNTR (Nath & Mukherjee, 2014).

Se han estudiado las señales intracelulares asociadas al dominio intracitoplasmático de MUC1 tanto en células tumorales como no tumorales (Carson, 2008). Aunque no está claro si se requiere Hsp70, se puede producir la fosforilación de tirosina del dominio citoplasmático

(CD) de MUC1, posiblemente mediante su unión a microbios, selectinas o ICAM-1, o a través de la activación mediada por factores de crecimiento como PDGF. Se propone que a través de la liberación del ectodominio (MUC1-N), el CD quede disponible para participar en varias cascadas de señalización. Estas cascadas implican interacciones adicionales entre el CD y otras proteínas, que alteran las actividades transcripcionales o aumentan la resistencia a la apoptosis (Carson, 2008).

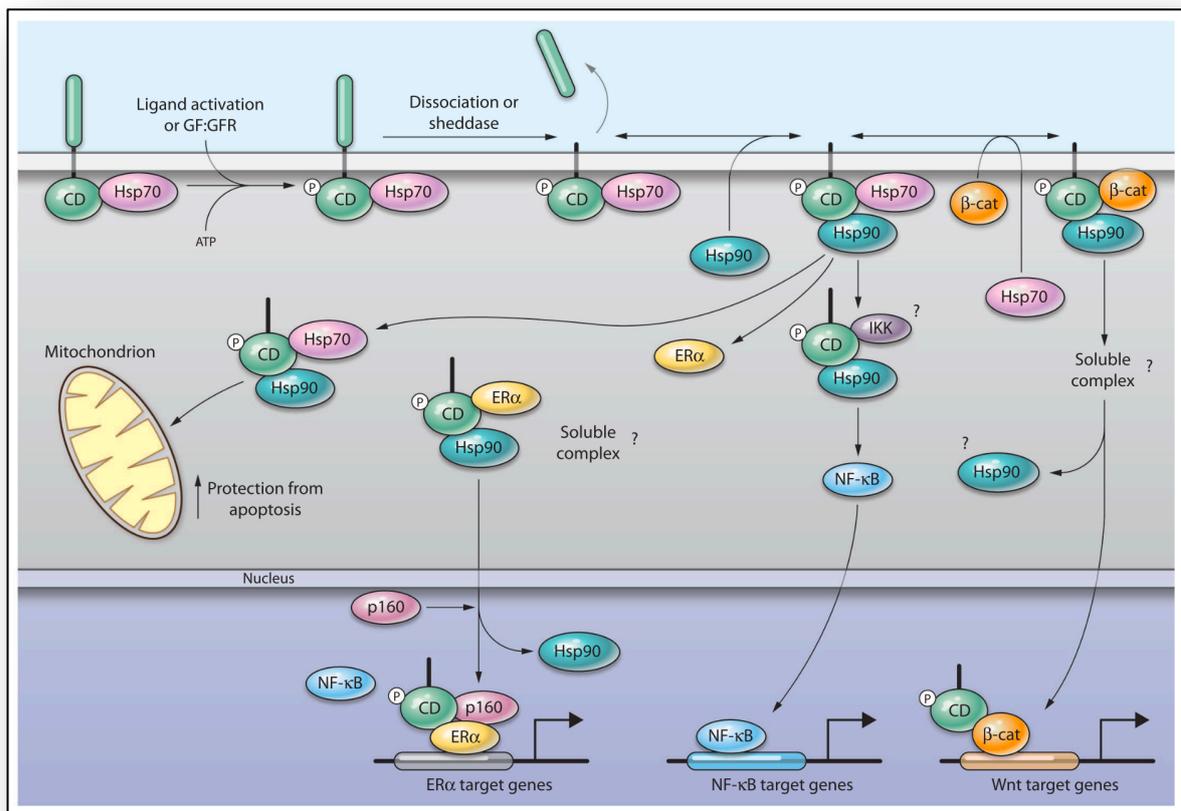


Fig. 2 Cascadas de señalización dependientes de MUC1. Carson D. (2008) GF, factor de crecimiento; GFR, receptor del factor de crecimiento; P, tirosina fosforilada; p160 incluye GRIP-1 (receptor de glucocorticoides que interactúa con la proteína-1) y SRC-1 (receptor de esteroides coactivador-1)

Estas evidencias demuestran que MUC1 es una molécula que tiene una actividad señalizadora y que existe una liberación del ectodominio de la molécula (Munster et al., 1998). MUC1 está ubicada en el puesto dos entre 75 de los antígenos tumorales más prometedores para desarrollo de terapias, según el Proyecto del Instituto Nacional del Cáncer para la aceleración de la Investigación Traslacional (Panchamoorthy et al., 2018).

1.2.2 Glicosilaciones aberrantes de MUC1 y consecuencias

moleculares asociadas

Las glicosilaciones aberrantes han sido catalogadas por algunos autores con el nombre TACAs (del inglés tumor associated carbohydrates antigens). El proceso bioquímico que conduce al ensamblaje de los TACAs derivados de los *O-glicanos* en MUC1 es iniciado por la adición de GalNAc (N-acetilgalactosamina) a la Ser o Thr en la región VNTR de MUC1-N, lo que da paso a la formación del **antígeno Tn**. Esta reacción es orquestada por una batería de enzimas denominadas α GalNAc transferasas, las cuales transfieren GalNAc desde un donador UDP-GalNAc. Este proceso se lleva a cabo en el aparato de Golgi. Después de este proceso, la incorporación del primer carbohidrato, la β 1,3-galactotransferasa o T sintasa cataliza la fijación de galactosa al antígeno Tn para generar el núcleo 1 *O-glicano* (también llamado antígeno T); pero el antígeno Tn puede ser aceptor de otras dos enzimas, una que conduce a la formación del Core 3 y otra que da paso a la formación de sialil-Tn. La modificación más común es la formación del núcleo 1, el cual puede ser aceptor del residuo α -N-acetil glucosamina (GlcNAc) catalizado por β 1,6-GlcNAc transferasa para dar paso al núcleo 2 *O-glicano*, el cual experimenta una elongación de su cadena, seguido de una inserción de una fucosa o ácido siálico en su azúcar terminal (Martínez-Sáez et al., 2017; Nath & Mukherjee, 2014).

En células tumorales MUC1 está aberrantemente glicosilada y en lugar de las densas glicosilaciones normales, presenta carbohidratos truncados como resultado de la regulación a la baja de β 1,6-GlcNAc transferasa, lo que lleva a la reducción drástica de la transformación del núcleo 1 en núcleo 2, tal como podemos ver en la figura 3. De este modo, el antígeno Tn inmaduro y el antígeno T son expresados en las células malignas (Martínez-Sáez et al., 2017). La hipoglicosilación de MUC1 se ha demostrado que se asocia con mayor endocitosis mediada por clatrina, pero sin incremento de la degradación de ésta, lo que produce una acumulación en el citoplasma (Nath & Mukherjee, 2014).

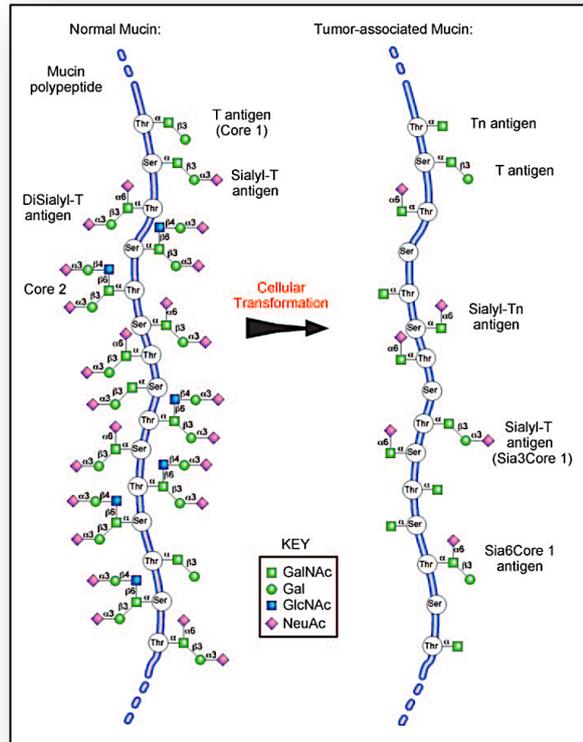


Fig. 3 Mucinas y la expresión de Tn y antígenos Tn-sialilados. Ju T., Otto V. & Cummings R. (2011).

Per se, la expresión de MUC1 aberrante se asocia a un mal pronóstico. Este fenómeno se ha demostrado generando modelos de ratón que desarrollan espontáneamente adenocarcinoma ductal pancreático (KC), algunos deficientes o Knockout para MUC1 humano (KCKO) y otros que expresan MUC1 humano (KCM). Los ratones KCKO tienen una progresión tumoral y tasas de metástasis secundarias significativamente más lentas; además, tienen una capacidad tumorigénica significativamente menor en comparación con las células de los tumores con MUC1. (Besmer et al., 2011).

Otra característica distintiva del cáncer es la alteración de la polarización de las células, también demostrada en tumores que expresan MUC1 aberrante. La organización de los tejidos requiere un patrón altamente ordenado y polarización de las células. Las células epiteliales se polarizan con frecuencia dentro de los siguientes dos ejes: polaridad apical-basolateral (A / B) y polaridad dentro del plano del epitelio o polaridad de células planas (PCP). La adquisición y el mantenimiento de la polaridad dependen de la capacidad de una célula para traficar y mantener proteínas de la membrana plasmática en dominios de

membrana específicos. El eje PCP está establecido en parte por complejas agrupaciones PCP altamente conservadas que se localizan en dominios opuestos de la membrana plasmática dentro de la misma célula epitelial. Esta localización mutuamente exclusiva se ve reforzada por interacciones antagónicas intracelulares estabilizando las interacciones intercelulares con células adyacentes, lo cual mantiene la estructura y función de los tejidos (Carvajal-Gonzalez et al., 2015). MUC1 y algunos factores de crecimiento están confinados a la superficie apical y basolateral del epitelio normal. La hipoglicosilación aberrante de MUC1 se correlaciona con la pérdida de polaridad apicobasal, de forma que se localiza en toda la superficie celular (Nath & Mukherjee, 2014). Ver Fig.4.

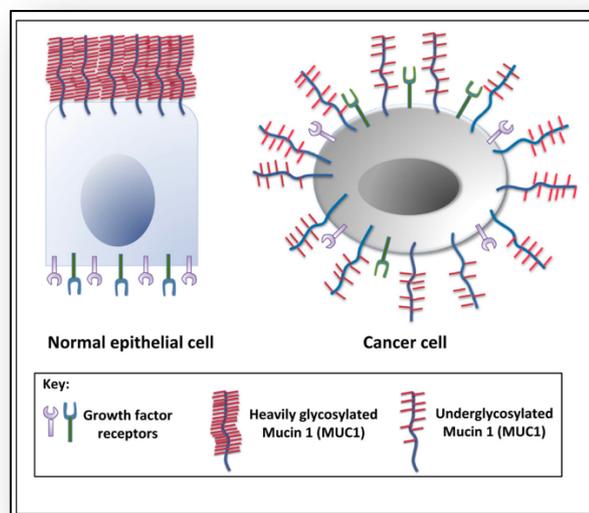


Fig. 4 Sobreexpresión de MUC1 y pérdida de la polaridad en células tumorales. Nath S. & Mukherjee P. (2014).

Los factores de crecimiento yuxtapuestos a MUC1 aberrante y las quinasas intracelulares como fosforilan los residuos de serina, tirosina y treonina en la cola citoplasmática de MUC1 (Figura 1). También se cree que la hipoglicosilación desenmascara el núcleo peptídico de MUC1 permitiendo la escisión y liberación de MUC1-N por proteasas extracelulares. La liberación de MUC1-N induce cambios conformacionales en MUC1-C que activan a su vez diversas vías de señalización como la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la fosfatidilinositol 3-quinasa (P13K / Akt) y la vía de tipo wingless (Wnt). Como resultado, las células de cáncer de páncreas, mama, pulmón y colon positivas para MUC1 comúnmente muestran hiperactivación de estas vías de señalización críticas. MUC1-C también se proteolisa

y se asocia con los factores de transcripción ER α -p160 y β -catenina activando también a NF- κ B, regulando la expresión de genes que promueven el crecimiento y la supervivencia celular (Figura 2). Varios estudios han indicado que MUC1 desempeña un papel crítico en la regulación transcripcional de genes asociados con invasión tumoral, metástasis, angiogénesis, proliferación, apoptosis, resistencia a los medicamentos, inflamación y regulación inmunitaria (Nath & Mukherjee, 2014).

En cáncer de mama y cáncer de ovario, se ha demostrado que MUC1-C se integra en el programa de transición epitelio-mesenquimal, induce la expresión de PD-L1 y se asocia a mecanismos de inmunoevasión (Bouillez et al., 2017; Maeda et al., 2018; Rajabi et al., 2018).

El impacto a nivel metabólico de MUC1 aberrante se ha demostrado en un modelo de cáncer de páncreas. MUC1 incrementa la expresión de enzimas metabólicas con GLUT1 y LDHA, lo que tiene relación con el incremento intracelular de glucosa. MUC1 interactúa con HIF-1 α estabilizándolo a través de la disminución de los niveles de expresión de 2-oxoglutarato y previniendo su degradación en el proteosoma. En condiciones de hipoxia, MUC1 interactúa con HIF-1 α y p300 para ocupar los promotores génicos glucolíticos. Estos fenómenos se correlacionan con incremento de la masa tumoral y las metástasis (Chaika et al., 2012).

1.2.3 Antígeno Tn

Ya hemos revisado el impacto de MUC1 aberrante en el desarrollo de los tumores y las complejas interrelaciones moleculares que se asocian a la evolución tumoral agresiva. Ahora nos enfocaremos específicamente en una de las glicosilaciones aberrantes de MUC1, el antígeno Tn.

Se ha demostrado claramente que los mecanismos de expresión del antígeno Tn resultan de cambios genéticos que conducen a la disminución de la expresión de Cosmc y/o T sintasa (llamado también C1GalT1, core-1-sintasa o UDP-Gal:GalNAc α 1-O-Ser/Thr glicopéptido β 3-galactosyltransferasa) (Loureiro et al., 2015). Sin embargo, hay otros posibles

factores que podrían influenciar las vías de glicosilación y expresión del antígeno Tn, como son la UDP-Gal o su transportador UDP-Gal, que intervienen “donando” una unidad GalNAc a la Ser/Thr y que son esenciales para la síntesis de O-glucanos normales. Los defectos en las vías biosintetizadoras y de transporte pueden conducir a una expresión anormal, generándose el antígeno Tn (Ju et al., 2011).

Cosmc es una chaperona (del inglés core 1- β 3galactosiltransferase-specific molecular chaperone) que se requiere para la formación de la T-sintasa activa *in vivo*. Cosmc está codificado por un gen de exón único en Xq24. En contraste con la T-sintasa, que se encuentra tanto en vertebrados como en invertebrados, los ortólogos de Cosmc existen solo en vertebrados (Fu et al., 2016).

En el siguiente esquema (Fig.5) se puede ver en la parte izquierda a Cosmc expresado en el retículo endoplásmico, donde se une a la recién sintetizada Tn-sintasa e interviene en el plegamiento de la enzima y su adquisición de actividad. La T-sintasa dimérica puede entonces moverse al aparato de Golgi, donde ejerce su función para añadir residuos de galactosa del donador UDP-Gal al precursor de los O-*glicanos*. Los O-*glicanos* normales pueden ser sialilados para generar un núcleo 1 O-*glicano* sialilado o pueden ampliarse para formar un núcleo 2 O-*glicano*. A la derecha se observa lo que puede pasar en ausencia de Cosmc, donde ocurre un plegamiento defectuoso de la T-sintasa y se retrotransloca al citoplasma, es ubiquitinado y degradado en el proteosoma 26S. Así, se da paso a la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en la superficie celular (Fu et al., 2016; Ju et al., 2011).

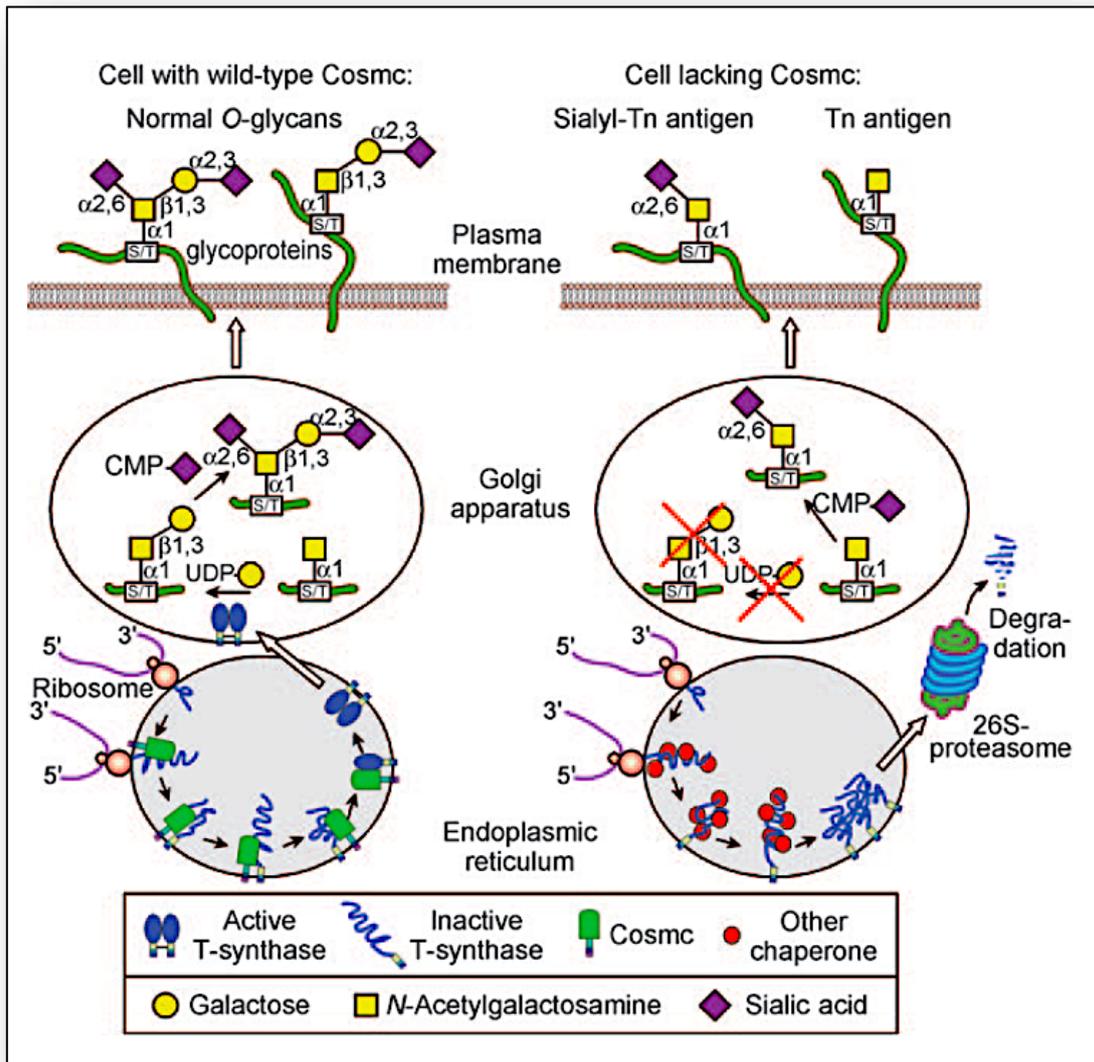


Fig. 5 Base molecular para la producción de O-glicanos normales y para la expresión de los antígenos Tn y sialil-Tn en células que perdieron la funcionalidad de T-sintasa y Cosmc. Ju T., Otto V. & Cummings R. (2011).

El descubrimiento del antígeno Tn fue un hito en la historia de las glucociencias, y su expresión fue la primera asociada a una enfermedad. El síndrome Tn o síndrome Tn de poliaglutinabilidad fue descrito por primera vez en 1957 por Moreau et al. en un paciente con anemia hemolítica cuyos eritrocitos se aglutinaban en frío independientemente del grupo sanguíneo ABO. Luego se estableció que la aglutinación se debía a una crioaglutinina tipo IgM dirigida contra el antígeno Tn, una forma truncada de una glicosilación en glicoproteínas con la estructura GalNAc α 1-O-Ser/Thr (Moreau et al., 1957). Siendo que el antígeno Tn era similar al antígeno T o antígeno TF, previamente descrito; se le designó "T antigen nouvelle" o antígeno

Tn. En la nomenclatura “cluster of differentiation” se le ha denominado CD175 y su versión sializada es CD175s (Cazet et al., 2010).

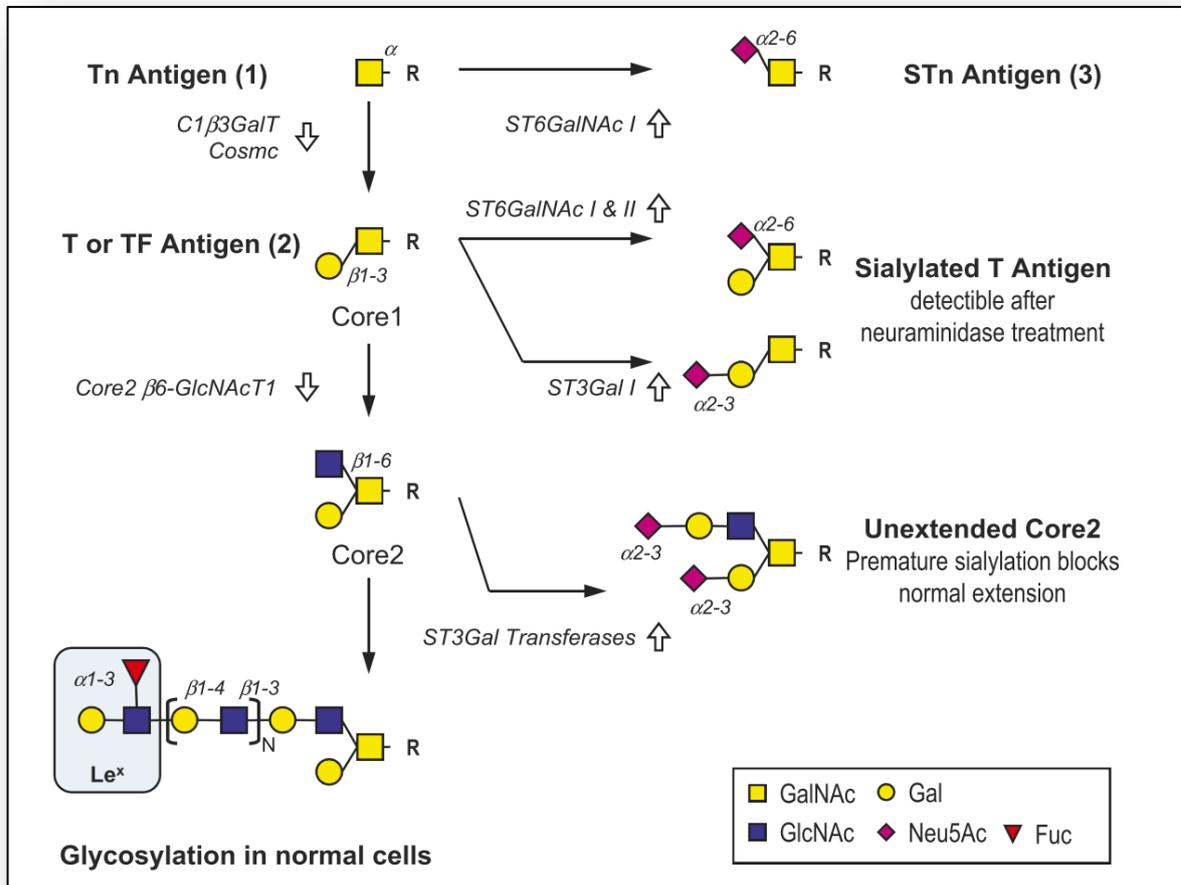


Fig. 6 Vías de biosíntesis de O-glicosilación de células normales y en células epiteliales de cáncer de mama. Cazet A. et al.(2010).

La estructura del antígeno Tn fue descrita en 1975 por Dahr et al. a partir de eritrocitos de pacientes con síndrome Tn. Se definió la inmunogenicidad del antígeno Tn como parte del estudio de los antígenos de grupo sanguíneo humano MN, descubriéndose que los antígenos T y Tn son antígenos asociados a carcinoma. En 1985 se reportó el desarrollo, por primera vez, de un anticuerpo monoclonal murino (mAbs) contra el antígeno Tn. Se demostró que los anticuerpos eran reactivos contra eritrocitos de pacientes con el Síndrome Tn pero no contra eritrocitos sanos se pudo establecer reactividad cruzada de los anticuerpos anti-Tn con otros glicanos que contienen GalNAc tales como los antígenos sanguíneos del grupo A pero se han

logrado superar esos inconvenientes y en la actualidad se han desarrollado anticuerpos comerciales de gran especificidad (Ju et al., 2011).

A parte del Síndrome Tn antes mencionado, el antígeno Tn se asocia a la etiología de la Nefropatía IgA, la glomerulonefritis primaria más común. Se ha demostrado la generación de anticuerpos en las infecciones por *Schistosoma mansoni schistosomula* (Nyame et al., 1988), *Echinococcus granulosus*, *Cryptosporidium parvum* y *Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)*. Sin embargo, el principal rol que nos ocupa es el concerniente al asociado a cáncer. Se ha reportado que el antígeno Tn está presente en altos niveles en el 90% de tumores de mama y en 70-90% de los tumores de colon, pulmón, cérvix, ovario, estómago y próstata; sin embargo, en los tejidos normales está ausente o se expresa en poca cantidad constituyendo un marcador tumoral bastante específico (Ju et al., 2011).

1.3 Respuesta inmune en el cáncer

Un principio central de la respuesta contra el cáncer es que el sistema inmune examina activamente la transformación maligna y puede ser inducido a reconocer y eliminar las células malignas. Esta premisa, inicialmente planteada por Ehrlich en 1909, fue perfeccionada por Thomas y Burnet en 1957 en la hipótesis de la inmunovigilancia que postula un papel para el sistema inmune en el control del desarrollo y crecimiento de células transformadas nacientes. Desde entonces, esta hipótesis se ha refinado basándose en el conocimiento de que el sistema inmunitario no solo puede proteger contra el desarrollo de tumores, sino que también puede seleccionar tumores con una disminución de la antigenicidad y / o inmunogenicidad y, por lo tanto, promover el crecimiento del tumor (Anel, 2018). En este proceso denominado "inmunoedición del cáncer", los clones de células tumorales evolucionan para evitar la eliminación por parte del sistema inmune y fue propuesto en 2002 por el grupo del Dr. Schreiber (Dunn et al., 2002; Schreiber et al., 2011). Además, algunos tumores también pueden escapar de la eliminación al reclutar leucocitos inmunosupresores que orquestan un microambiente que inhibe la respuesta inmune antitumoral (Beatty & Gladney, 2015; Criscitiello et al., 2019). Se ha propuesto el concepto de ciclo de la inmunidad del cáncer que plantea un mecanismo de activación de la respuesta inmune que comienza con la presentación de antígenos tumorales, tal como se puede ver en la siguiente figura:

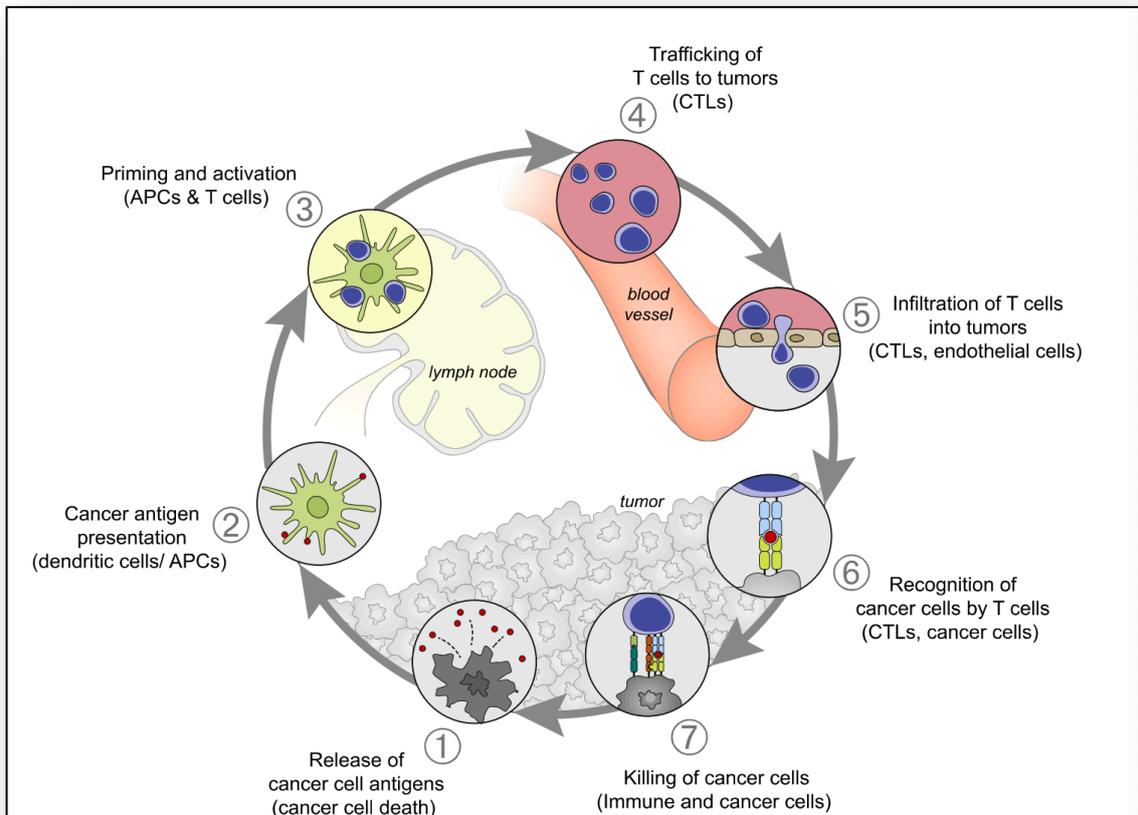


Fig. 7 Ciclo de la Inmunidad del Cáncer (Chen & Mellman, 2013).

1.3.1 Respuesta inmune humoral contra MUC1

La respuesta inmune humoral contra los carbohidratos juega un papel clave en las respuestas antitumorales. A diferencia del Receptor de células T (TCR), los receptores de células B (BCR) pueden reconocer directamente los antígenos de carbohidratos sin necesidad de presentación a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El reconocimiento del antígeno por parte del BCR activa a las células B específicas, que inician la secreción de anticuerpos IgM. La IgM se caracteriza por una estructura pentamérica con una afinidad relativamente baja por los antígenos y un período de permanencia en el suero relativamente

corto, en comparación con los otros isotipos. Este proceso se puede producir en ausencia de ayuda por parte de los linfocitos T (Loureiro et al., 2015).

Para que se genere inmunidad humoral antitumoral de larga duración, es deseable la producción de otros isotipos de anticuerpos tales como IgG. Fisiológicamente, esto generalmente implica la participación de células Th, en un proceso llamado activación de células B dependiente de células T. Las células Th específicas contra péptidos derivados de antígenos tumorales se activan inicialmente mediante células presentadoras de antígeno. Luego, las células B específicas de carbohidratos reciben señales estimuladoras (citocinas) de las células Th, lo que permite el cambio de subtipos de anticuerpos de IgM a IgG de alta afinidad y la diferenciación de las células plasmáticas en células B de memoria. Estos anticuerpos IgG de alta afinidad pueden unirse a las células cancerosas, marcándolos para su destrucción por el complemento (citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) o por células asesinas naturales (NK) (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)) (Loureiro et al., 2015).

La presencia de anticuerpos circulantes contra MUC1 en el momento del diagnóstico de cáncer, se correlaciona con un pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama. Esta propiedad convierte a MUC1 en un blanco atractivo para inmunoterapia del cáncer (Gaidzik et al., 2013; Wilson & Danishefsky, 2013; Wolfert & Boons, 2013).

1.3.2 Papel inmuno-regulador de MUC1

Recientemente se ha demostrado que MUC1 (sin glicosilaciones aberrantes) forma parte de la membrana de los linfocitos T, como una molécula reguladora de la respuesta T, con motivos ITIM/ITAM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif/ immunoreceptor tyrosine-based activation motif) y se ha mostrado su papel en la presentación antigénica como en la generación de perfiles supresores o inhibidores, similar a lo que ocurre con moléculas como CTLA-4 y PD-1, los llamados puntos de control (del inglés checkpoint) (Agrawal et al., 2018). Ver Fig. 8.

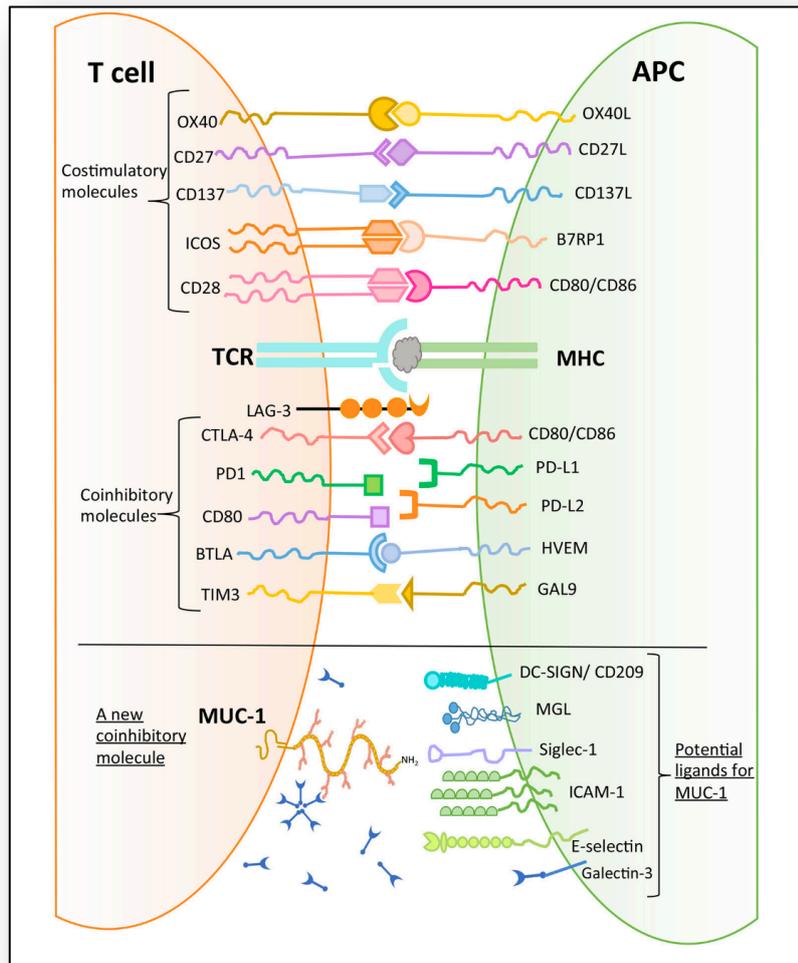


Fig. 8 Una nueva molécula coinhibitoria en los Linfocitos T. Agrawal B., Gupta N & Konowalchuk J. (2018).

En un modelo murino MUC1^{-/-} infectado con *P. aeruginosa* se evidenció un proceso inflamatorio incrementado comparado con los ratones portadores de MUC1 wt (Umehara et al., 2012). El mecanismo regulador planteado por los investigadores se basa en que los TLRs que identifican a *P. aeruginosa* inducen la producción de citoquinas inflamatorias que atraen a los macrófagos, los cuales producen TNF- α y como consecuencia se incrementa la expresión de MUC1 en el epitelio respiratorio. La respuesta inflamatoria mediada por TLRs se ve regulada por MUC1 llevando a la disminución del número de macrófagos y de la inflamación. La inhibición de la respuesta T mediada por MUC1 también contribuirá a este efecto anti-inflamatorio. Resultados similares se observaron en un modelo murino MUC1^{-/-} de colitis severa (Nishida A et al., 2012).

Respecto a la autoinmunidad, en modelos murinos MUC1^{-/-} de Esclerosis Múltiple, se observó síntomas de encefalomiелitis autoinmune como consecuencia de altos niveles de células Th1 y Th17; sin embargo, el origen de las citoquinas inflamatorias de este modelo, comparado con el ratón MUC1⁺ parece no originarse en los linfocitos T sino en las DCs que producen más IL-1 β , IL-12, IL-6 y menos IL-10, que a su vez se correlaciona con la producción de citoquinas inflamatorias por parte de los esplenocitos aislados (Yen et al., 2013).

1.3.2.1 Mecanismos de escape tumoral en tumores con glicosilaciones aberrantes

Debido a que las células inmunes expresan una gran variedad de receptores de unión a glicanos llamados lectinas, éstas pueden detectar las glicosilaciones y generalmente esto desencadena una respuesta inmune inhibitoria. Tal inhibición puede darse debido a la sobreexpresión de glicanos propios para limitar la respuesta reactiva del sistema inmune a lo propio o porque algunos glicanos pueden amortiguar las respuestas efectoras de las células T. Algunos glicanos como el ácido siálico forma parte de los llamados Patrones Moleculares Asociados Propios (“self-associated molecular patterns” SAMPs) que son reconocidos por receptores intrínsecos inhibitorios y que mantienen apagado al sistema inmune innato, (Varki, 2011). En este contexto, la expresión aberrante de glicosilaciones en las células tumorales, permite la represión activa del sistema inmune anti-tumoral de tipo mieloide y linfoide (Rodríguez et al., 2018). Estas glicosilaciones aberrantes también afectan a la función de las células presentadoras de antígenos, la diferenciación de los macrófagos al fenotipo M2 antiinflamatorio y la actividad de linfocitos T y las células Natural Killers (NK) (van Kooyk & Rabinovich, 2008).

En este contexto, descifrar la firma específica de glicanos de las células tumorales, conocida como “glico-código” (Fig. 9) es importante para entender cómo los circuitos glicano-lectina conducen a la supresión de la respuesta inmune en el microambiente tumoral. Esta propuesta, implica la clasificación mediante inmunohistoquímica de cuatro grupos de moléculas:

1) los antígenos de Lewis, fucosilados, que son reconocidos por receptores DC-SIGN (Dendritic Cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin 1) de macrófagos y células dendríticas (DC) inmaduras y que por la interacción receptor-ligando desencadenan la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-27, inducen perfiles T helper 2 (T_H2), T folicular helper (T_{FH}) o T regulatorias (T_{reg}).

2) Los antígenos con incremento de la sialilación, que son reconocidos por los ligandos SIGLECs (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins), de las DCS resultando en la secreción de T_{reg} y en la producción de la diferenciación a células T efectoras (T_{eff}) y la actividad de las NKs.

3) Las Galectinas solubles (glican binding lectins), debilitan la respuesta de las células T_{eff} , inducen la diferenciación el perfil supresivo de células mieloides y modulan la actividad NK.

4) El propio antígeno Tn, cuyo receptor es MGL (macrophage galactose-specific lectin) en macrófagos y DCs. La alta expresión de MGL induce la supresión de la respuesta inmune a través de la interacción con CD45 de los Linfocitos T_{eff} , los cuales producen bajos niveles de citoquinas y proliferan en menor proporción, de forma que el tumor consigue evadir el control del sistema inmune (Rodríguez et al., 2018; van Vliet et al., 2013; van Vliet et al., 2006). Ver figura 8.

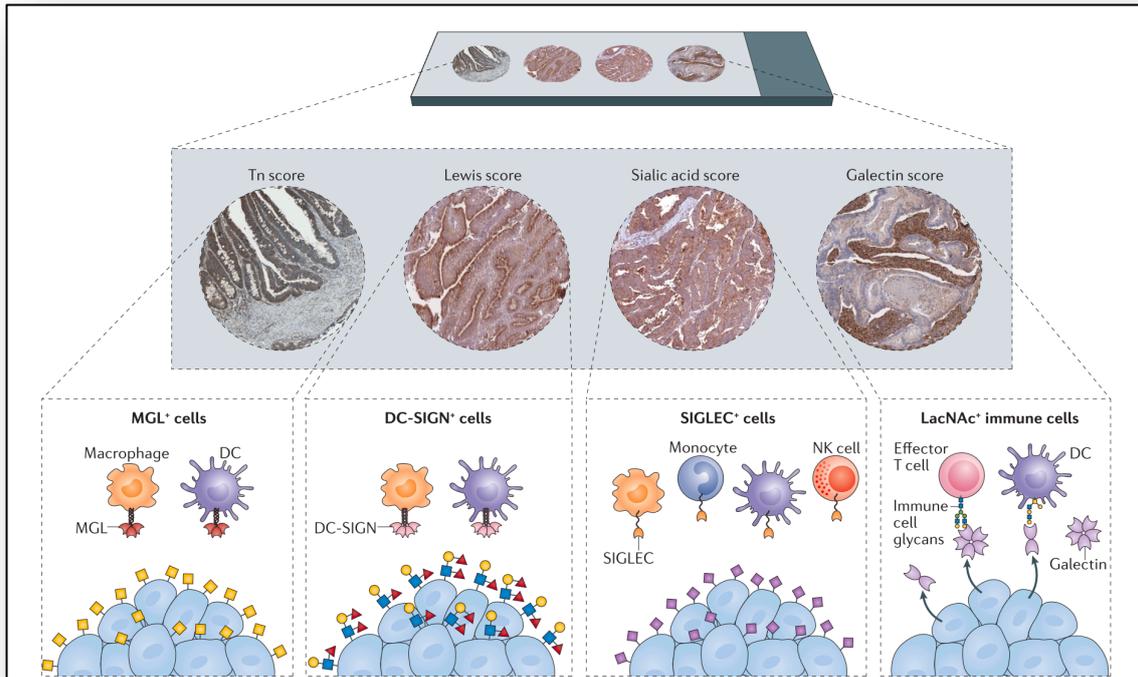


Fig. 9 El glico-código en el análisis del tumor de pacientes con cáncer. Rodríguez, E.; Schetters, S. & Kooyk, Y. (2018).

1.4 Granulicina

Las células citotóxicas, linfocitos T CD8⁺ (LT CD8⁺) y células Natural Killer (NK) son las células inmunes efectoras. Su función es eliminar células infectadas por virus, pero también pueden ejercer citotoxicidad frente a células tumorales. Son tres los mecanismos más importantes por los que son capaces de eliminar a sus células “diana”. A través de la exocitosis de gránulos citolíticos, mediante la expresión o secreción de ligandos de muerte y otra a través de la liberación de factores solubles, principalmente Interferones IFNs (Martinez-Lostao et al., 2015).

En 1987 se describió un gen que se activa tardíamente (3-5 días) en los LT CD8⁺ y que codifica para la granulicina (GRNLY) (Jongstra et al., 1987). La GRNLY se expresa dentro de los gránulos junto con otras moléculas citotóxicas como perforina y granzimas (Peña & Krensky, 1997).

La GRNLY se expresa como dos isoformas, una de 15 kDa de peso molecular que mediante la escisión del N y C terminales da lugar a la isoforma de 9 kDa (Krensky & Clayberger, 2009; Wei et al., 2016).- Recientemente, Lettau y su grupo han demostrado que las dos isoformas de GRNLY están ubicadas en LREV (Lysosome-related effector vesicles) diferentes y que son liberadas por estímulos diferentes. La de 15kDa está ubicada en LREV de tipo 1 y la de 9kDa en LREV de tipo 2, de forma que la primera es liberada por degranulación no clásica, independiente de calcio y la segunda requiere degranulación dependiente de calcio. En este sentido, la liberación de cada una depende de estímulos diferentes; así, la GRNLY de 15kDa modularía específicamente la respuesta inflamatoria junto con la expresión de FasL y la segunda la actividad antimicrobiana y citotóxica junto con Perforina y granzimas (Lettau et al., 2019). Por otro lado, en un modelo murino se ha demostrado que la GRNLY de 9kDa, puede ser liberada a partir de las NK de la decidua a células del trofoblasto infectadas con *Listeria monocitogenes* y ejercer su efecto antimicrobiano sin destruir células del trofoblasto, a través de nanotubos que se forman independientemente de la degranulación; cumpliendo así una función en la inmunotolerancia que requiere el embarazo (Crespo et al., 2020). Así mismo, a la GRNLY de 9 kDa le ha sido atribuido un papel en la respuesta inmune contra transplantes y enfermedades autoinmunes como el síndrome de Steven Johnson

La isoforma de 15 KDa no tiene función citolítica, y esta función solamente es ejercida por la de 9 KDa. Sin embargo, se ha demostrado que la isoforma de 15KDa funciona como una alarmina inmunológica, promoviendo la inflamación y la activación de los monocitos (Clayberger et al., 2012).

La GRNLY de 9 KDa es una proteína básica que posee 74 residuos. Estudios de cristalografía indican que posee cinco hélices, similar a otras moléculas de la familia “saposin like protein” (SAPLIP)(Peña & Krensky, 1997) entre las cuales están las saposinas A y C, la NK-lisina porcina, la bacteriocina AS-48 y la amebaporina. De todas estas proteínas, es la NK-lisina es la que más similitudes presenta con la GRNLY y se ha demostrado que ambas producen lisis directa de la membrana de bacterias (Anderson et al., 2003; Stenger et al., 1998). El mecanismo de acción de la GRNLY está relacionado con las interacciones electrostáticas entre la proteína, cargada positivamente a pH neutro y las cargas negativas de los fosfolípidos de membrana. La GRNLY no llega a formar poros en la membrana pero la desestabiliza y la acumulación de muchas moléculas de GRNLY actúa en un “efecto tijera” sobre la membrana,

provocando pérdida del equilibrio osmótico (Anderson et al., 2003). Además, se ha demostrado que la actividad de la granulisina es dependiente de las Argininas (Clayberger et al., 2000)

Por otra parte, las bacterias no tienen colesterol en sus membranas y eso favorece claramente la susceptibilidad a GRNLY. Dado que un contenido elevado de colesterol, que es un lípido apolar y no cargado, produce una reducción de la carga negativa neta en la membrana (Stenger et al., 1998). Algunos autores han encontrado que el colesterol es muy importante para que la GRNLY destruya las bacterias intracelulares sin dañar a la célula infectada. El contenido de colesterol de la membrana de las bacterias es bajo y esa diferencia parece favorecer la susceptibilidad a la GRNLY. Por otro lado, se ha determinado que tanto la membrana plasmática como la membrana de los organelos endocíticos tempranos están enriquecidos con colesterol pero a nivel de la membrana interna de los lisosomas no se encuentra esta clase de lípido (Zhang et al., 2009).

En la Figura 10 podemos observar el esquema de los plegamientos de la granulisina propuesto en base a estudios de cristalografía y bioinformática comparándolos con la función de otras moléculas SAPLIP. Se evidencia la forma en la cual los 5 segmentos helicoidales tipo cinta (verde) o rollo (gris) se pliegan dejando un espacio central (núcleo) y dos puentes disulfuro que conectan las hélices 1 - 5 y 2 - 3; además los iones solventes (sulfato y N-morfolino propano-sulfonato) se muestran como figuras de esfera y cilindro (carbono blanco, nitrógeno azul, oxígeno rojo, átomos de azufre verde). La membrana blanca se ubicaría en la parte superior en la zona donde se dibujan los iones negativos. Las cadenas externas son hidrófobas y protegerían al núcleo, el cual a su vez facilitaría que los pares de hélices 1-5 y 2-3 se plegaran en forma de tijeras para exponer la región más lítica de la GRNLY ubicada en la hélice 3 (Anderson et al., 2003). Además, la actividad lítica de la GRNLY, se ha demostrado que es dependiente de los residuos de Arginina de su estructura (Clayberger et al., 2000).

Estudios recientes indican que la acción antibacteriana y antiparasitaria de la GRNLY se ejerce en concierto con las granzimas (Dotiwala et al., 2016; Walch et al., 2014).

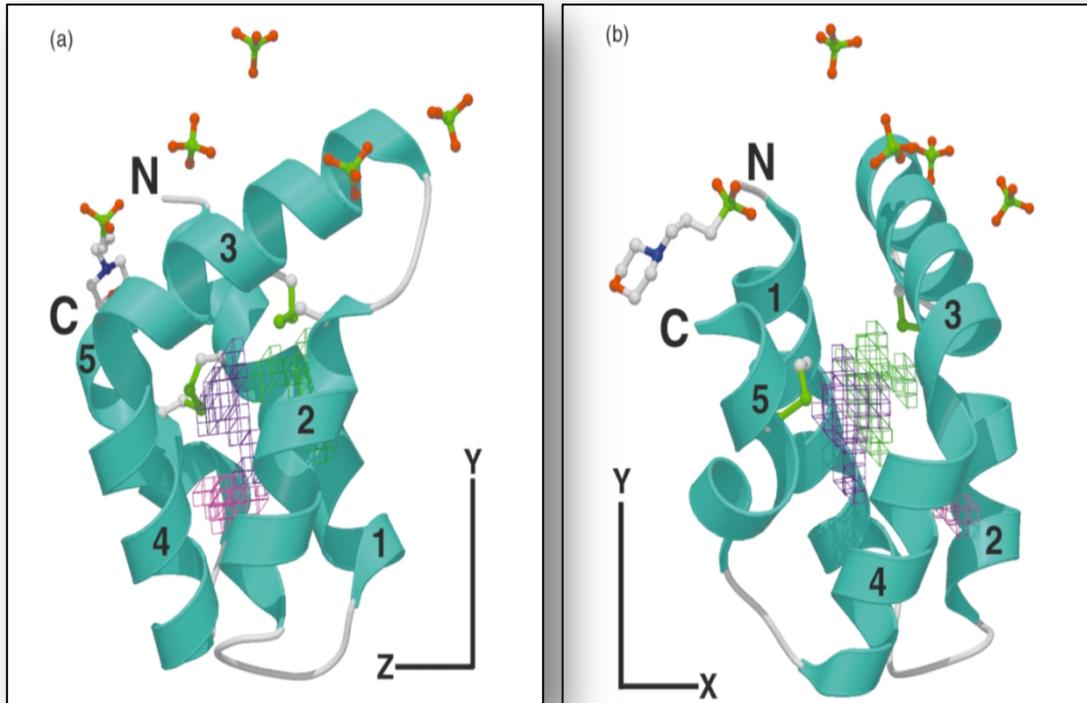


Fig. 10 Representación en cintas de la estructura de cinco hélices de la granulisina. Anderson, D. et al. (2003)

Nuestro grupo de investigación logró producir la isoforma de 9kDa de GRNLY recombinante, en *E.coli* inicialmente y luego en *P.pastoris*. Los primeros estudios mostraron que la GRNLY activa a la esfingomielinasa (SMasa), que degrada la esfingomielina y genera un marcado incremento de ceramida (proceso que demora 8 a 10h), que desencadena apoptosis. Sin embargo, la eliminación de esfingomielina y ceramida de las células, mediante el inhibidor fumomisina B, no detuvo la muerte celular por apoptosis (Gamen et al., 1998).

Se ha descrito posteriormente que la GRNLY recombinante puede activar una vía de apoptosis dependiente de caspasas que debuta con incremento de los niveles de Ca^{2+} posiblemente por desestabilización de la membrana plasmática. Este incremento de Ca^{2+} intracelular puede conducir al incremento de especies reactivas de oxígeno o ROS detectables a las 3-4h y seguidamente a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que a su vez daría paso a la liberación de factores proapoptogénicos como AIF y Citocromo C (Cyt C) (Aporta et al., 2014; Kaspar et al., 2001; Pardo et al., 2001).

Finalmente, el Cyt C forma el apoptosoma, donde se activa la caspasa-9 que a su vez activa la caspasa-3, fase final de la apoptosis. Por otro lado, AIF es capaz de translocar al núcleo e inducir una muerte celular independiente de caspasas. Además, se ha planteado que la GRNLY podría inducir permeabilización de lisosomas, liberando catepsina B y desencadenando necroptosis (Zhang et al., 2009). Por otra parte, el grupo del Dr. Krensky ha demostrado que cuando la GRNLY media su ingreso al citoplasma a través de la perforina, se activa una respuesta de estrés de retículo endoplásmico que produce la activación de la caspasa 7 (Martínez-Lostao et al., 2015). Todos los mecanismos antes descritos se pueden ver en la Figura 11 procedente de Martínez-Lostao 2015.

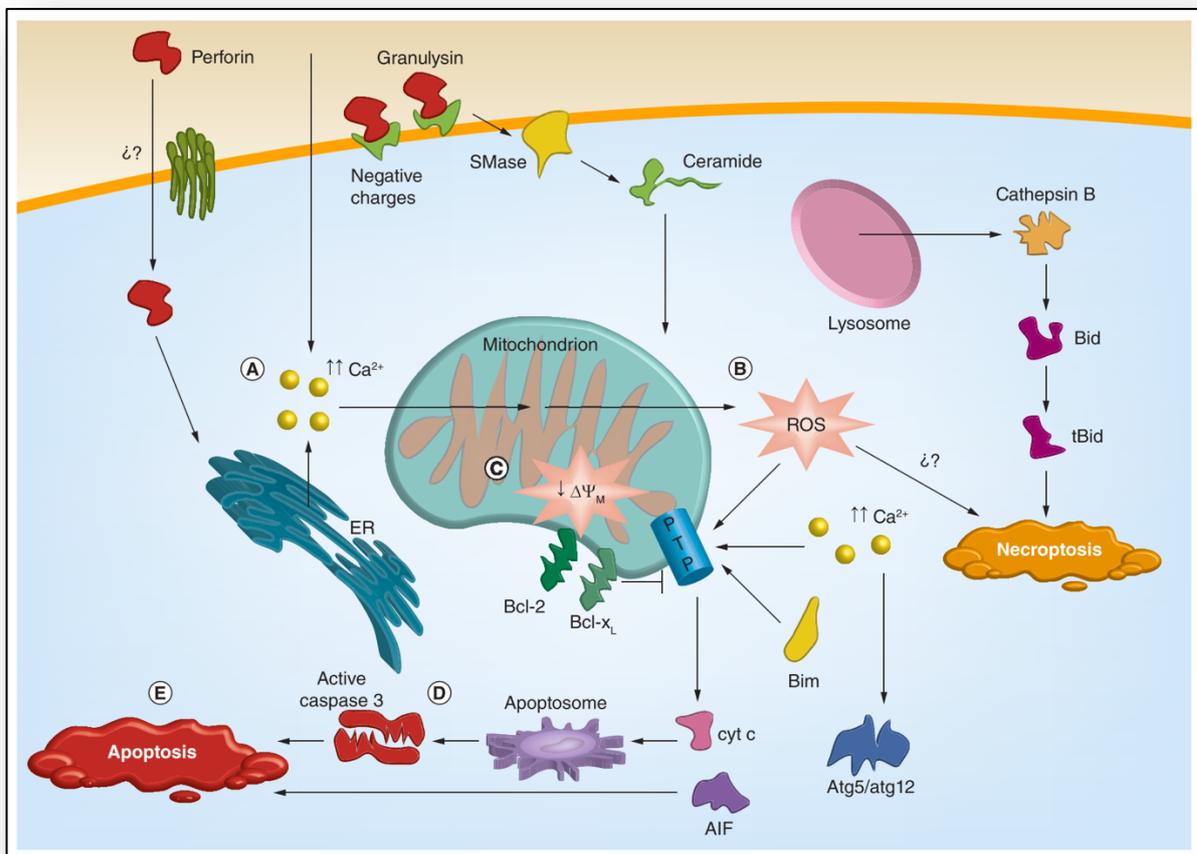


Fig. 11 Mecanismos de inducción de muerte celular dependientes de GRNLY. Martínez-Lostao et al. (2015).

Por otra parte, se ha demostrado una cierta selectividad de la GRNLY recombinante hacia las células tumorales. Se demostró que la GRNLY es citotóxica sobre células leucémicas,

líneas celulares de mieloma múltiple y células de pacientes de leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), mientras que resulta inocua sobre los linfocitos de donantes sanos (Aporta, 2014). Esta selectividad, como en el caso de las bacterias y liposomas de composición definida (Barman et al., 2006), puede ser debida a diferencias en la composición lipídicas de las membranas; mientras que la relación colesterol/fosfolípidos es elevada en la membrana plasmática de los linfocitos humanos no activados (Anel et al., 1990) esta relación es mucho menor en la membrana de las células tumorales (Anel. et al., 1992).

1.5 Anticuerpos anti-Tn: SM3 y AR20.5

A mediados de la década de 1990, se dispuso de una gran cantidad de anticuerpos monoclonales anti-MUC1 que requerían comparación y estandarización. Así, el Taller Internacional ISOBM TD-4 sobre Anticuerpos Monoclonales contra MUC1 en 1996 se convirtió en un hito en el campo. Se compararon 56 anticuerpos monoclonales supuestamente específicos de MUC1 (mAb) y se mapearon sus epítomos. Entre otros, se evaluó a SM3 (Karsten et al., 2004). Ver Fig. 12.

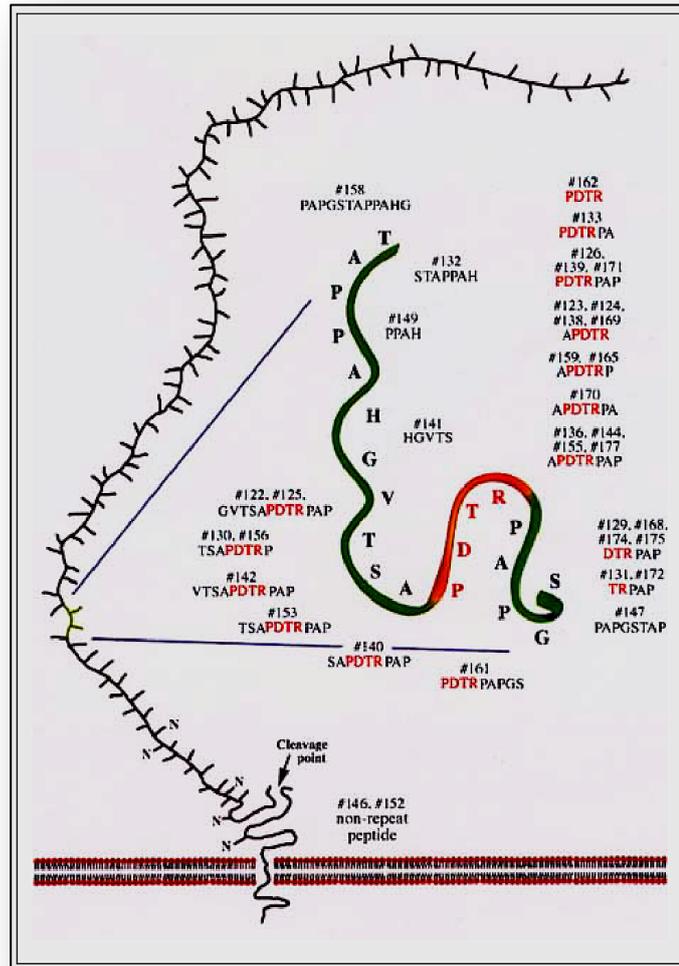


Fig. 12 Anticuerpos monoclonales TD-4 reaccionando con epítopes de MUC1 (SM3 #165) Price M.R. et. al. (1998).

SM3 (stripped mucin 3) es un anticuerpo monoclonal que fue desarrollado en ratón, reconoce la secuencia Ala-Pro-Asp-Thr(α -O-GalNAc)-Arg-Pro (APDTRP) (Sánchez F. et al., 2016) de la estructura aberrantemente O-glicosilada de MUC1 o antígeno Tn desnuda o parcialmente desnuda (con glicosilaciones aberrantes). Este anticuerpo no reconoce MUC1, la molécula intacta con glicosilaciones normales; convirtiéndolo en un gran candidato para diagnóstico histo-patológico de cáncer de mama, modelo inicial de los estudios (Burchell et al., 1987).

Como ya se ha mencionado antes, la glicosilación aberrante que da origen al antígeno Tn puede darse tanto en las Ser o Thr, pero se ha descubierto, a nivel atómico, que la

afinidad de SM3 difiere dependiendo de dónde se ubica GalNAc; esto es, si se ubica en Ser es superior debido al débil enlace de hidrógeno entre O6 y Tyr32L, y al contacto hidrofóbico entre el grupo metilo de la unidad GalNAc y Trp33H. Estos hallazgos enfatizan las diferencias entre estos dos antígenos Tn en el contexto de reconocimiento por anticuerpos anti-MUC1, lo cual es relevante en el diseño de nuevos anticuerpos y biosensores (Martínez-Sáez et al., 2015).

Otro anticuerpo que reconoce el antígeno Tn de MUC1, es AR20.5, un anticuerpo monoclonal murino de tipo IgG₁ que se seleccionó mediante Pepscan a partir de la inmunización de un ratón BALB/c con MUC1 aislado a partir de líquido ascítico de una paciente con cáncer de ovario (Movahedin et al., 2017) y se ha establecido que la secuencia del epítipo que reconoce es DTRPAP (Mehla et al., 2018). El anticuerpo se caracterizó y probó en dos modelos murinos, uno un modelo humanizado con PBL-SCID / beige (huPBL-SCID) y otro CB6F1 xenotransplantados con un tumor MUC1⁺ para establecer su eficacia terapéutica. Se indujo una actividad antitumoral significativa después de la administración repetida de MAb AR20.5 (4 dosis). Los resultados sugieren que la administración de AR20.5 puede usarse para tratar tumores que expresan MUC1 induciendo respuestas inmunes específicas de tumor (Qi et al., 2001).

Movahedin y su grupo han estudiado la importancia de las glicosilaciones de MUC1 en el reconocimiento de sus epítipos por parte de AR20.5. Se observó que la afinidad de AR20.5 por su blanco se incrementa cuando éste está glicosilado; sin embargo, las glicosilaciones no forman ningún contacto polar específico con el anticuerpo sino que contribuyen a estabilizar una conformación bioactiva extendida del péptido reconocido por el anticuerpo (Movahedin et al., 2017). En concordancia, otros estudios confirman que SM3 forma un complejo con una forma típica de hélice cuando el antígeno libre está O-glicosilado en Thr, mientras que AR20.5 requiere una conformación diferente (denominada PPII de tipo extendido) para que Thr fije adecuadamente el antígeno en el sitio de unión. En otras palabras, el reconocimiento del antígeno es diferente para cada anticuerpo y esta variación significativa podría explicar la mejora en la afinidad observada en la glucosilación con el anticuerpo AR20.5 en relación con SM3 (Martínez-Sáez et al., 2017).

Las imágenes a continuación muestran las estructuras moleculares de los anticuerpos con sus respectivos ligandos.

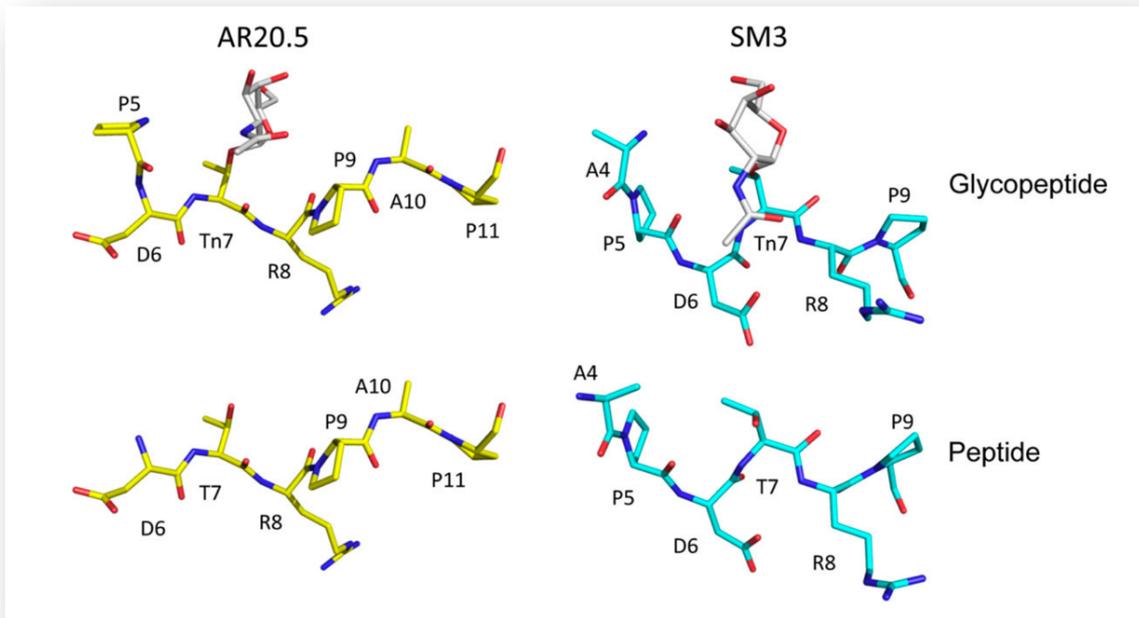


Fig. 13 Conformación de glucopéptidos y péptidos unidos a AR20.5 y SM3. Movahedin et al. (2017).

SM3 ha sido usado para disminuir el crecimiento tumoral desde hace más de un cuarto de siglo, cuando el desarrollo biotecnológico permitió la creación de los anticuerpos Fv (fraction variable) o scFv (small chain fragment variable). En ensayos *in vitro* (línea celular BDC de adenocarcinoma biliar) y en ratones SCID xenotransplantados con la misma línea celular, se administró 4 dosis (IV) de 2×10^7 anticuerpos monoclonales murinos de tipo IgG1 biespecíficos: anti-MUC1/anti-CD3 y anti-MUC1/anti-CD28 en combinación con la transferencia adoptiva de células LAK (Lymphokine-activated killer) T cells. Los resultados dieron una respuesta moderada con inhibición del crecimiento tumoral y resultados *in vitro* con 60% de toxicidad en el mejor de los casos (Katayose et al., 1996). El mismo grupo repitió el experimento añadiendo a la terapia un tercer anticuerpo biespecífico anti-MUC1/anti-CD2, lo cual optimizó los resultados (Kodama et al., 2002).

La relevancia de SM3 como tratamiento en tumores MUC1 positivos ha llevado a que se use para desarrollo de CAR-T cells (chimeric antigen receptor-T cell), una estrategia inmunoterapéutica basada en la bioingeniería genética, que ha resultado muy exitosa sobre todo en pacientes con leucemia linfocítica aguda y linfoma. Mediante la construcción artificial de un TCR con un paratopo específico, la respuesta de las células T se direcciona a un antígeno

tumoral concreto en lugar de depender de la presentación antigénica. Los primeros ensayos en humanos fueron desafortunados pero permitieron perfeccionar los constructos, sobre todo gracias a la secuenciación génica (Wilkie et al., 2008).

En el año 2008 se llevó a cabo un ensayo con dos líneas CAR-T cell, una conjugada con SM3 (scFv) y secuencias citoplásmicas de CD28, CD3 ξ , 4-2BB y OX40, denominada SM3-CAR; y otra línea que en lugar de SM3 se conjugó con HMFG2, otro anticuerpo anti-MUC1. Este ensayo no mostró toxicidad y se obtuvieron resultados prometedores como primer intento de usar MUC-1 como blanco terapéutico en ratones SCID/Beige con xenoinjerto de la línea tumoral humana MDA-MB-435 (Wilkie et al., 2008).

En el año 2016, Posey y colaboradores usaron un anticuerpo anti-Tn en modelos murinos NSG sistémicos de leucemia y cáncer de páncreas, denominado 5E5, el cual redujo el crecimiento tumoral y prolongó la supervivencia de forma significativa respecto a los controles que no tenían direccionadas las células T (Posey et al., 2016). Concomitantemente, se reportó el ensayo clínico (NCT02587689) en un paciente con cáncer metastásico de vesícula seminal con dos CAR-T cells anti MUC1 administrados de forma intratumoral (dos dosis de 5×10^5 en 2 lesiones diferentes), uno conjugado con SM3, denominado SM3-CAR y otro con un SM3 con 6 aminoácidos modificados, denominado pSM3-CAR. La respuesta más potente se observó con pSM3, apreciándose necrosis en el tumor con gran infiltración de células T, predominando las CD8+ (You et al., 2016). Estos resultados nos llevan a dimensionar la importancia que, como herramienta terapéutica, tiene SM3, pues el gran número de investigaciones que se han efectuado hasta ahora, la posicionan como una terapia antitumoral con mucho potencial.

En lo que respecta a AR20.5, en el año 2004 se realizó un ensayo clínico fase I con el anticuerpo monoclonal murino original denominado BrevaRex®. A un grupo de 17 pacientes con cáncer avanzado de diferentes tipos MUC1 positivos, refractarios a terapias convencionales, recibieron 6 dosis del tratamiento IV (intravenoso). No presentaron toxicidad o hipersensibilidad, pero 15 desarrollaron xenoanticuerpos contra la fracción murina y 7 anticuerpos anti-MUC1. La respuesta T específica anti-MUC1 se detectó en 10 pacientes. Solamente se pudo demostrar la estabilización de la progresión tumoral en un paciente debido a que 11 abandonaron el estudio por progresión de la enfermedad (de Bono et al., 2004).

Un estudio reciente usó modelos murinos MU1.Tg xenotransplantados (SC) con tumores pancreáticos (línea Panc02.MUC1) tratados con 3 dosis de 50ug de AR20.5 solo o en combinación con Gemcitabina y/o anticuerpos anti-PD-L1 y/o PolyICLC. Se demostró que AR20.5 produce una respuesta inmune de células T CD8+ sostenida y que claramente potencia la acción terapéutica de la gemcitabina sola, prolongando la supervivencia de los ratones, pero no eliminando el tumor. En el grupo de ratones tratados con la combinación de AR20.5 con anti-PD-L1 y PolyICLC se produjo eliminación total del tumor tras 70 días en 50% de los casos y el 50% restante disminuyeron sensiblemente la velocidad del crecimiento tumoral. Esta respuesta fue puesta a prueba con un nuevo xenotransplante en los ratones en el flanco opuesto al del primer xenotransplante, determinándose que una gran proporción de aquellos en los cuales se inoculó la misma línea celular (Panc02.MUC1) rechazaron el tumor pero aquellos a los que se les inoculó Pac02.Neo, fracasaron en rechazar el tumor, lo que indica especificidad en la respuesta inmune (Mehla et al., 2018). Cabe señalar que los ensayos preclínicos en modelos murinos tienen el inconveniente de las diferencias en la maquinaria de glicosilación y la expresión de lectinas en células inmunes, lo que condiciona la extrapolación de resultados a humanos (Rodríguez et al., 2018).

1.6 Desarrollo de Inmunotoxinas SM3GRNLY y AR20.5GRNLY como estrategia antitumoral

La inmunovigilancia plantea que el sistema inmune del huésped debe reconocer epítomos específicos de tumor para montar una respuesta antitumoral efectiva, definiendo así la antigenicidad de un tumor (Criscitello et al., 2019). Una de las estrategias que se han generado para lograrlo son los inmunoconjugados o inmunotoxinas formadas por un anticuerpo con una alta afinidad dirigido a un blanco específico y conjugado con una molécula como un radioisótopo, un fármaco, un RNA de interferencia o proteínas citotóxicas. Las inmunotoxinas (ITs), también denominadas ADC (del inglés antibody drug conjugates), son una clase de inmunoconjugados compuestos por un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo dirigido unido a una toxina completa o modificada; es decir que los ITs pretenden liberar una toxina en una célula blanco aprovechando la alta especificidad por una secuencia de aminoácidos del anticuerpo (Kim et al., 2019; Nicolò et al., 2020). Los mecanismos de acción descritos para las ITs son la internalización y liberación en el citoplasma luego de la liberación del enlace al anticuerpo y un segundo mecanismo es el “efecto espectador” donde la toxina alcanza a

desplegar su efecto citotóxico en las células cercanas a la célula donde el anticuerpo reconoció a su antígeno aunque éstas no expresen dicho antígeno (Boni et al., 2020).

Las ITs más comunes usan toxinas derivadas de bacterias o de plantas y la mayoría de ellas está conformada por un dominio de unión e internalización a la célula blanco, un dominio de traslocación al citosol y por la propia toxina que ejerce sus efectos tóxicos (Kim et al., 2019). El dominio de unión a la célula blanco de las ITs se construye en base a la tecnología de hibridoma, que ha sido durante mucho tiempo una herramienta e indispensable para generar anticuerpos monoclonales (mAb) de alta calidad. Permite el aislamiento y la producción en grandes cantidades de mAb con alta afinidad y especificidad contra antígenos solubles o unidos a la membrana. Esta tecnología fue desarrollada en 1975 por Kohler y Milstein (Köhler & Milstein, 1975), quienes recibieron un Premio Nobel por este logro, en el que la producción de anticuerpos por células B del bazo obtenidas de ratones inmunizados se immortalizó por fusión con células de mieloma. Más adelante, en 1985, Smith se centró en la selección de un particular fenotipo (ligando específico para un blanco específico) desde un repertorio de moléculas de un fago. Cinco años más tarde, McCafferty y sus colegas demostraron que la presentación de fragmentos de anticuerpos en fagos era concebible mediante el uso de vectores para introducir ADN de anticuerpos en genomas de fagos, combinando así genotipo y fenotipo en una partícula de fago. El concepto detrás de esta tecnología de visualización es que se crea una gran biblioteca de anticuerpos potencialmente eficientes, a partir de la cual se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos con especificidad y afinidad deseables contra un antígeno específico (Loureiro et al., 2015).

Los últimos avances han permitido el desarrollo de fragmentos scFv (small chain fragment variable) cuyo dominio V mantiene unido por fuerzas no covalentes las fracciones pesada (V_H) y liviana (V_L) con un pequeño péptido de unión o un puente disulfuro. Han sido construidos anticuerpos bi y multivalentes con diferentes especificidades (Ahmad et al., 2012). Se ha reportado que las terapias con mejor penetración tumoral se basan en los fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) que son los más adecuados para administrar una carga útil tóxica, dado su menor tamaño en comparación con la IgG completa (Chowdhury et al., 1998; Deckert, 2009; Sanz et al., 2002). Las llamadas inmunotoxinas recombinantes, han sido probadas en numerosos ensayos clínicos (Kowalski et al., 2012; Kreitman et al., 2018, 2016; Tomé-Amat et al., 2015). En el año 2018, la Administración de Alimentos y Medicamentos de

EE. UU., aprobó la primera inmunotoxina, moxetumomab pasudotox, para el tratamiento de la Leucemia de células peludas, un scFv anti-CD22 fusionado a una forma truncada de exotoxina A de *Pseudomonas* (Kreitman et al., 2018). Así mismo, la proteína de fusión basada en la misma toxina y dirigida contra EpCAM ha entrado en la Fase 3 en un ensayo clínico de cáncer de vejiga (Ibáñez-Pérez et al., 2019; Kowalski et al., 2012).

En nuestro trabajo anterior generamos una inmunotoxina quimérica combinando la granulicina con el fragmento de anticuerpo scFv dirigido contra el antígeno tumoral CEA, llamado MFE23. Demostramos que esta inmunotoxina era activa contra tumores que expresaban CEA tras inyección sistémica, mientras que la granulicina sola no poseía esa actividad. Estos experimentos constituyeron la prueba de concepto en cuanto a que se podía utilizar esta estrategia para direccionar la granulicina hacia el sitio de desarrollo tumoral siempre que el tumor expresara el antígeno reconocido por el anticuerpo (Ibáñez-Pérez et al., 2019). Sin embargo, al estar la expresión de CEA limitada a tumores de colon o gástricos, la aplicación de esta inmunotoxina estaría limitada a ese tipo concreto de tumores.

Por el contrario, el antígeno Tn es expresado por multitud de tumores, tanto tumores sólidos como leucemias, y la generación de inmunotoxinas basadas en la granulicina y dirigidas contra este antígeno permitiría un espectro mucho más amplio en el tratamiento antitumoral. Teniendo en cuenta el conocimiento existente sobre el propio antígeno Tn y sobre los anticuerpos SM3 y AR20.5 expuestos en los puntos anteriores de esta Introducción, en esta tesis doctoral se generaron dos nuevas inmunotoxinas combinando a la granulicina con scFv derivadas de estos dos anticuerpos, que llamaremos SM3GRNLY y AR20.5GRNLY, optimizando su producción en la levadura *Pichia pastoris*.

1.7 *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) como sistema de expresión de SM3GRNLY y AR20.5GRNLY

Una cepa de *Pichia pastoris* que crece en altas densidades ($>130\text{g/l}^{-1}$ de peso seco) en cultivos continuos con metanol fue desarrollada por Phillips Petroleum Company (PPC) en los años 1970 (Cereghino & Cregg, 1999). Posteriormente, en el Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA), se desarrolló la tecnología para

producir proteínas recombinantes en *P.pastoris*. Para ello se generó el promotor para alcohol oxidasa AOX, vectores, cepas y los protocolos moleculares. En 1993 Research Corporation Technologies (Tucson, AZ) adquirió la patente y concomitantemente SIBIA otorgó una licencia a Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) para la comercialización (Fickers, 2014).

Siendo que se ha clasificado como un microorganismo “generally regarded as safe” (GRAS), *P.pastoris* ha sido usado para producir alrededor de 500 proteínas farmacéuticas y más de 1000 proteínas recombinantes (Fickers, 2014) y se ha reportado como sistema de expresión en casi 7000 artículos de investigación desde 2003 (Brady et al., 2020).

El éxito de *P. pastoris* como un sistema tan versátil se atribuye principalmente a su capacidad para crecer a una alta concentración de biomasa (hasta 200 g l^{-1} DW¹) en medios definidos, su capacidad para realizar complejas modificaciones postraduccionales que incluyen el plegamiento correcto de proteínas, la formación de enlaces disulfuro y la glicosilación, su alta eficacia de secreción y su repertorio de promotores inducibles y constitutivos (Daly & Hearn, 2005; Irani et al., 2016; Puxbaum et al., 2015; Theron et al., 2018; Yang & Zhang, 2018). Otra ventaja de *P. pastoris* se basa en su capacidad para secretar grandes cantidades de proteína recombinante con un bajo nivel de secreción de proteínas endógenas en el medio de cultivo. Por lo tanto, la secreción permite evitar la toxicidad potencial de las proteínas acumuladas intracelularmente y simplifica los procesos de aislamiento / purificación de proteínas al separar las proteínas recombinantes del grueso de las proteínas (Theron et al., 2018).

¹ Dry weight = peso seco

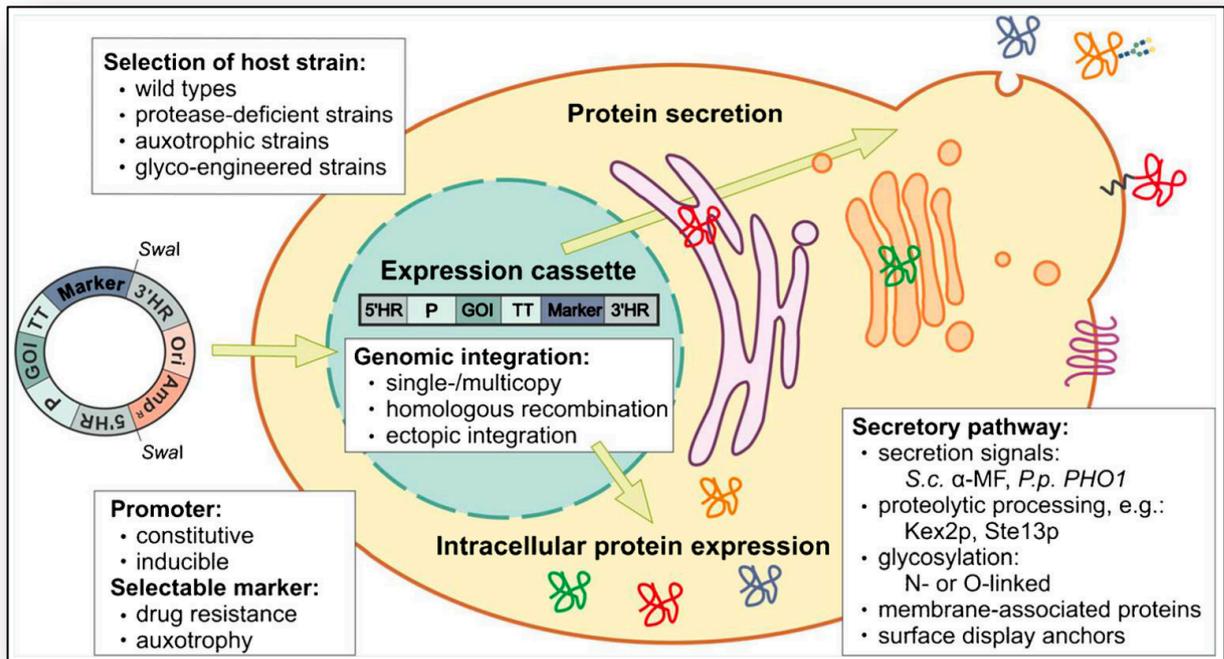


Fig. 14 Esquema sobre las ventajas de *P.pastoris* para la producción de proteínas recombinantes. (Ahmad et al., 2014).

Después de casi 30 años de uso, el nombre *P.pastoris* fue reclasificado para incluir dos organismos distintos: *Komagataella pastoris* (cepa NRRL Y-1603 / CBS704) y *K. phaffii* (cepa NRRL Y-11430 / CBS7435). Al principio de su uso, se produjo mutagénesis en *K. phaffii* Y - 11430 con nitrosoguanidina para generar el auxótrofo de histidina, GS115, que se hizo popular por la facilidad para integrar un gen heterólogo en el genoma utilizando la complementación de HIS4. Más tarde, se reportó que X-33 fue creado mediante la complementación de HIS4 en GS115 para restaurar la prototrofia; sin embargo, estudios han demostrado que X-33 no posee el fenotipo HIS4 salvaje. X-33 y GS115 ofrecen ventajas sobre Y - 11430 relacionadas con la eficiencia de transformación (X- 3) y la secreción de proteínas (X-33 y GS115), aunque con deficiencias de crecimiento (Brady et al., 2020).

La entrada en la vía secretora de las proteínas expresadas por *P.pastoris* está mediada en la mayoría de los casos por la secuencia líder pre-pro del factor de apareamiento-alfa de *Saccharomyces cerevisiae* (MFα, también llamado por sus siglas en español factor de apareamiento tipo alfa, FATα), el cual es el más comúnmente usado por ser muy eficiente

conduciendo la secreción proteica desde el Retículo Endoplásmico (ER). Recientemente, se ha modificado la secuencia líder pre-pro de MF α con la finalidad de mejorar aún más los niveles de secreción en *P. pastoris*. (Puxbaum et al., 2015).

La producción de proteínas recombinantes podría llevar a estrés de retículo, lo que a su vez activaría la respuesta de proteínas no plegadas (UPR, del inglés unfolded protein response) a través de la activación de genes como Ire1 junto con el inhibidor Kar2 y el factor de transcripción HAC1, el cual se activa por empalme alternativo de su mRNA. Si las proteínas se acumulan en el ER, Kar2 se disocia de Ire1 que actúa como chaperona, mientras Ire1 activa su función endonucleasa. En *P. pastoris* se ha caracterizado HAC1 y se ha visto que se induce cuando se incrementa la osmolaridad, la temperatura y con metanol; sin embargo, no se ha demostrado empalme alternativo. Se especula que HAC1 con empalme alternativo se expresa constitutivamente y puede ser responsable de la mayor capacidad secretora de *P. pastoris* comparado con *S. cerevisiae*. Una vez que la proteína se ha producido, antes de salir del retículo endoplásmico (ER), se lleva a cabo el plegamiento de las proteínas, procesamientos postraduccionales y glicosilaciones para lo cual intervienen chaperonas, proteínas disulfuro isomerasas y enzimas para la glicosilación; sin embargo, la mayoría de la información que se sabe acerca de la maquinaria de secreción de *P. pastoris*, se ha inferido de la de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Puxbaum et al., 2015).

El proceso de glicosilación de las proteínas recombinantes expresadas en *P.pastoris* difiere de la de mamíferos y la repercusión sobre la respuesta farmacológica es importante. Empieza con la transferencia de un residuo de manosa del fosfato-dolicil a un residuo de serina o treonina por medio de la acción enzimática de una proteína O-manosiltransferasa (PMT) en el retículo endoplásmico. La primera fase se adicionan residuos de manosa α -1,2- mediante la enzima Kre2 (o Mtl1) (Delic et al., 2013). Los o-glicanos reportados son unidades de 1-5 manosas que se unen a nivel de carbono α -1,2-, α -1,6- y α -1,3-. Está claro que los O-enlaces de los glicanos de *P. pastoris* son heterogéneos con respecto a sus enlaces glicosídicos, incluso en glicanos tan pequeños como un disacárido. Este es un aspecto importante a considerar cuando se producen polipéptidos terapéuticos en *P. pastoris*, ya que la heterogeneidad de los glucanos unidos puede alterar las características bioquímicas del compuesto y disminuir sus efectos terapéuticos (Boraston et al. 2003; Liu et al., 2013). Como se puede ver en la figura 15, la segunda fase de o-glicosilación se lleva a cabo en el aparato de Golgi. Se han descrito la

generación del disacárido $\text{Man}\beta 1,2\text{Man}\beta 1,2$ y una pequeña cantidad de un Manó-fosforilado ramificado, lo que tiene importancia desde el punto de vista inmunológico porque en *Candida albicans* y *Candida quilliermondii* se ha descrito que este tipo de estructuras forman parte de factores antigénicos 6 y 9 respectivamente (Trimble et al., 2004). Las enzimas que intervienen en la formación de los enlaces β pertenecen a la familia BMT -betamanosiltransferasas (Delic et al., 2013). Se han planteado estrategias para procurar que las O-glicosilaciones se asemejen a las humanas y conservar las cualidades terapéuticas de los compuestos a la vez que se elimina la inmunogenicidad (Liu et al., 2013).

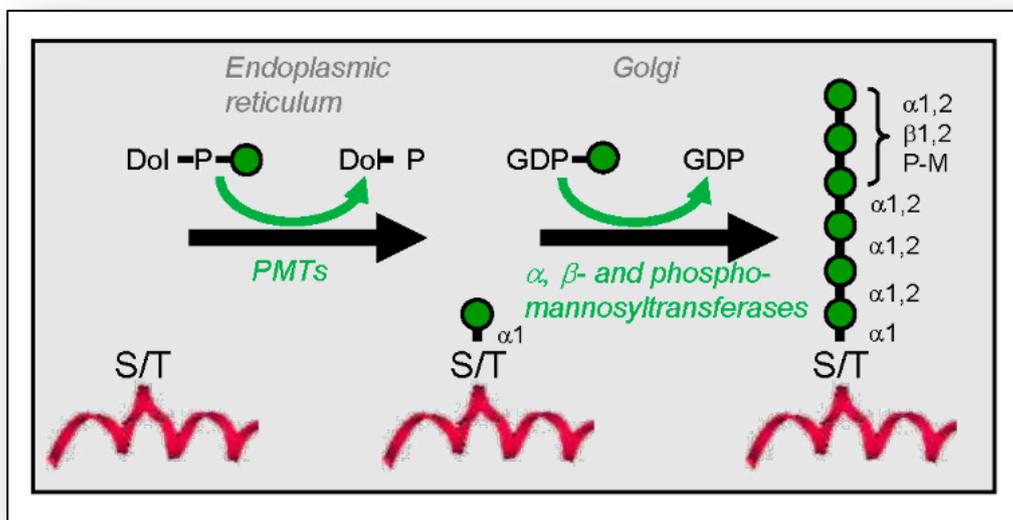


Fig. 15 O-glicosilación en *P.pastoris salvaje*. (Nett et al., 2013).

El mecanismo que, luego de pasar los controles de calidad en el ER, permite que las proteínas sean transportadas al Golgi, es a través de las vesículas COP-II (coat protein complex). Estas brotan cerca de los sitios de transición del ER (tER), organizada en pilas ordenadas, similar a lo que sucede en mamíferos, lo que la diferencia de *S. cerevisiae*, donde el Golgi se distribuye por toda la célula. En *P. pastoris* las vesículas COPII están constituidas por una capa interna formada por las proteínas *Sar1*, *Sec23* y *Sec24*; y una capa externa formada por las proteínas *Sec13* y *Sec31*; además *Sec16* actuaría como reguladora negativa de la actividad GTPasa de *Sar1* y ,en asociación con *Sec12* incrementarían la producción de *Sar1-GTP* (Bharucha et al., 2013; Delic et al., 2013). Ver figura 16.

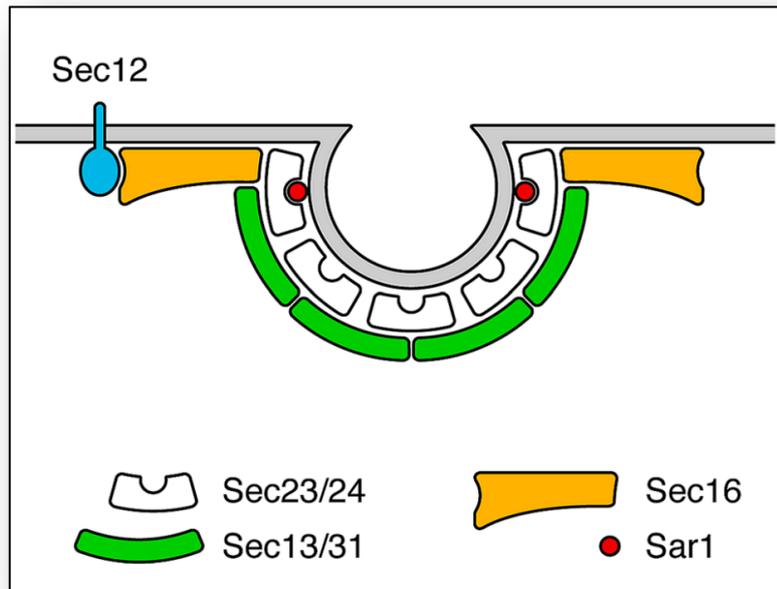


Fig. 16 Diagrama especulativo de un corte transversal de una vesícula COPII en formación. Bharucha N. et. al. (2013).

Se ha demostrado que una vez que se han producido las proteínas, puede ocurrir proteólisis de las proteínas que no han sido correctamente plegadas a través de la chaperona Kar2. Si la proteína está unida a Kar2 por mucho tiempo, se activa el mecanismo de degradación asociado a UPR y ER llamado ERAD. El mecanismo consiste en el retorno de la proteína al citosol a través del complejo Sec61-Kar2 y la ubiquitinación para trasladarla al proteosoma y degradarla. Este proceso se ha demostrado que sucede en cerca del 60% de una proteína recién sintetizada en *P.pastoris* (Puxbaum et al., 2015).

Una vez que la proteína ha salido del Golgi, las vesículas tardías pueden pasar directamente a la vacuola a través de la vía de la fosfatasa alcalina y allí ser degradada o pasar a través de la vía carboxypeptidasa Y que transporta la proteína desde los endosomas. La degradación de las proteínas recombinantes por las vacuolas está descrita como un “cuello de botella” en la producción de proteínas en *S.cerevisiae* y *S.pombe*. Lo contundente de la evidencia ha conducido a la generación cepas *knock-out* de Invitrogen *PEP4* (proteína A) y *PRB1* (proteína B), proteasas que se autoactivan y también activan otras proteasas en la vacuola (Invitrogen Manual: PichiaPink Expression System 2014) (Cregg, 1993; Puxbaum et al., 2015). La vacuola alberga numerosas exopeptidasas y endopeptidasas que contribuyen a lo

que a menudo se considera la función principal de la vacuola, la degradación de proteínas y orgánulos senescentes, superfluos y dañados. La función de la vacuola también es vital en condiciones de estrés nutricional, cuando el crecimiento celular y la proliferación están regulados negativamente y las proteínas deben descomponerse para que sus aminoácidos constituyentes puedan reciclarse. Además, PEP4 y PRB1 parecen participar en un amplio mecanismo de respuesta al estrés, que es independiente de los procesos autofágicos y afecta los procesos regulatorios como la expresión génica y la muerte celular programada. Así mismo, a nivel de la pared celular de *P.pastoris* se encuentra las yapsinas, unas aspartil proteasas ancladas con GPI (glicosilfosfatidilinositol) que participan en el ensamblaje y la remodelación de la pared celular y también son importantes para la integridad de la misma. La yapsina 1 (YPS1), junto con las proteasas de la vacuola, tienen un gran impacto en la proteólisis de las proteínas recombinantes. Se ha demostrado un incremento de 40-80% en la producción de proteína recombinante al combinar las cepas doble knock-out *PEP4/YPS1* (Puxbaum et al., 2015).

El paso final de la vía secretoria de transporte de vesículas livianas y densas desde el Golgi (secreción constitutiva) es la fusión con la membrana plasmática. El evento de exocitosis es realizado por un complejo llamado exocisto. Además del exocisto, los v-SNARE (SNAP= Soluble NSF Attachment Protein Receptor / “v” de vesícula) y los t-SNARE (“t” de target) están implicados en la exocitosis. Las vesículas derivadas de Golgi que portan los v-SNARE Snc1 y Snc2 se fusionan con la membrana plasmática, donde se ubican los t-SNAREs Sso1 y Sso2 (Delic et al., 2013).

A nivel celular, las fases que permiten la síntesis y secreción de proteínas desempeñan un papel relevante en la producción de proteínas heterólogas; sin embargo, la mayoría de los factores y procesos mencionados anteriormente dependen también de las condiciones de cultivo, como las concentraciones de nutrientes e inductores, temperatura, aireación, agitación, etc., lo que hace que su predicción precisa sea aún más compleja (Theron et al., 2018).

1.8 Campos eléctricos pulsados (PEF) para mejorar la extracción de SM3GRNLY y AR2.5GRNLY

1.8.1 ¿Qué es PEF y cómo actúa?

De su nombre en inglés Pulsed Electric Field (PEF), es una tecnología no térmica que provoca el incremento de la permeabilidad de la membrana celular (electroporación) mediante la aplicación de pulsos de alto voltaje y de una duración del orden de microsegundos a milisegundos entre dos electrodos (Martínez et al., 2017). El voltaje aplicado entre dos electrodos genera un campo eléctrico cuya intensidad depende además del voltaje de la distancia entre los electrodos. Es el campo eléctrico el responsable de los efectos de los tratamientos PEF sobre las células.

Casi todas las células mantienen una diferencia de potencial eléctrico entre el lado interno y externo de su membrana plasmática, generada y regulada por un sistema de bombas de iones y canales que se denomina voltaje transmembrana en reposo (TMV). En las células eucariotas, el TMV en reposo generalmente oscila entre -40 y -70 mV, en el sentido de que el potencial interno es más bajo que el externo. Como este es el estado natural de las membranas biológicas, sus componentes lipídicos y proteicos están evolutivamente bien adaptados y funcionan a bajos voltajes en este rango. Una exposición de una célula a un campo eléctrico externo provoca un incremento del potencia transmembrana de la célula que se mantiene durante la exposición y es proporcional a la intensidad del campo eléctrico externo (Kotnik et al., 2019).

Si el PEF aplicado es lo suficientemente intenso como para aumentar el potencial transmembrana a valores entre 250 – 500 mV, se produce la formación de poros de la membrana. La principal consecuencia de la electroporación de la membrana es la entrada de moléculas impermeables a la membrana en la célula y la salida de biomoléculas desde la célula (Kotnik et al., 2019).

Según la intensidad del campo eléctrico aplicado los poros pueden volverse a cerrar cuando cesa el tratamiento (electroporación reversible) o permanecen abiertos (electroporación

irreversible). La **electroporación reversible** es una herramienta muy utilizada en los laboratorios de Biología Molecular para transformar células y también se utiliza en el campo de la Medicina para tratamientos de Terapia Génica. La **electroporación irreversible** se usa para matar directamente las células cancerosas, inactivar microorganismos en alimentos o extraer sustancias de interés del interior de las células eucariotas o procariotas (Garner, 2019).

Los principios eléctricos detrás de la tecnología PEF se basan en el concepto de campo eléctrico, introducido por Faraday, el cual explica la fuerza del campo eléctrico que actúa entre dos cargas. Cuando la carga positiva unitaria q ubicada en un cierto punto dentro del campo eléctrico se genera en el espacio de tratamiento (E_r), experimenta la fuerza F identificada por el vector de posición r . El campo eléctrico por unidad de carga se define como se muestra en la ecuación:

$$E_r = \frac{F_{qr}}{q}$$

La diferencia de potencial eléctrico (V) entre el voltaje en dos puntos, separados por un material no conductor, da como resultado la generación de un campo eléctrico entre estos puntos, con una intensidad eléctrica (E) directamente proporcional a la magnitud de la diferencia de potencial (V) e inversamente proporcional a la distancia (d) entre puntos, como se indica en la ecuación:

$$E = \frac{V}{d}$$

Los principales componentes lipídicos de las membranas naturales son los fosfolípidos que se organizan en una lámina de dos capas (una bicapa). La evidencia experimental sugiere que el efecto de un campo eléctrico externo aplicado a las células es producir poros acuosos específicamente en la bicapa lipídica. Por lo tanto, la información sobre la secuencia de eventos que describe el fenómeno de electroporación puede obtenerse a partir de mediciones de corrientes eléctricas a través de bicapas lipídicas planas junto con la caracterización del transporte molecular de moléculas dentro (o fuera) de células sometidas a pulsos de campo eléctrico. Se puede resumir de la siguiente manera: la aplicación de pulsos eléctricos induce reordenamientos de los componentes de la membrana (agua y lípidos) que finalmente conducen a la formación de poros hidrófilos acuosos. El modelo a continuación, fue

elaborado usando simulaciones de dinámica molecular (MD) usando un modelo de membrana lipídica con palmitoyl-oleyl- phosphatidylcholine (POPC); las esferas amarillas representan Na^+ y las cian al Cl^- , los cuales viajan a través de los poros hidrófilos formados que están revestidos con átomos de grupo de cabeza de fosfato lipídico (fucsia) y nitrógeno (azul). (Delemotte & Tarek, 2012).

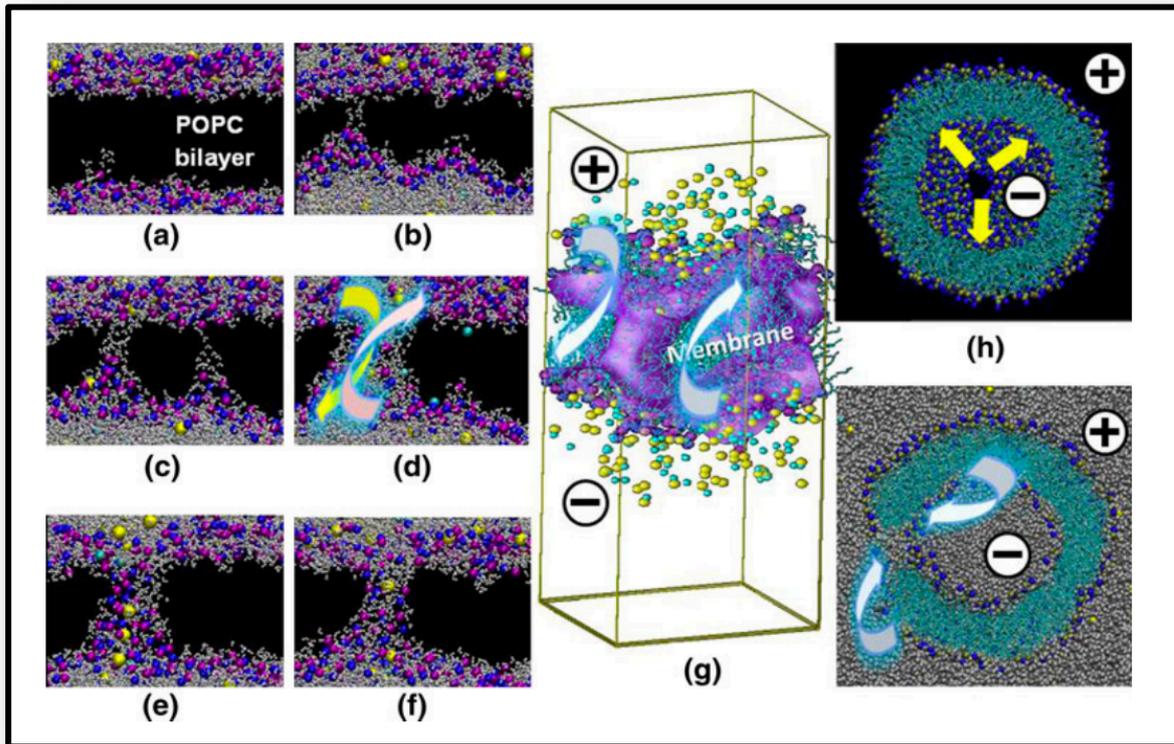


Fig. 17 Secuencia de eventos que siguen a la aplicación de un voltaje TM a una bicapa lipídica POPC utilizando el método de desequilibrio de carga. Delemotte L. & Tarek M. (2012).

“La cinética del transporte transmembrana mediada por electroporación se ha estudiado ampliamente, revelando que la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana aumentan hasta ser detectables en menos de un microsegundo después del inicio del pulso eléctrico, siempre que el TMV exceda cierto valor "crítico", las comillas se utilizan porque no es una constante universal sino una variable que depende de varios factores. Aún así, para comenzar con las observaciones generales, la cinética del transporte transmembrana determinada experimentalmente puede dividirse aproximadamente en cinco etapas, como se resume en la Tabla 1 el inicio del estado permeable, su expansión, estabilización con recuperación parcial, el resellado de la membrana, y finalmente el cese gradual de lo que se

conoce como efectos de memoria residual reflejados en los procesos fisiológicos alterados de las células y las reacciones a varios estresores” (Kotnik et al., 2019).

Tabla 1 Estadios de la permeabilización. Kotnik T. et. al. (2019)

Stage	Timescale
Initiation: Membrane electrical conductivity and permeability start increasing detectably when transmembrane voltage (TMV) exceeds a “critical” value.	Nanoseconds (conductivity) Microseconds (permeability)
Expansion: As long as TMV remains above the “critical” value, conductivity and permeability persist and/or intensify.	Until the end of the pulse (up to milliseconds)
Partial recovery: After TMV drops below the “critical” value, membrane conductivity and permeability decrease rapidly but not fully, stabilizing at a detectably increased level and still allowing transmembrane diffusion of ions and molecules.	Microseconds (conductivity) Milliseconds (permeability)
Resealing: The membrane gradually recovers its physiological level of impermeability (unless damage was irreversible and cell loses viability).	Seconds to minutes (~20–37°C) Hours (~4°C)
Memory: Even after full membrane resealing, the cell can exhibit alterations in its physiological processes and reactions to stressors before finally returning fully to its normal state.	Hours

1.8.2 ¿Cómo se generan los PEF?

Desde una perspectiva práctica, los PEF se aplican típicamente in vitro a una muestra líquida colocada entre dos electrodos, generando el campo eléctrico que induce el incremento del voltaje transmembrana y la posterior electroporación. Para aplicaciones in vivo, en particular la terapia contra el cáncer, se pueden usar múltiples electrodos, como agujas o rejillas de enclavamiento, y organizarlos adecuadamente para optimizar la uniformidad del campo en el tejido aplicado. En aplicaciones de alimentos, el líquido a menudo fluye a través de tuberías, y hay una región específica a través de la cual pasa el líquido que contiene los electrodos que aplican los PEF (Garner, 2019); dicha técnica es la misma que usamos en nuestro protocolo. Un esquema del proceso se muestra en la Fig.18.

El equipo de procesamiento para la aplicación de los tratamientos PEF se compone de un generador de pulsos eléctricos de alto voltaje, una cámara o cámaras de tratamiento, un sistema o sistemas de enfriamiento, dispositivos de medición de voltaje y corriente, una unidad

de control y un sistema de adquisición de datos. El generador consta de un transformador que transforma la corriente alterna de la red en corriente continua con la que se carga un banco de condensadores. La descarga del condensador en la cámara de tratamiento está regulada por un interruptor. Las cámaras de tratamiento constan de dos electrodos entre los que se ubica el producto a tratar (Maged & Ayman, 2012).

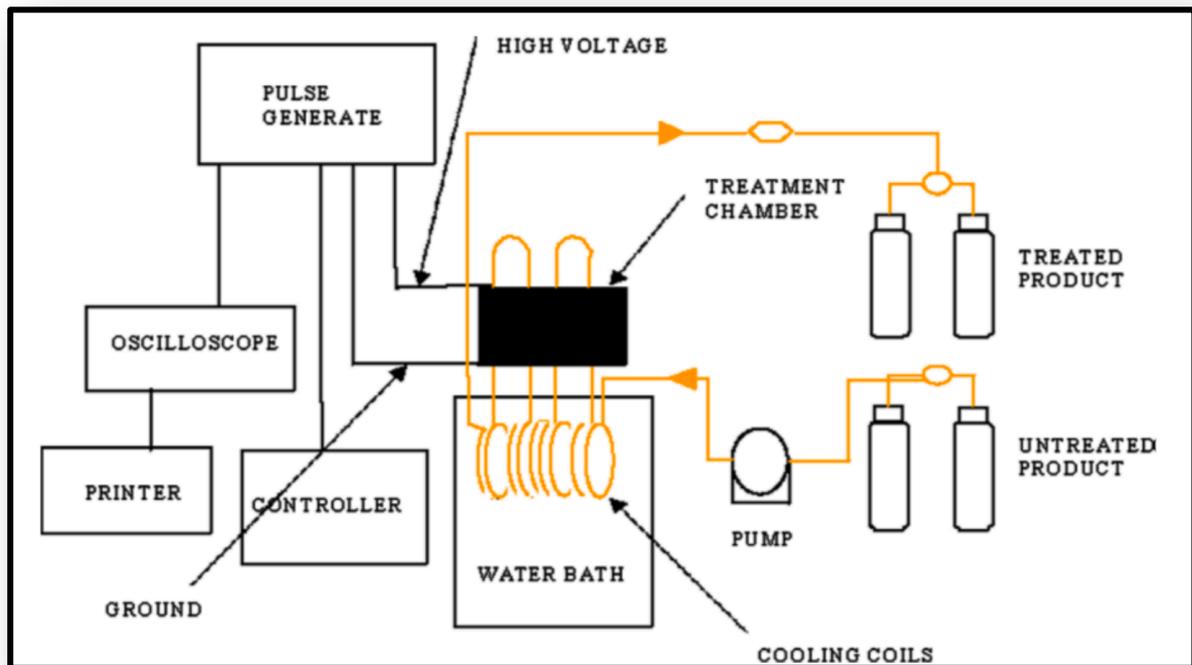


Fig. 18 Campos eléctricos pulsados para procesamiento tecnológico de comida. Capítulo 11. Maged M. & Ayman A. (2012).

El tipo de forma de onda de campo eléctrico aplicado es una de las características descriptivas importantes de un sistema de tratamiento de campo eléctrico pulsado. Las ondas exponenciales o cuadradas se encuentran entre las formas de onda más comunes utilizadas. La generación de forma de onda cuadrada generalmente requiere una red de formación de pulsos (PFN, del inglés pulse forming network) que consiste en una matriz de condensadores e inductores. Los equipos que aplican pulsos de onda cuadrada son más complejos que los que aplican pulsos de caída exponencial. Sin embargo, los pulsos de onda cuadrada son más eficaces y energéticamente más eficientes que los pulsos de caída exponencial, ya que los pulsos cuadrados tienen una mayor duración del pico de voltaje en comparación con los pulsos

exponenciales. El campo eléctrico debe distribuirse uniformemente en la cámara de tratamiento para lograr un tratamiento eficiente (Maged & Ayman, 2012).

Se ha demostrado que la temperatura de aplicación de PEF es un parámetro clave que afecta la electroporación de la membrana celular. Varios estudios han demostrado que el aumento de la temperatura disminuye el campo eléctrico crítico requerido para causar electroporación en las células eucariotas y procariotas y mejora los efectos derivados del tratamiento con PEF, como la inactivación microbiana o la mejora de la extracción de compuestos intracelulares (Martínez et al., 2017).

1.8.3 Efectos de los PEF sobre las células microbianas

La susceptibilidad de un microorganismo a la inactivación mediante PEF está altamente relacionada con los parámetros intrínsecos del microorganismo, como el tamaño, la forma, la especie o el estado de crecimiento. En general, debido a la estructura de las envolturas celulares, las bacterias grampositivas son más resistentes al PEF que las bacterias gramnegativas, mientras que las levaduras muestran una mayor sensibilidad que las bacterias. La inducción de campos eléctricos en las membranas celulares es mayor cuando las células más grandes están expuestas al tratamiento de PEF. Al igual que los parámetros intrínsecos de los microorganismos, el medio donde se desarrollan los microorganismos, tienen sus propios factores intrínsecos, como conductividad, resistividad, propiedades dieléctricas, fuerza iónica, pH y composición que influyen en la eficacia del tratamiento de PEF (Maged & Ayman, 2012).

Hay antecedentes de ensayos exitosos de uso de PEF en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, sistema de expresión que se optimizó para la producción de β -galactosidasa usando un protocolo de 5.4kV/cm y 1.25ms de duración del pulso. Este estudio reporta la importancia de la selección adecuada de un medio acuoso con baja conductancia como el agua desionizada y la combinación adecuada de factores como la concentración celular, la intensidad de campo, el número y la duración de los pulsos para conservar la actividad enzimática. El aumento de la concentración celular se asocia con una disminución de la eficiencia del tratamiento eléctrico. Este efecto observado para concentraciones superiores a

10^6 células / ml para células de mamíferos se explicó por la perturbación local del campo eléctrico causado por las células vecinas. No se observó un cambio en la eficiencia de la electroextracción, al menos hasta una concentración celular de 2.2×10^9 células / ml, pero el aumento de la concentración celular se asoció con una reducción de la intensidad de campo óptima. Concluyeron que la concentración celular es un parámetro importante que determina la eficiencia de la electroextracción. (Ganeva et al., 2015).

1.9 Estabilidad de las proteínas

Los avances biotecnológicos que se han desarrollado a lo largo de los años para producir proteínas recombinantes han venido acompañados de la necesidad de complementar estas moléculas con otras que den estabilidad y permitan optimizar su conservación, de modo que se pueda predecir su farmacocinética y farmacodinámica en ensayos *in vivo* y en ensayos clínicos. La estabilidad de una proteína se ve influida principalmente por el estrés, asociado a la concentración, la temperatura, pH y la fuerza iónica. Estos factores pueden llevar a la desnaturalización de las proteínas al afectar las interacción de los puentes de H y conducir a la formación de agregados que se acompañan de un incremento de viscosidad, solidificación y separación en fases; todo eso da como resultado la disminución de la calidad y puede asociarse a toxicidad en los seres humanos (Kumar et al., 2019).

Los principios que rigen la estabilidad de las proteínas, basados en los descubrimientos de Anfinsen sobre la ribonucleasa A, demostraron que las proteínas se pueden plegar sin asistencia de otros componentes celulares, lo que no contradice el papel de chaperonas, chaperoninas y otras proteínas auxiliares, y que su plegamiento y desplegamiento son reversibles en las condiciones experimentales adecuadas. Se ha demostrado que participan dos estados en el equilibrio de plegamiento de muchas proteínas, el estado nativo (correctamente plegado) y el estado desplegado (formas desordenadas). El estado nativo consiste en una única conformación (o un grupo pequeño de conformaciones muy próximas), mientras que el estado desplegado consiste en un número enorme de conformaciones diferentes en equilibrio rápido (Sánchez-Ruiz & Sancho, 2003).

La estabilidad conformacional de cada proteína está determinada por un balance extraordinariamente delicado de diversas interacciones de magnitud considerable que se oponen entre sí dando lugar a valores de estabilidad conformacional pequeños. A los factores puramente energéticos (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals...) se van a oponer a factores entrópicos; la formación de las interacciones que se observan en el estado nativo sólo es posible a expensas de destruir interacciones de naturaleza y magnitud comparable que se manifiestan en el estado desplegado y las interacciones entre las proteínas y solventes como el agua influyen decisivamente en la estabilidad de las proteínas (Sánchez-Ruiz & Sancho, 2003).

Sobre la relación entre la resistencia térmica y las interacciones que estabilizan una estructura proteica se han reportado algunas diferencias en términos de composición de aminoácidos o disposición espacial de los residuos, pero una de las diferencias más notables involucra los puentes salinos: las proteínas hipertermoestables tienen interacciones electrostáticas más fuertes que sus contrapartes mesoestables. Se ha reportado que distintos puentes salinos pueden verse afectados de manera diferente por la temperatura y esto podría influir en la geometría de estas interacciones, así como en la compacidad de la proteína a la resistencia térmica al menos en cierta medida. También se ha observado un menor número de cavidades y un contacto relativo promedio más alto (una medida de la proximidad de aminoácidos no adyacentes dentro de una proteína plegada) al comparar proteínas termoestables con sus parálogos mesoestables y ortólogos. Cabe destacar que el efecto hidrofóbico y la hidrofobicidad de los residuos parecen jugar aún un papel marginal en la estabilización de proteínas, aunque se consideran las principales fuerzas que impulsan el plegamiento de proteínas (Miotto et al., 2019).

Para que toda proteína resista el estrés térmico, la evolución dio paso a interacciones residuo-residuo energética y estructuralmente óptimas. Estudiar la termoestabilidad es fundamental por varias razones que van desde los aspectos teóricos a los aplicativos, como obtener información sobre los principios físicos y químicos que rigen el plegamiento de proteínas y mejorar los procesos biofarmacéuticos y biotecnológicos. Una caracterización completa de las propiedades térmicas de una proteína viene dada por el conocimiento de dos contribuciones: (i) la estabilidad termodinámica, definida como la diferencia en la energía libre entre los estados plegado y desplegado (ΔG) y (ii) resistencia térmica, descrita por la temperatura de fusión (T_m) (Miotto et al., 2019).

La estabilidad de la proteína puede determinarse experimentalmente in vitro manipulando las condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura) para promover la desnaturalización de la proteína. La reacción de despliegue puede ser seguida por diferentes técnicas y el punto medio de la transición de despliegue será característico de un sistema específico. Para el despliegue térmico, se puede determinar una T_m , que corresponde al punto medio de la curva de despliegue y evaluar el efecto de una condición dada sobre la estabilización de proteínas mediante un efecto sobre el valor T_m . Por lo tanto, un compuesto estabilizador o formulación de tampón dará como resultado un aumento en la temperatura de desnaturalización y el cambio térmico resultante (ΔT_m) es una medida relativa de estabilización de proteínas en las condiciones probadas (Miotto et al., 2019).

En el citoplasma de los organismos termófilos aparecen concentraciones elevadas de solutos compatibles que contribuyen a la termoestabilidad de las enzimas, ácidos nucleicos y moléculas biológicas lábiles como el ATP . Estos solutos están, generalmente, cargados negativamente y la mayoría están incluidos en 2 categorías: unos son derivados de hexosas con el grupo hidroxilo del C1 comúnmente bloqueado en una configuración α , y otros son polifosfodiésteres (Lamosa et al., 2006). Además, se ha demostrado que algunos solutos tales como el manosilglicerato, el di-glico-fosfato y sus derivados estabilizan y preservan biomateriales (Patent No. PT103442A, 2007). La estabilización de proteínas por moléculas pequeñas puede mejorar significativamente la expresión y purificación de proteínas , la calidad de las proteínas purificadas, el proceso de cristalización, o tener una aplicación terapéutica potencial para recuperar y mantener la estructura y función de las proteínas. Las moléculas pequeñas con el potencial de rescatar las proteínas mal plegadas estimulando su plegamiento correcto, estabilizando las conformaciones nativas y / o el tráfico correcto y la función in vivo, se conocen como chaperonas farmacológicas o químicas, respectivamente si el ligando se une directamente a la proteína o no (Lucas et al., 2019).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Nuestros experimentos anteriores habían demostrado la capacidad de la granulicina recombinante en modelos de desarrollo de tumores humanos xenotransplantados en ratones atímicos (Al-Wasaby et al., 2015). Este tratamiento exigía que la granulicina se inyectara de forma intratumoral. Con el objetivo de acercarnos a una aplicación clínica con más posibilidades, decidimos dirigir la granulicina hacia los tumores haciendo uso de la ingeniería molecular de anticuerpos, permitiendo así una inyección sistémica del tratamiento. Como prueba de concepto, en colaboración con la Dra. Laura Sanz, del Hospital Puerta del Hierro de Madrid, generamos una inmunotoxina quimérica combinando la granulicina con el fragmento de anticuerpo scFv dirigido contra el antígeno tumoral CEA, llamado MFE23. Demostramos que esta inmunotoxina era activa contra tumores que expresaban CEA, tanto si el tratamiento se inyectaba intratumoralmente como si se inyectaba de forma sistémica, mientras que la granulicina sólo era activa si se inyectaba de forma intratumoral (Ibáñez-Pérez et al., 2019). Sin embargo, al estar la expresión de CEA limitada a tumores de colon o gástricos, la aplicación de esta inmunotoxina estaría limitada a ese tipo concreto de tumores.

Es por ello, y en colaboración con el Dr. Ramón Hurtado, investigador del BIFI (Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos) de la Universidad de Zaragoza experto en mecanismos de glicosilación de proteínas y en el antígeno Tn, enfocamos el presente estudio basado en el desarrollo de inmunotoxinas dirigidas contra este antígeno usando los scFv de los anticuerpos SM3 y AR20.5, como se ha descrito en la Introducción. Las proteínas recombinantes de fusión fueron diseñadas por el Dr. Hurtado y se escogió la levadura *P. pastoris* como sistema de expresión.

Además, debido al bajo rendimiento de producción de las inmunotoxinas a partir del sobrenadante de *P. pastoris*, buscamos mejoras biotecnológicas para optimizara este proceso.

Para abordar este objetivo, colaboramos con el grupo de investigación con del Dr. Javier Raso del Centro de Biotecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria, y se utilizó la técnica de campos eléctricos pulsados o PEF, de sus siglas en inglés (Pulsed Electric Field). Hay pocas publicaciones sobre la producción de proteínas recombinantes en levaduras usando esta técnica, y ninguna con aplicación en el tratamiento del cáncer, por lo que el uso de esta técnica es innovador.

En el presente trabajo nos propusimos:

- 1) Optimizar un protocolo de producción de las inmunotoxinas anti-Tn conjugadas con GRNLY.
- 2) Determinar la estabilidad de las inmunotoxinas y optimizar el uso de lio/criopreservantes.
- 3) Establecer la capacidad de las inmunotoxinas anti-Tn para reconocer a su antígeno.
- 4) Determinar la capacidad antitumoral de las inmunotoxinas anti-Tn en líneas celulares tumorales.
- 5) Estudiar el mecanismo de acción de las inmunotoxinas en líneas tumorales de cáncer que expresan el antígeno.
- 6) Estudiar la direccionalidad de la molécula a través de ensayos *in vivo* mediante administración sistémica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

3.2 Líneas celulares

En este trabajo se emplearon las siguientes líneas celulares:

1. Jurkat, línea celular de Leucemia Linfoblástica Aguda de células T, clon E6-1; H929, línea celular de Mieloma Múltiple; MDA-MB-231, línea celular de adenocarcinoma de mama; MCF-7, línea celular metastásica de adenocarcinoma de mama; Capan-2, línea celular de carcinoma pancreático; Mia PaCa-2 y PANC-2, líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas; HT-29, línea de adenocarcinoma de colon. Todas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, USA).

a. Mia Paca-2 deficientes en BAX/BAK, con sus respectivos controles con el plásmido vacío, fueron amablemente cedidas por Alfonso Serrano, doctorando de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza UNIZAR.

b. JURKAT deficientes en BAX/BAK, fueron elaboradas por la Dra. Adriana Aporta.

Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células se incubaron en un incubador termostatzado a 37°C en aire húmedo y con 5% de CO₂. Los frascos de cultivo con tapón de filtro, las pipetas y todo material para el efecto se usó en condiciones de esterilidad en las campanas de flujo laminar del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UNIZAR.

Las células Jurkat y H929 fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomicina y GlutaMAX 2mM. El cultivo se mantuvo con una densidad de hasta un millón de células por ml; lo que corresponde a un pase cada 3 ó 4 días.

El resto de líneas celulares fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomicina y GlutaMAX 2mM. Para los pases se tomó en cuenta las recomendaciones de la ATCC sobre la concentración de las células en el medio, esto es aproximadamente un millón de células por ml previa tripsinización y los ratios de los subcultivos dependiendo de cada tipo celular, así las CAPAN-2 requirieron ratios de 1:2 a 1:4, las Mia PaCa-2 ratios de 1:3 a 1:8. Se usó estas consideraciones para expandir las células para los ensayos in vivo.

Así mismo, según recomendaciones de la ATCC, la criopreservación de las líneas celulares se hizo en SFB 95% y dimetilsulfóxido (DMSO) 5% a una densidad celular de 5×10^6 /ml. En primera instancia se congeló durante 24 a 48 horas en un congelador a -86°C y luego se trasladó a un contenedor de nitrógeno líquido.

Para el proceso de descongelación de las células se procedió a realizar un lavado con 10 ml de medio de cultivo y posteriormente sembrar las células a una densidad doble de la que se empleó para los pases.

Contaje y viabilidad celular

La determinación de viabilidad celular se hizo mediante una solución al 0,4% de azul de tripán en 0,15M de NaCl (Sigma, Madrid). Este colorante es capaz de ingresar al citoplasma de las células con pérdida de integridad de la membrana celular. Luego de mezclar el colorante con la suspensión de células (50ul de cada uno), se procedió al contaje en una cámara de Neubauer (hemocitómetro) en un microscopio (Optiphot, Nikon). La fórmula usada para calcular la densidad celular es la siguiente:

$$N^{\circ} \text{ células viables/ml} = \frac{\text{Total de células viables en los 4 cuadrantes} \times 10000}{2}$$

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se utilizó esta fórmula:

$$\% \text{viabilidad celular} = \frac{N^{\circ} \text{ células viables}}{N^{\circ} \text{ células viables} + N^{\circ} \text{ células muertas}}$$

De esta forma se controló que los cultivos mantuvieran una viabilidad superior al 90%.

3.3 Clonaje de las Inmunotoxinas anti Tn

Material Genético de inicio

Para este trabajo se usó el plásmido integrativo pPICZ α . Las características de este constructo son las siguientes:

- *pUC ori*: permite la replicación del plásmido en *E. coli*.
- Promotor *AOX1*: se induce por metanol y dirige la integración del plásmido en el locus *AOX1* de *Pichia* mediante recombinación homóloga.
- Factor α : permite la secreción eficiente de proteínas
- Sitio de clonaje múltiple: permite la inserción de ADN en el vector de expresión
- Epítipo *c-myc*: permite la detección con anticuerpo anti-*myc*
- Terminador de la transcripción *AOX1*: incrementa la estabilidad del mRNA permitiendo un eficiente procesamiento del extremo 3' del mRNA, incluyendo poliadenilación
- Gen de resistencia a zeocina (antibiótico de amplio espectro): sirve como marcador de selección. Se encuentra precedido por los promotores *TEF1* y *EM7* y seguido del terminador de la transcripción *CYC1*

El *cDNA* de la granulicina humana y de las inmunotoxinas se integran direccionalmente entre los sitios de corte de enzimas de restricción *Cla I* y *Xba I* que se encuentran en el sitio de clonaje múltiple de pPICZ α -C y pPICZ α -A, respectivamente dentro del marco de lectura. Ver Fig. 19.

El plásmido pPICZ α -C-GRNLY fue sintetizado por la Dra. Laura Sanz (Hospital Puerta de Hierro, Madrid) a partir de la secuencia de DNA de GRNLY humana cedida a nuestro grupo por el Dr. Alan Krensky (Northwestern University, Chicago). Respecto a los plásmidos pPICZ α -A-SM3GRNLY y pPICZ α -A-AR20.5GRNLY; fueron diseñados por el Dr. Ramón Hurtado

(Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos BIFI de la Universidad de Zaragoza).

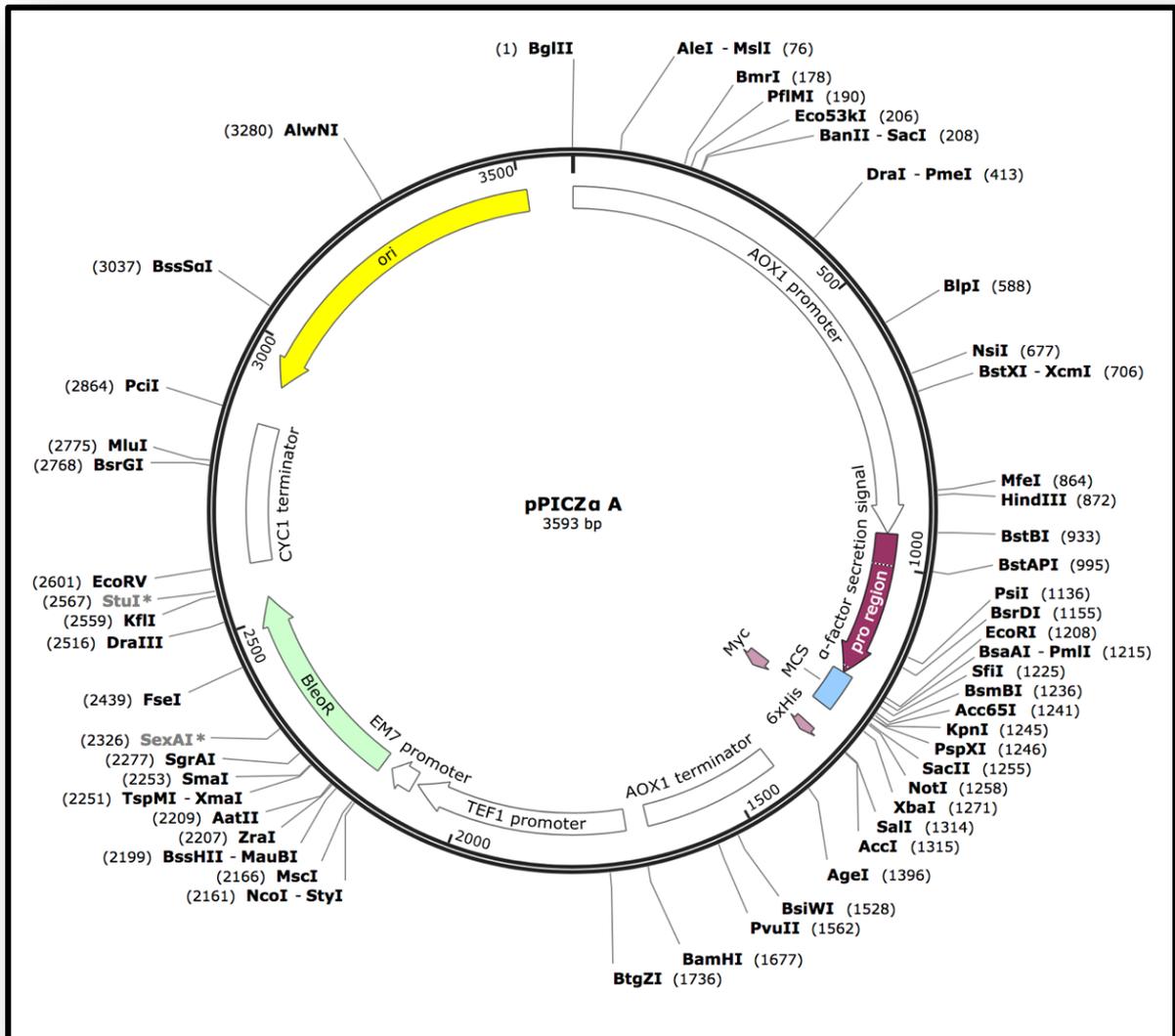


Fig. 19 Esquema de la estructura del vector pPICZ α A Recuperado de [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pPICZ\(alpha\)_A&format=png](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pPICZ(alpha)_A&format=png)

Preparación de células competentes

E. coli DH5 α se hizo “competente” para transformación mediante la apertura de los poros en la membrana con CaCl₂ a baja temperatura. El procedimiento consistió en sembrar *E. coli DH5 α* en un tubo de 50 ml con 10 ml de medio LB líquido en agitación (180rpm) a 37°C

toda la noche. De ese producto se usó 200 µl para diluir en 20 ml de medio LB fresco y repetir la incubación hasta alcanzar una absorbancia de aproximadamente 0.3-0.4 OD a 600 nm, que equivale a una concentración de $5-10 \times 10^7$ bacterias/ml. Seguidamente, se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó 8 minutos a 4°C y 8000xg. Se lavó una vez con agua estéril, se incubaron en 10 ml de CaCl₂ 50 mM frío por 15 minutos y se volvió a centrifugar 8 minutos a 3000xg. Finalmente, se resuspendió el decantado en 4 ml de una solución de CaCl₂ 50mM con 15% de glicerol y se congeló a -80°C hasta su utilización.

Transformación bacteriana y expansión

En el caso de *pPICZα-C-GRNLY* el procedimiento de transformación bacteriana hasta la transfección en *P.pastoris* fue realizado por Raquel Ibáñez Pérez, quien amablemente nos cedió las levaduras .

La transformación de *E. coli DH5α* competentes con *pPICZα-C-Ar20.5-GRNLY* o *pPICZα-C-SM3-GRNLY* se hizo por choque térmico. Se descongelaron dos alícuotas de aproximadamente 200 µl incubándolas en hielo y en cada una se añadieron bajo llama 50 ng de ADN plasmídico y tras 20 minutos, se introdujeron en un baño a 42°C durante un minuto y medio más dos minutos en hielo nuevamente. Se añadió 1 ml de medio líquido LB en cada alícuota y se incubó a 37°C con agitación 200 rpm durante dos horas. A continuación, se sembraron las bacterias transformadas en medio LB sólido (1,5%) con zeocina (25 µg/ml) a 37°C toda la noche, de forma que crecieron las bacterias que incorporaron el plásmido. De las colonias que se desarrollaron, se seleccionó al azar cuatro para cada proteína, se cultivaron por separado en tubos de 50 ml con 10 ml de medio líquido LB y 25ug/ml de zeocina en agitación a 180rpm a 37°C toda la noche.

Selección de las bacterias con mayor nivel de expresión

Se aisló el plásmido mediante mini preparación con el kit “Nucleospin® Plasmid Easypure”. Para comprobar si se aislaron los plásmidos con el peso molecular adecuado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, compuesto por 0,3 g de agarosa (Scharlau), 30 ml de tampón TAE 1x (tampón de Tris-Acetato de EDTA, pH 8,3 Invitrogen) y para teñir el DNA, 3 µl de SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización de los geles se realizó en un Gel Doc

2000 transiluminador (BioRad). Para expandir los plásmidos en mayor cantidad, se cultivaron las colonias transformadas de *E. Coli* en medio LB con zeocina (25 µg/ml) utilizando el kit “Quantum Prep™ Plasmid Midiprep“. En ambos casos, mediante un aparato NanoDrop® (NanoVue) se determinó la concentración y pureza de los plásmidos obtenidos.

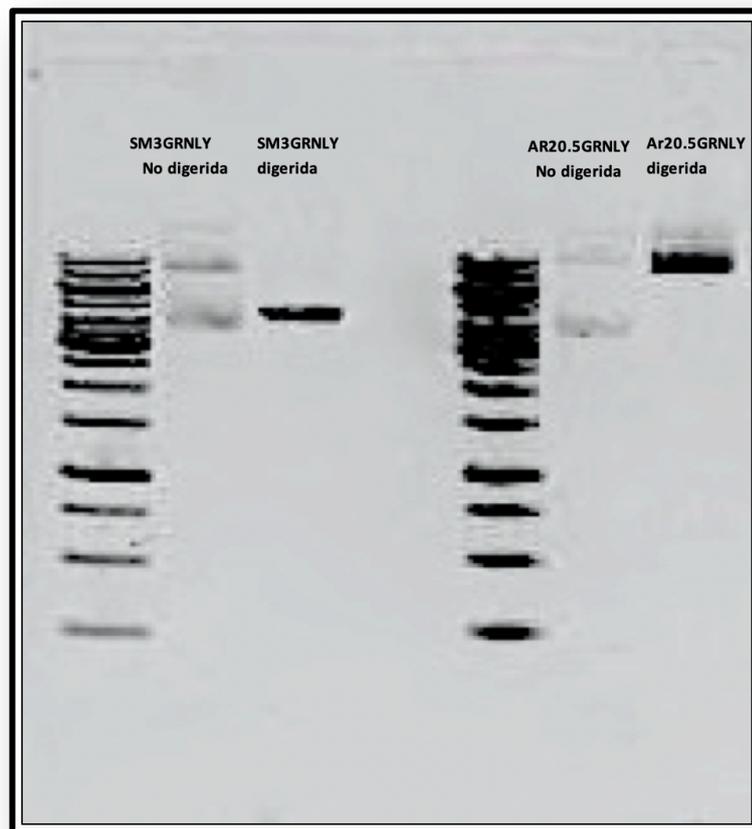


Fig. 20 Gel de agarosa de plásmidos de inmunotoxinas anti-Tn en *E. coli*. Se aisló el plásmido mediante mini preparación con el kit “Nucleospin Plasmid Easypure“. Los plásmidos se linealizaron con la enzima *SmaI* y se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Transfección de *P.pastoris* mediante electroporación

Se linealizó los plásmidos con la enzima *SmaI*, la cual tiene un sitio de corte único dentro de *pPICZα-A*. Seguidamente, para comprobar que el plásmido se digirió correctamente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, ver Fig.21. Posteriormente, se realizó la limpieza de restos de la digestión (sales y gel de agarosa residual) y se purificó el plásmido utilizando el kit AccuPrep® Gel Purification (Thermofisher).

La cepa de *P.pastoris* usada inicialmente en el protocolo de producción de SM3GRNLY y AR20.5GRNLY inicialmente usada fue *Smd1168* (*Mut+*). Sin embargo, la transformación no fue exitosa y debimos usar *X-33* (*Mut+*).

Previo a la electroporación, se realizó, bajo llama, un procedimiento para hacer competentes a las levaduras *P.pastoris* : primero, se incubó en hielo con una solución de 100 mM LiAc; 10 mM DTT; 0,6 M sorbitol y 10 mM Tris-HCl a pH 7.5 durante 30 minutos, luego se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante; después, con otra solución de sorbitol 1 M se hicieron 3 lavados. Para electroporar se mezcló 20ul de plásmido digerido con 80ul de levadura en una celda (Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.2cm gap) que se introdujo en la cámara del electroporador MicroPulser™ de BIORAD, en el programa Fungi, protocolo "P.pic." Las levaduras transfectadas se plaquearon en YPDS (10 g/L de extracto de levadura; 20 g/L de peptona; 2% dextrosa; 182,2 g/L de sorbitol, pH 6) con zeocina (200 µg/ml) incubándolas 3-10 días a 30°C hasta que aparecieron colonias. A modo de control, se plaquearon las células de *P.pastoris* electroporadas en ausencia y presencia del plásmido linealizado en medio con zeocina. Las células sin el plásmido no crecieron en placas con zeocina, confirmando que el proceso de electroporación fue correcto. Finalmente, de las levaduras electroporadas, se eligieron algunas colonias sembradas en agar YPD + zeocina y se replaquearon usando el mismo medio para, más adelante, elegir la cepa más eficiente mediante producción a pequeña escala (2ml/tubo) y electroforesis en gel de acrilamida e Inmunoblot (ver Figura 21).

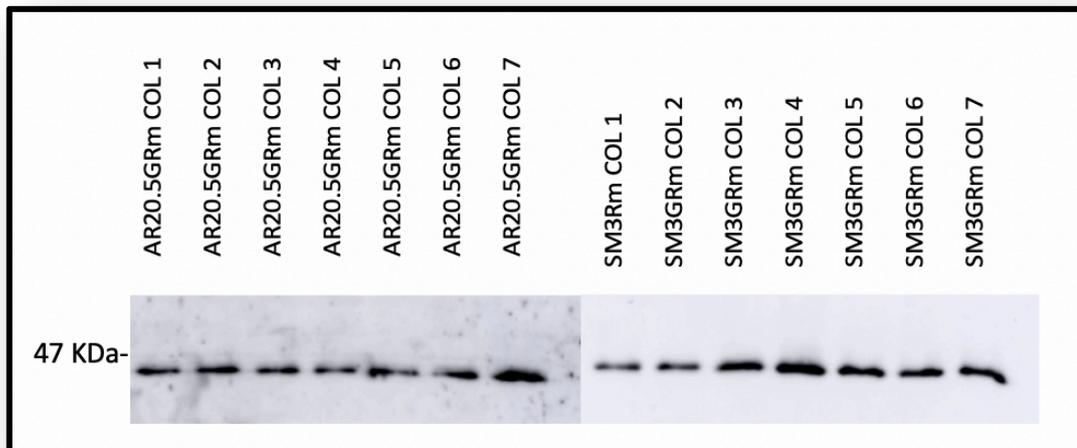


Fig. 21 Inmunoblot de la expresión de inmunotoxinas en *P.pastoris*. Se crecieron en tubos de 50 ml las levaduras por 24 horas con medio BMGY y después por 48 horas con medio BMMY, el sobrenadante se usó para hacer un gel SDS-PAGE al 15% y luego una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. El revelado se hizo mediante un anticuerpo primario mouse anti-HIS tag(Genscript) y un anticuerpo secundario anti-mouse-PO.

3.4 Cultivo de *P.pastoris*

Una vez escogidas las colonias que más proteína recombinante produjeron, se probaron diferentes pH para establecer el tampón más adecuado para los cultivos. Se estableció que el pH 6.5 es el óptimo tanto para la expresión de SM3GRNLY como para AR20.5GRNLY.

3.4.1 Protocolo inicial

Se hizo un precultivo de las levaduras seleccionadas en placas Petri con medio YPD agar (Formedium CCMO110)-zeocina (200ug/ml) a 4°C, de donde se tomaron unas pocas colonias para que crezcan en placa con el mismo medio en un lapso de 24 horas, seguidamente se recogió el mayor número de células con asa estéril y se inocularon en un matraz de 2000ml con medio BMGY (10 g/L de extracto de levadura; 20 g/L de peptona; 100 mM tampón fosfato pH6; 13,4 g/L base de levadura nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio;

1 ml/L glicerol y 0,4 mg/L de biotina) en un volumen de 250 ml/matraz a 30 °C, en agitación a 250 rpm durante un día para que crezca la levadura. Después se realizó un cambio de medio a BMMY (10 g/L de extracto de levadura; 20 g/L de peptona; 100 mM tampón fosfato pH6; 13,4 g/L base de levadura nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio; 0,5 ml/L metanol y 0,4 mg/L de biotina), manteniendo el cultivo a 18 °C en agitación durante tres días para inducir la expresión de la proteína recombinante. A partir del segundo día, cada 24 horas, se añadió metanol a una concentración final de 1% en el medio.

3.4.2 Protocolo optimizado

Se introdujo un formato de control de procesos, el mismo que se adjunta en ANEXO 1. El uso de este formato nos permitió comparar las diferentes producciones para establecer qué fases debían corregirse. En lugar de almacenar levaduras transfectadas en placas Petri, se hicieron con glicerol puro a -80°C. A partir de esas cepas se usó un vial para sembrar 50 ml de medio YPD broth (Yeast extract, Peptona, Dextrosa/FORMEDIUM CCM0210) en un matraz de 250 ml - a 30°C en agitación a 250 rpm durante 24 horas hasta alcanzar una OD₆₀₀ de al menos 1 (1 OD₆₀₀ = 3 × 10⁷). Tradicionalmente se cree que a mayor biomasa al inicio de la inducción se corresponde con mayores rendimientos en la producción de proteínas heterólogas en menor tiempo. En un estudio realizado por Holmes y colaboradores en el 2009 observaron que el aumento en la biomasa celular, al inicio de la inducción, incrementó los niveles de producción de proteína verde fluorescente de 140 mg a 450 mg, y argumentan que este comportamiento se debe a que la acumulación del metanol en el medio de cultivo durante la inducción no alcanzó niveles tóxicos para las células (Lopes et al., 2014). En nuestro caso los niveles más altos registrados fueron de 10⁹ células por ml. Se introdujo control microbiológico mediante microscopía y se duplicó el volumen de producción con buenos resultados. Luego de centrifugar se eliminó el sobrenadante y se cambió por medio BMMY, para inducir la expresión de las proteínas. Además, se incrementó en 50% la administración de metanol durante la fase de expresión.

Si se obtenían células de características adecuadas, es decir sin contaminación y a concentraciones de 1 × 10⁷-10⁸, se procedía a tomar un volumen suficiente para alcanzar una concentración no menor de 1 × 10⁶ y continuar la fase de crecimiento en medio BMGY, el cual

tiene como fuente de carbono no fermentable el glicerol y 24 horas después cambiar el medio a BMMY, el cual tiene como fuente de carbono el metanol, que además cumple las funciones de inductor de la expresión de las inmunotoxinas. En primera instancia se usó BMMY a 0,5% (v/v) de metanol para que las levaduras toleren el mismo y luego incrementar el porcentaje para inducir más expresión (Invitrogen, 2014). Cabe destacar que introdujimos casaminoácidos a nuestro medio de cultivo en base a publicaciones que reportan incremento de la producción (Kaushik et al., 2016), pero no conseguimos mejorar el rendimiento.

3.5 Electroporación por Campo Eléctrico Pulsado

Para aumentar todavía más la producción de proteínas recombinantes, se usó la técnica de electroporación campo eléctrico pulsado o PEF, de sus siglas en inglés Pulsed Electric Field. Para ello, el precipitado de levaduras que fueron centrifugadas para separar del sobrenadante se llevó al Centro de Investigación y Biotecnología de los Alimentos (CITA) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, donde Diéderich Aguilar y Carlota Delso, del equipo del Dr. Javier Raso, aplicaron dicha técnica.

El equipo PEF utilizado en esta investigación fue el modelo comercial EPULSUS®-PM1-10 (Energy Pulse System, Lisboa, Portugal). Se resuspendieron las células de *P. pastoris* en tampón McIlvaine (pH 7,0 y 1,50 mS / cm) a una concentración de alrededor de 10^8 células / mL y se trataron con PEF en flujo continuo (5,0 l / h) en una cámara de electrodos paralelos de 3,0 cm de largo, 0,50 cm de ancho y un espacio de 0,40 cm. El tiempo de residencia medio calculado en la cámara de tratamiento fue de 0,40 segundos. Se utilizó un intercambiador de calor consistente en un serpentín sumergido en un lote termostático para fijar la temperatura inicial de la levadura antes del tratamiento a 10 ° C. La temperatura de la suspensión de levadura después de la cámara de tratamiento con PEF nunca superó los 30 ° C. Ver Fig. 22.

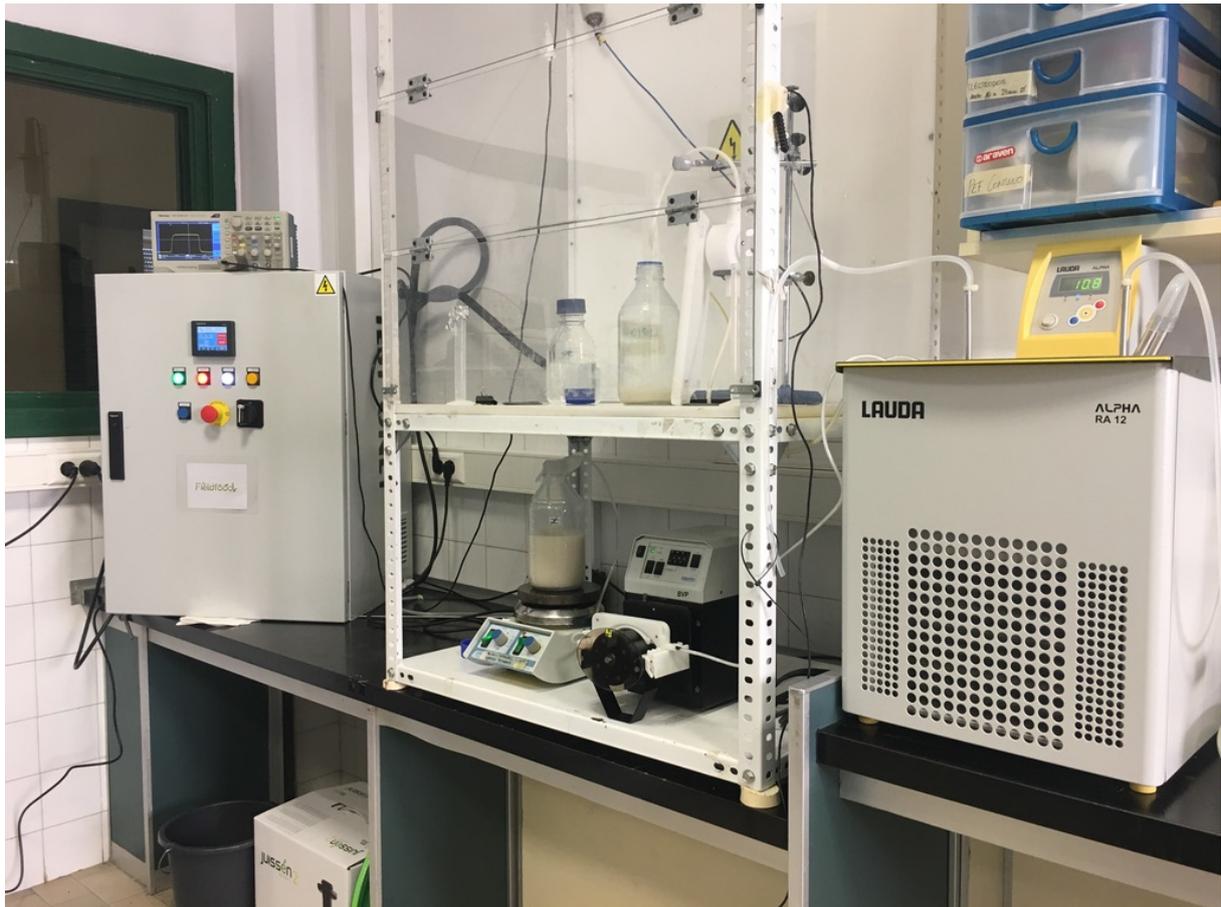


Fig. 22 Equipo de PEF, Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA. A la izquierda se encuentra la fuente de poder EPULSUS®-PM1-10 (Energy Pulse System, Lisboa, Portugal). La suspensión de levaduras se impulsa a partir de la botella inferior por una manguera mediante la bomba peristáltica (parte inferior) y pasa a la cámara de enfriamiento, luego ingresa a la cámara de electrodos que está arriba y las levaduras electroporadas se recolectan en la botella de la parte superior.

Las células de *P. pastoris* se trataron con PEF a una intensidad de campos eléctricos entre 8 y 20 kV / cm durante tiempos de tratamiento entre 15 y 180 μ s. Después de los tratamientos, se vertieron diluciones decimales seriadas en placa en papa-dextrosa-agar para analizar la inactivación de las células de *P. pastoris*. El número de células viables se expresó en unidades formadoras de colonias (UFC), correspondiente al número de colonias contadas después de 48 h de incubación a 25 ° C. Los datos de inactivación se expresaron como la relación entre el número inicial de supervivientes (N_0) y el número de supervivientes después de diferentes tiempos de tratamiento (N_t).

Se controló la liberación de proteína de células de *P. pastoris* no tratadas y tratadas con PEF (12, 16 y 20 kV / cm para 15 a 180 μ s) después de 180 minutos de incubación a 20 °C en una solución tampón Mcllvaine (0,2M Na₂HPO₄ y 0,1M Ácido cítrico) de pH 7 y 1 mS / cm de conductividad. El análisis cuantitativo de las proteínas liberadas se llevó a cabo mediante el procedimiento de microplaca del kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL 61105 EE.UU.).

La optimización de el protocolo descrito se puede ver a continuación, en la Fig. 23.

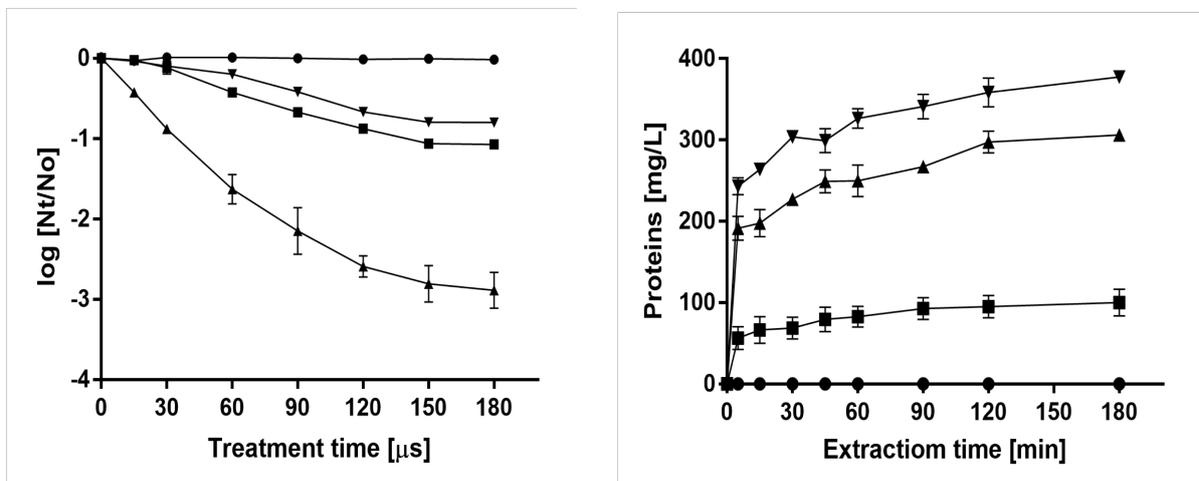


Fig. 23 Optimización del tratamiento PEF en *P.pastoris*. Panel izquierdo: Inactivación de *P. pastoris* por tratamiento con PEF con diferentes intensidades de campo eléctrico. Tratamiento de 8 kV/cm (●), 12kV/cm (▼), 16 kV / cm (■), 20 kV / cm (▲). Panel derecho: efecto de diferentes intensidades de campo eléctrico en la extracción de proteínas intracelulares. Tratamiento de 12 kV / cm (■), 16 kV / cm (▲), 20 kV / cm (▼) y control (●).

3.6 Purificación de proteínas recombinantes

3.6.1 Protocolo inicial

Concentración del sobrenadante y Diálisis

Se centrifugó el cultivo a 9600rpm a 4°C por 5 minutos y luego por 25 minutos más, la primera fase para separar las células más grandes y la segunda para decantar los sólidos

de menor tamaño. El sobrenadante de las levaduras se filtró mediante un sistema de filtración por vacío primero con un filtro de 0,45 μm y luego con un filtro de 0,22 μm . Seguidamente, se concentró la granulisina en un concentrador Pellicon XL Ultracel 5 kDa 50 cm^2 (Millipore) y las inmunotoxinas con un concentrador Pellicon XL Ultracel 30 kDa 50 cm^2 (Millipore). Se redujo 1 l hasta aproximadamente 100 ml. Este sistema de concentración necesitó una bomba peristáltica que ajustó la velocidad de concentrado en este caso a 48 ml/min. Desde el vaso de la alimentación, el sobrenadante pasó a la membrana de filtración (Pellicon XL), donde la solución sin proteína se acumuló en el vaso del permeado y la proteína pasó de nuevo hacia el vaso de alimentación hasta alcanzar el volumen deseado tal como se puede ver en la Figura 24.

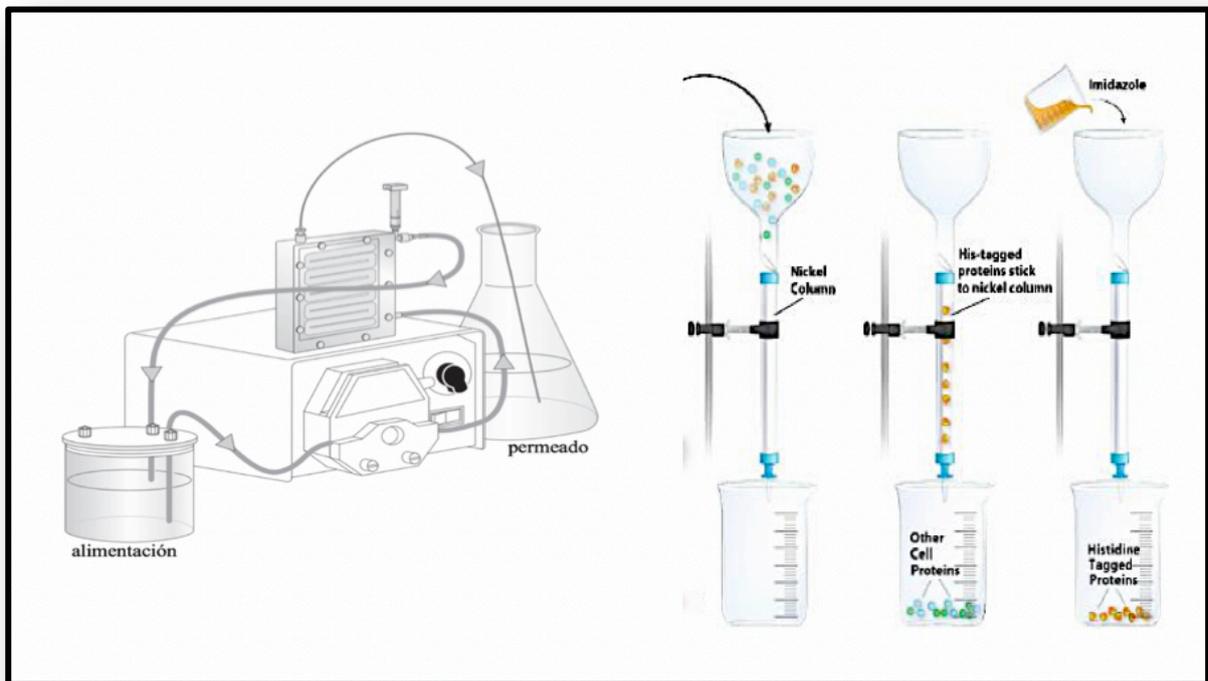


Fig. 24 Fases de concentración y Elución. Izquierda: Equipamiento para concentración del sobrenadante de *P.pastoris* (tomado de VIVAFLOW 50/50R/200) antes de la fase de elución. En el frasco de alimentación se vierte el sobrenadante sin concentrar y el flujo de la bomba peristáltica lo lleva al cassette de filtrado (Pellicon XL Ultracel de 5 y 30 kDa), el sobrenadante con moléculas de menor tamaño pasa al permeado y las demás regresan al frasco de alimentación, donde se retiene el volumen concentrado, que más tarde se eluye a través de las columnas de Ni^{++} NTA agarosa donde las proteínas recombinantes con colas de histidinas se unen, mediante enlaces de coordinación al Ni^{++} y son disociadas con una solución con imidazol.

A continuación, se realizó una diálisis en 5 l de tampón de lavado (300 mM de NaCl; 50 mM de Tris-HCl y 20 mM de imidazol, pH 7,4) con agitador magnético a velocidad alta durante la noche con la finalidad de cambiar el tampón.

Purificación en columna de Ni⁺⁺

La GRNLY y las inmunotoxinas expresan una cola de histidinas, las cuales forman enlaces de coordinación entre sus anillos de imidazol y el catión Ni⁺⁺. Este es el mecanismo que permite la purificación de las proteínas recombinantes.

La resina de Ni⁺⁺ con ácido nitriloacético (Ni-NTA) agarosa (Qiagen) se lavó 2 veces con tampón de lavado (2500 rpm durante 2 minutos) y se resuspendió en la misma solución para luego incubarla con el sobrenadante resultante tras la diálisis (promedio de 100 ml por litro procesado). Después se colocó en una noria en rotación a 4 °C durante 1 hora aproximadamente y se lavó tres veces con tampón de lavado a 2500 rpm durante 5 minutos previa agitación en una noria durante 15 minutos. Finalmente, la resina se trasvasó a una columna de elución de 15 ml (Poliprep, BioRad) y se esperó aproximadamente 15 minutos para que decantara, enfriando la solución con baño de hielo. Finalmente, las proteínas recombinantes se eluyeron con 5 volúmenes de tampón de elución (250 mM de imidazol, 300 mM de NaCl y 50 mM de Tris- HCl a pH 7,4). Todo este proceso debe hacerse con soluciones a 4°C.

Posteriormente, la resina se regeneró para poder reusarla. Para ello, se aplicaron lavados sucesivos con 5 volúmenes de las siguientes soluciones: Imidazol 1M, Cloruro de sodio 1M, agua mili Q y finalmente se conservó la resina en una solución de etanol al 20%.

Cambio de tampón y concentración por amicón

Para cambiar el tampón de elución por PBS se concentró con membranas Amicón de 3 kDa (Millipore) para la GRNLY recombinante o membranas Amicón de 30 kDa (Millipore) para las inmunotoxinas. Previo a su primer uso, los filtros se “activaron” lavando con agua mili

Q, luego una solución de NaOH 0,1 M y finalmente con agua mili Q. Después de usadas, las membranas Amicon se conservaron en una solución de etanol al 20% a 4°C para reutilizarlas tras un lavado con agua mili Q. Finalmente, la solución resultante se esterilizó a través de un filtro de 0,22 µm y las proteínas se conservaron a 4°C. En el caso de las inmunotoxinas se pudo evidenciar precipitación de las proteínas durante esta fase final de la concentración o días más tarde, a 4°C o al descongelar; sin embargo, este fenómeno no se observó en el caso de la GRNLY.

Para determinar la concentración de las proteínas se utilizó un ensayo colorimétrico a 550 nm de ácido bicinónico (BCA) (Pierce™), en un equipo Multiskan EX 355, (Thermo Electronic Corporation). También se realizaron espectros de absorción de 240 a 400 nm y se estimó la concentración a partir de la absorbancia a 280 nm usando como coeficientes de extinción 58830 M⁻¹ cm⁻¹ para AR20.5GRNLY, 62380 M⁻¹ cm⁻¹ para SM3GRNLY y 8730 M⁻¹ cm⁻¹ para la GRNLY. A continuación, se puede ver un control de calidad de las producciones antes de la optimización del protocolo (Fig, 25).

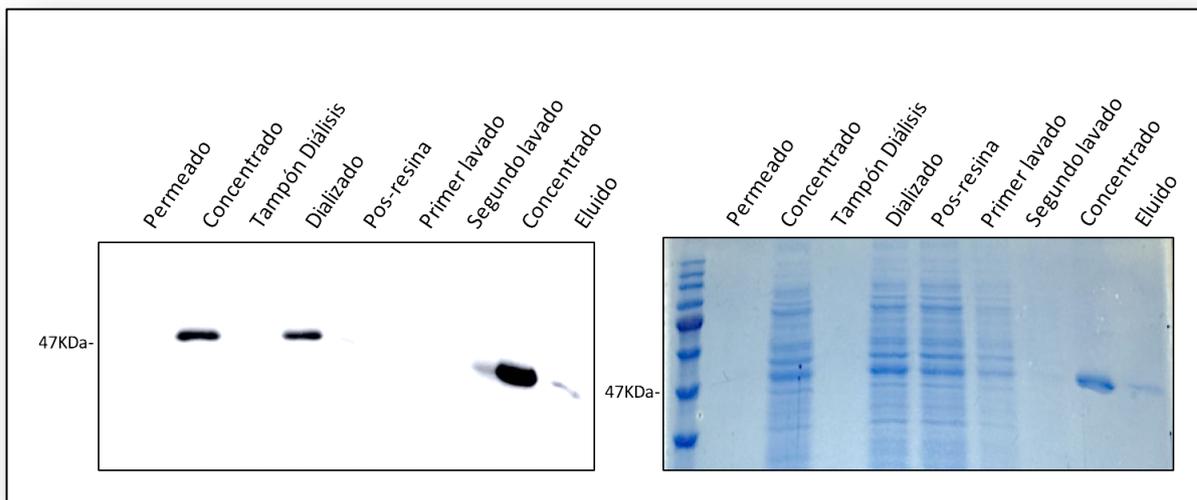


Fig. 25 Control de producción de SM3GRNLY, a la izquierda Inmunoblot y a la derecha gel de poliacrilamida de la misma proteína. Se observa muestras del sobrenadante que se tomaron en cada fase de la producción de proteína con el protocolo inicial.

3.6.2 Protocolo optimizado

Purificación en columna de Ni⁺⁺ sin concentración del sobrenadante

Se estableció que el procesamiento del sobrenadante se podía iniciar inmediatamente o congelar para luego procesar previo filtrado (filtro de 45µm y luego de 22µm).

Basándonos en el protocolo de Chase (Chase, 1994) en donde se indica que es factible la purificación de proteínas directamente de materias primas que contienen partículas, como caldos de fermentación y preparaciones de células lisadas, sin la necesidad de eliminar previamente los sólidos en suspensión, decidimos pasar directamente a la fase de purificación de la proteína en la resina de Ni⁺⁺ -NTA agarosa (Qiagen); previa centrifugación y filtración del sobrenadante por un filtro de 0,45 µm y después por otro de 22 µm. Respecto al tiempo de incubación del SN (sobrenadante) con la resina, el manual Invitrogen indica que una hora de incubación en agitación a 4°C es suficiente; sin embargo, se ensayó hasta 12 horas de incubación y se estableció que el tiempo para optimizar el rendimiento de purificación.

En la fase de elución de la proteína los cambios más relevantes consistieron en el recambio de Ni⁺⁺ de la resina y la sustitución de agua en lugar de PBS en la proteína final, lo que nos permitió usar la liofilización como técnica de concentración y no solo de conservación. Siendo que se reusó la resina, se observó que a más usos el color de la misma cambia de celeste /turquesa a gris a pesar de la regeneración en base a imidazol 2M y NaCl 1M. El protocolo de recambio de Ni⁺⁺ se basa en el uso de una solución de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 2M, lavado con agua miliQ, 5 volúmenes cada fase y se conservó en una solución de etanol al 20% a 4°C.

Este protocolo optimizado de purificación, cambio de tampón y concentración se aplicó también al resultado de la electroporación por PEF.

3.6.2.1 Cambio de tampón y concentración por diálisis

Se hicieron pruebas con la finalidad de evitar el uso de las membranas Amicon, en vista de la precipitación y en algunas ocasiones, la fragmentación de las inmunotoxinas, evidenciada en la electroforesis de control. Para ello, se usó un tampón de elución de PBS con imidazol 250mM y para eliminar el imidazol se hizo diálisis en PBS (5 l) con una membrana de diálisis durante una a dos horas con agitador magnético a velocidad alta.

3.7 Conservación de la proteína

El aumento en la producción de las inmunotoxinas vino acompañado de precipitación pos-congelación, lo que nos obligó a investigar una solución al respecto. Realizamos un ensayo de Estabilidad térmica mediante Thermofluor para establecer el tampón óptimo para la estabilidad de la proteína con la colaboración del PhD Ramón Hurtado Guerrero y Javier Macías, del BIFI. Además, decidimos probar diferentes conservantes/crioprotectores convencionales como sacarosa, glicerol y suero fetal bovino además de la liofilización y la congelación (Haque, et.al. 2015; Tonnis et al., 2015; Twomey, et.al. 2015).

3.8 Ensayos de estabilidad térmica

3.8.1 Calorimetría Diferencial de Barrido

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron mediante Calorimetría Diferencial de Barrido, también conocida como “ensayo de desplazamiento térmico”, Thermal Shift Assay, Thermofluor o abreviado DSC, de sus siglas en inglés Differential Scanning Calorimetry. Este método se basa en el uso de una sonda fluorescente sensible, es decir, un fluoróforo con bajos rendimientos cuánticos en agua, pero que es altamente fluorescente en disolventes orgánicos. Este fluoróforo se añade a una solución de proteína, que después se somete escalonadamente a temperaturas crecientes. A medida que la proteína se desnaturaliza, su núcleo hidrofóbico es

expuesto y el fluoróforo interacciona con éste, produciendo un aumento de la fluorescencia. De esta manera, el desplegamiento de la proteína se puede detectar en función de la temperatura a través del aumento de la señal de fluorescencia. La T_m o temperatura de desnaturalización aparente, es el punto medio en la curva de desnaturalización de la proteína (Lucas et al., 2019). En la Fig. 26 a continuación se puede ver un esquema de este ensayo.

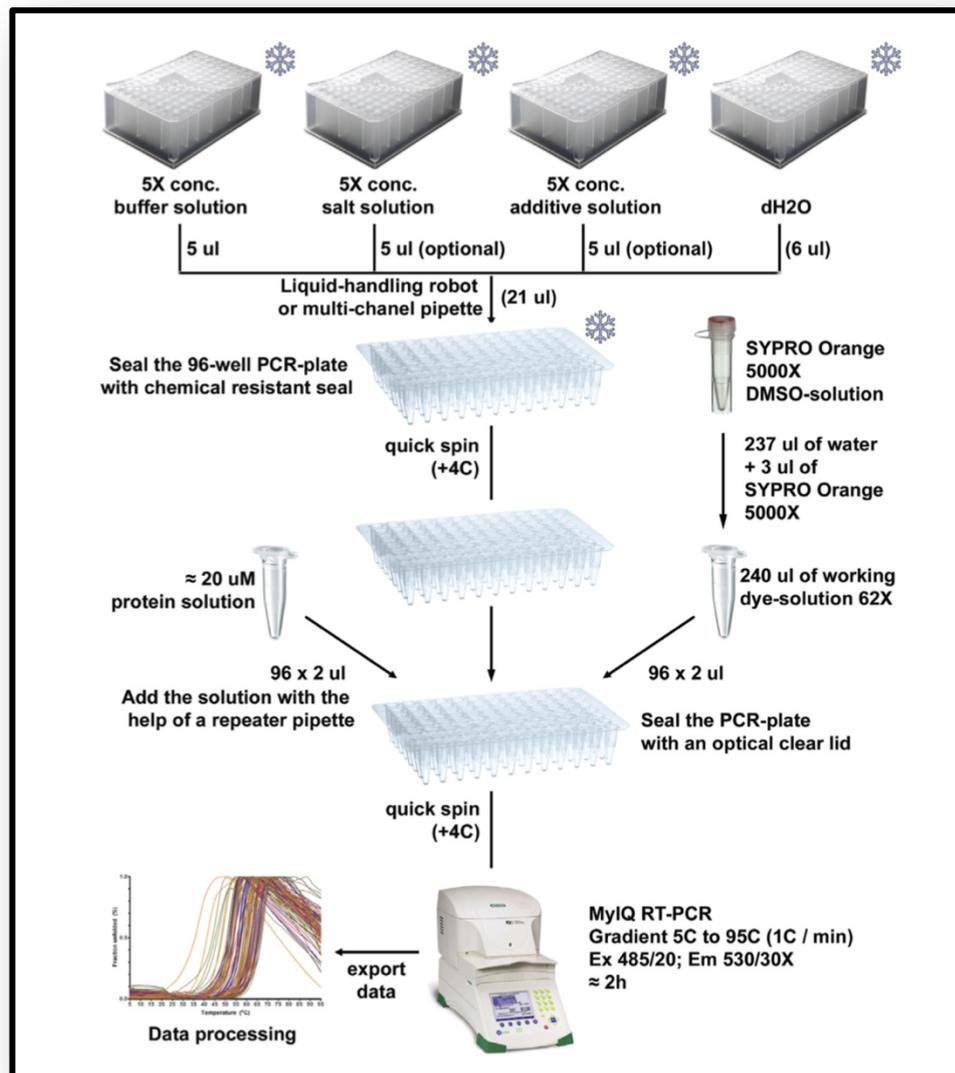


Fig. 26 Boivin et al. (2013) Esquema del protocolo de Thermal Scanning Fluorometry o Thermofluor.

El DSC se realizó en una placa de PCR de 96 pocillos y se utilizó el termociclador Stratagene MX3005P (Agilent Technologies). Las proteínas recombinantes se colocaron en un volumen final de 48 μ l del tampón correspondiente, a una concentración final de 5 μ M, fueron incubadas en presencia de SYPRO ORANGE (Invitrogen) a una concentración final de 5X (tomada de una solución stock 5000X especificada por el fabricante). La reacción se realizó en 75 ciclos de 60 s cada uno, con una temperatura inicial de 25 °C y un incremento de un 1 °C por ciclo. La fluorescencia emitida fue capturada en cada ciclo y fue representada gráficamente con el programa Graphpad prism. Para obtener la T_m , los datos de la curva fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann.

3.8.2 Dispersión Dinámica de luz

Dispersión Dinámica de luz (del inglés Dynamic Light Scattering (DLS)) es útil para la evaluación del grado de homogeneidad de una muestra (Khlebtsov & Khlebtsov, 2011). El radio hidrodinámico de la proteína GRNLY se determinó en un equipo de dispersión de luz DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). Las medidas se realizaron en cubeta de plástico con una concentración de proteína de 16 μ M en la muestra de GRNLY 478 y 12 μ M en la muestra de GRNLY 1202, ambas en tampón PBS, pH 7.4. Se midió la fluctuación temporal de la intensidad de luz dispersada (658 nm) a 90° durante 20 períodos de 2 s, y se estimó el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico promedio de la proteína a partir de la función de autocorrelación. Estos estudios los realizó el Dr. Adrián Velásquez en el BIFI.

3.9 Conservantes/Crioprotectores y La Congelación

Los productos biofarmacéuticos basados en proteínas como los anticuerpos monoclonales recombinantes, las vacunas, las citocinas y las hormonas, generalmente se producen como soluciones acuosas. El almacenamiento de estas soluciones, a menudo costosas, en condiciones ambientales puede conducir a una degradación rápida de la proteína, lo que resulta en la formación de productos que están inactivos o incluso provocan respuestas inmunitarias no deseadas. Para obtener una vida útil suficiente, estos productos generalmente

se almacenan y transportan refrigerados (Tonnis et al., 2015). Sin embargo, la congelación y el secado inducen importantes tensiones térmicas, osmóticas, mecánicas, físicas y químicas. Estas tensiones pueden hacer que las proteínas y las enzimas se dañen irreversiblemente por desnaturalización, agregación o cristalización. Además, durante el almacenamiento, se ha demostrado que ciertos productos farmacéuticos continúan perdiendo actividad y eficacia e incluso desarrollan características inmunogénicas que causan efectos secundarios no deseados y un resultado terapéutico inferior (Twomey et al., 2015).

Para proteger los productos biológicos contra las tensiones por el congelamiento, el secado y el almacenamiento, a menudo se añaden a la formulación farmacéutica o al bioespecimen productos químicos crio / lioprotectores (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, glicerol, aminoácidos, dimetilsulfóxido). Independientemente del mecanismo de protección que ofrecen, los crio / lioprotectores deben localizarse junto con los biológicos para garantizar la máxima acción protectora. Sin embargo, los gradientes térmicos y osmóticos y las tensiones mecánicas inducidas durante los procesos de congelación y secado pueden causar la separación física del crio / lioprotector. Estas tensiones también pueden causar variaciones espaciales en la distribución de otros excipientes (como los iones tamponantes y los agentes de carga) dentro del medio congelado o seco (Twomey et al., 2015).

La primera prueba de conservación de este estudio la hicimos usando simplemente la congelación; sin embargo, se observó la precipitación de las inmunotoxinas, aunque no ocurrió lo mismo con la GRNLY. Por consiguiente, se ensayaron diferentes conservantes como sacarosa y glicerol iniciando con concentraciones (v/v) de 5% hasta niveles de 0.006% y sometiendo a congelación a -20°C. Finalmente escogimos al glicerol como conservante a 2% en el stock congelado. La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios reporta en la Ficha Técnica del Glicerol que “La toxicidad aguda en rata y ratón es pequeña. Los valores de DL50 por vía oral son superiores a 20 ml/kg tanto en ratón como en rata, también en ambas especies se sitúan en 4,9 ml/kg y 4,4 ml/kg por vía intravenosa., respectivamente, y 7,1 ml/kg y 6,9 ml/kg por vía intraperitoneal., respectivamente”(Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2011). “Los estudios de mutagénesis y carcinogénesis realizados muestran la ausencia total de estas actividades”(Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2011). Estas concentraciones son muy superiores a las que usamos en los experimentos *in vivo*.

3.10 **Liofilización**

La liofilización se considera uno de los mejores métodos de secado que conserva en gran parte las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, así como la bioactividad de los productos biológicos. El proceso consiste principalmente en la congelación y la posterior deshidratación por sublimación. Debido a la ausencia de agua líquida y las bajas temperaturas requeridas para la liofilización, la mayor parte del deterioro y las reacciones microbiológicas se retardan dando como resultado un producto final de alta calidad y que se puede conservar a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo (Mosquera-Vivas et al., 2019).

Para la liofilización las proteínas se colocaron en tubos de 1,5ml y se congelaron a -80°C o -196°C . Dentro del liofilizador, los tubos se destapan y se cubren con varias capas de Parafilm (Sigma) a las cuales se hace varias perforaciones con una aguja. El liofilizador B.Brown Biotech SA. Modelo CHRIST ALPHA 1-4 se preparó 30 minutos antes siguiendo el protocolo de manejo del equipo y cuando se alcanzó los -50°C se colocó los tubos en una gradilla para introducirlos en la cámara de sublimación. Después de asegurarse de que se han cerrado las diferentes válvulas se produce el vacío mediante la bomba de vacío BUSCH Vacuum Zebra RH 010 B 1ph por un periodo de 24 horas, luego de lo cual las muestras se recogieron siguiendo el protocolo inverso. Las proteínas se reconstituyeron con agua destilada si la proteína se había hecho en PBS o en PBS si la liofilización se había hecho con las proteínas disueltas con agua destilada. En general, la liofilización y la recuperación de la bioactividad de las inmunotoxinas tras la reconstitución es mejor si la liofilización se hace en PBS y la reconstitución se hace con el mismo volumen de agua destilada para conservar la misma concentración de sales.

3.11 **Gel de Agarosa**

Para preparar un gel de agarosa al 1% se pesó 0,33 g de agarosa y se disolvió en 30 mL de buffer TAE 1X calentando la mezcla contenida en un matraz en un horno de microondas hasta lograr una mezcla homogénea. A esta solución se la enfría y se agrega 3 μl

de SYBR-safe (Thermo Fisher Scientific) agitando para homogenizar. Se colocó cinta adhesiva en ambos extremos de la bandeja, se vació con mucho cuidado la mezcla evitando hacer burbujas y se colocó un peine en un extremo. Se dejó enfriar hasta que polimerizó el gel. Se colocó 10ul de las muestras en cada pocillo con buffer de carga. Se corrió el gel a 90 volts durante una hora. Se retiró el gel y se observó en un transiluminador estándar a 300 nm. También se usó el equipo Gel Doc 2000 BioRad para visualizar la muestra usando el software Quantity One software.

El tampón TAE 50X está formado por 242g de Tris Base 2M, 57.1ml de Ácido Acético Glacial y 100ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0. Esta solución se afora con 1000ml de H₂O ultra pura. El buffer de carga (6X) se almacena a 4°C; está formada por glicerol 30% (v/v), Azul de bromofenol 0.25% (p/v) y Xileno Cianol FF 0.25% (p/v).

3.12 **Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida e Inmunoblot**

El Western Blot es una de las técnicas más comunes en la detección y análisis de proteínas. Consiste en una primera fase de electroforesis en gel de SDS- poliacrilamida donde las proteínas desnaturalizadas son separadas en función de su peso molecular. La separación electroforética de proteínas fue realizada mediante geles SDS-PAGE discontinuos (12-15%) (Shapiro et al., 1967). Con un gel de conservación de 4% acrilamida/bisacrilamida; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS 10% y 0,05% TEMED. Y el gel de resolución de 12% acrilamida/bisacrilamida; 0,75 M Tris-HCl pH 8,8 ; 0,1% SDS; 0,1% APS 10% y 0,05% TEMED (Anel & Kleinfeld, 1993). La visualización de las proteínas fue realizada mediante tinción con Azul de Coomassie (0,25% Brilliant Blue-R en 45% metanol, 10% acético) y posterior lavado con 45% metanol, 10% acético, o bien por transferencia de las proteínas a membrana para su inmunodetección por inmunoblot con los anticuerpos conjugados correspondientes. Se utilizó un sistema de electroforesis PowerPac HC (Bio-Rad).

Como control de calidad del proceso de producción, se guardaron alícuotas a 4 °C para analizarlas mediante electroforesis desnaturalizante similar a la descrita y un inmunoblot transfiriendo las proteínas separadas en el gel a membranas de nitrocelulosa mediante un

equipo de transferencia semiseca Trans-blot CD Semi-dry Transfer Cell BioRad (a 20V y 400mA durante 55 minutos) en presencia de un tampón de transferencia (TrisHCL 48mM pH 8,3; glicina 39mM, SDS 0,037% y metanol de calidad HPLC 20% v/v). Después, todos los pasos se realizaron en agitación. Primero se bloqueó la membrana con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en tampón B durante una hora, las proteínas fijadas en la membrana se detectaron con el anticuerpo THE™ anti-His (GenScript), que detectó la cola de histidinas que poseen nuestros constructos a una dilución 1:1000. A continuación, tras el lavado, se añadió anticuerpo secundario anti-mouse IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) por una hora. Más adelante, se lavó con tampón B para eliminar el exceso de anticuerpos.

La detección de los complejos se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia (ECL). Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida por la oxidación de luminol, un sustrato quimioluminiscente, por parte de la peroxidasa. Se utilizó dos técnicas de revelado:

1. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el reactivo Immobilon membranes Western Blot (Millipore) para hacer la transferencia a una película fotográfica (High performance chemiluminescence film, GE HealthCare) a temperatura ambiente, en oscuridad por 5-20 segundos. La exposición de las películas se llevó a cabo dentro de un cassette de revelado radiológico (Hypercassette™, Amersham Bioscience). Después, las películas se revelaron, mediante inmersión en soluciones de revelador-agua (Sigma) y destilada-fijador (Kodak), variando el tiempo de solución de revelador según la señal obtenida.

2. Mediante el equipo Amersham Imager 600 (General Electric Healthcare) que procesa la imagen digitalmente, aplicando el reactivo "Pierce® ECL Western Blotting Substrate" (Thermo Scientific) por 2 min y usando el software que viene incorporado en el equipo, escogiendo la opción de Quimioluminiscencia automática.

3.13 **Análisis de masas**

Los análisis proteómicos se realizaron en la Plataforma de Proteómica de Servicios Científicos Técnicos del CIBA (IACS-Universidad de Zaragoza), miembro de ProteoRed ISCIII. El análisis de masa exacta se llevó a cabo en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (4800 plus MALDI TOF/TOF, Sciex). Las muestras fueron acidificadas con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente se mezclaron con la matriz (una solución saturada de ácido sinapínico a 10 mg/mL preparada en 50% ACN 0.1% TFA) y se depositaron por duplicado en una placa MALDI Opti-Tof 384 (Sciex). Los análisis se realizaron en modo lineal positivo con un voltaje de aceleración de 20kV, un rango de masas de 20000-100000, focus 66000, 1000 disparos/espectro y una intensidad de láser de 4500. El equipo se calibró con una mezcla de estándares de proteínas (ProteoMass Protein MALDI-MSCalibration Kit MSCAL3, Sigma).

3.14 **Estudios de unión de las inmunotoxinas al antígeno Tn.**

Estos estudios se realizaron usando la técnica de Resonancia de Plasmones Superficiales o SPR (de sus siglas en inglés Surface Plasmon Resonance). El SPR es un método basado en la óptica para medir el cambio en el índice de refracción cerca de la superficie del sensor, no requiere marcaje y es capaz de medir en tiempo real las cinéticas y afinidades de unión de una proteína a su ligando. SPR se ha desarrollado y realizado predominantemente utilizando la tecnología Biacore™ (Uppsala, Suecia). En un instrumento Biacore, la superficie del sensor es una película delgada de oro sobre un soporte de vidrio, que forma el piso de una celda de flujo a través de la cual fluye continuamente una solución acuosa. Las moléculas receptoras de proteínas se inmovilizan en la superficie del sensor, y el ligando (generalmente llamado molécula de analito) se inyecta en la solución acuosa para detectar la reacción de unión. A medida que los ligandos se unen a las moléculas receptoras inmovilizadas, se observa un aumento en el índice de refracción (expresado en unidades de respuesta, RU o unidades de resonancia). Después de un tiempo de asociación deseado (es decir, cuando todos los sitios de unión están ocupados), se inyecta una solución que no contiene ligando a través de la celda de flujo para disociar el complejo proteína-ligando. A medida que el ligando se disocia de la proteína inmovilizada, se observa una disminución de RU. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la inmovilización de proteínas afecta las entropías conformacionales y traslacionales / rotacionales, y por lo tanto, la tasa de asociación (Du et al., 2016).

Para los ensayos de SPR se usó un equipo Biacore X-100 (Biacore, GE). Se trabajó con un tampón HSP-EP a pH 7.5 (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, con 2% de DMSO y 0,05% de Tween x100) como buffer de ejecución a 25°C. Las inmunotoxinas SM3GRNLY y AR20.5GRNLY fueron inmovilizadas en un chip sensor CM5 (Biacore, GE) siguiendo los métodos estándar de unión de aminas. Brevemente, la superficie de carboximetildextran de la celda de flujo 2 fue activada durante 7 minutos con una inyección a un ratio 1:1 de una solución acuosa de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide (EDC) a 0.4 M y sulfo-N-hidroxisuccinimida a 0.1 M. Luego, la inmunotoxina se acopló a la superficie durante 7 minutos usando varias diluciones en acetato de sodio a 10 μ M a pH4.0. Los ésteres activos sin reaccionar en la superficie se bloquearon mediante una inyección de 7 minutos de etanolamina-HCl acuosa a 0,1 M (pH 8.0). Los niveles de inmovilización fueron de 5700 unidades de resonancia (RU) para SM3GRNLY y 6800 RU para AR20.5GRNLY. La celda de flujo 1 fue tratada de la misma forma que en la celda de flujo 2 (procedimiento de acomplamiento de aminas) sin proteína para que sirva de control. Previamente, se prepararon soluciones madre de péptido-ligando MUC1-Tn a 50mM en el buffer de ejecución. Se inyectó una serie de compuestos diferentes en el chip sensor a un caudal de 30 μ l / min durante un período de 1 min seguido de un período de disociación de 1 min. Los datos del sensograma fueron doblemente referenciados usando el software Biaevaluation X-100 (Biacore, GE). Los datos experimentales de las medidas de afinidad se ajustaron a un modelo de unión específico de un sitio usando el software Prism. Este ensayo fue realizado por el Dr. Francisco Corzana (Universidad de la Rioja) en el servicio de SPR del Instituto de Química Orgánica General del CSIC (IQOG-CSIC, Madrid).

3.15 Ensayos para la determinación de la especificidad del reconocimiento de Tn por Citometría de flujo

Se utilizaron 1×10^5 células por cada condición lavadas 2 veces con una solución de PBS con 5% de SFB. Se incubaron en hielo con SM3GRNLY, iSM3GRNLY, AR20.5GRNLY, iAR20.5GRNLY o un anticuerpo comercial (Tn Antigen Monoclonal Antibody (Tn 218) (Thermo-Fisher Scientific MA1-90544) a una concentración de 10 μ g/ml (0,9 μ M) disueltos en la misma solución de lavado. Tras 1 hora se hizo un lavado con PBS con 5% de SFB, se incubó con el anticuerpo de ratón anti cola de histidinas (THE™ HisTag Antibody, GenScript USA) a una concentración de 0,5mg/ml diluído 1:200 y, tras incubar otra hora a 4 °C, se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Caltag) a una dilución 1:200. Finalmente se incubó otra hora a 4 °C y se lavó dos veces. La fluorescencia asociada a

las células se determinó y cuantificó en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (Becton Dickson S.A.).

3.16 Ensayos de funcionalidad de la proteína recombinante

3.16.1 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

Uno de los métodos más usados para analizar la muerte celular por apoptosis es a través del marcaje con Anexina-V/FITC, La Anexina-V tiene una alta afinidad por la PS, la cual se ubica en la cara interna de la membrana plasmática en las células viables y cuando se activa la apoptosis, la PS se trasloca a la hemicara externa de la membrana por activación de la vía intrínseca o extrínseca de la apoptosis (Martin et al., 1995).

Las células de las diferentes líneas tumorales se sembraron en un volumen de 50 μ l de medio de cultivo a una concentración de 3×10^5 en placas de fondo redondo en el caso de las células en suspensión y, a 6×10^5 en placas de fondo plano en el caso de las células adherentes. En un volumen de 50 μ l se añadió la proteína de la cual se quería establecer su acción citotóxica por el periodo deseado, alcanzando un volumen final de 100 μ l. Los controles negativos se hicieron con las mismas cantidades de PBS o medio de cultivo. Pasado el tiempo de incubación deseado, se centrifugó las células en suspensión y se eliminó el sobrenadante o se obtuvieron las células adherentes retirando el sobrenadante, lavando con PBS y agregando 100 μ l de tripsina e incubando a 37°C entre 5 y 15 minutos dependiendo de la línea celular. Después se agregó medio de cultivo para neutralizar la tripsina y se centrifugó. Las células precipitadas se lavaron con PBS. Se añadieron entonces 0,1 μ l del stock de Anexina-V-FITC preparado por nuestro grupo por punto en 100ul de tampón ABB (Anexin Binding Buffer) y 1,5 μ l de 7-AAD. Se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se hizo el análisis por citometría de flujo (BD FACSCalibur Becton Dickson S.A.), analizando la señal de FITC en FL1-H y la del 7-AAD en FL3-H.

Además de con Anexina/FITC, las células sometidas a los distintos tratamientos se marcaron también, en algunos ensayos, con 7-AAD, una sonda fluorescente que tiene afinidad

por el ADN, que solo da marcaje positivo si se ha producido una permeabilización de la membrana plasmática. El tampón ABB está compuesto por Hepes/NaOH 10mM pH7.4, NaCl 140mM, CaCl₂ 2,5 mM.

3.16.2 Ensayos de citotoxicidad *in vivo*

3.16.2.1 Modelo murino NUDE

La primera descripción de ratones atímicos desnudos fue presentada por Flanagan en 1966 en el Reino Unido después de su descubrimiento en el stock de ratones albinos en el Laboratorio de Virus del Hospital Ruchill en Glasgow, Reino Unido en 1962. Flanagan (1966) describió por primera vez sus rasgos fenotípicos y genéticos, y asignó el efecto de la falta visible de cabello a un nuevo gen recesivo (localizado en el cromosoma 11), al que llamó desnudo (cuya abreviatura es *nu*, a menudo se usa para describir el gen o la combinación de alelos *nu / nu*) (Szadvari et al., 2016).

El rasgo más importante de estos ratones que son utilizados en la investigación del cáncer, es su falta de timo y, en consecuencia, hay una incompetencia de la inmunidad mediada por células T. Los linfocitos T son además responsables de la reacción del huésped frente al injerto (llamada HVGR), que ocurre cuando un huésped rechaza un trasplante (tanto alo- como xeno-). En consecuencia, estos cambios en el sistema inmune de los NUDE permiten el crecimiento y eventualmente metástasis de las células tumorales de xenoinjertos. Macroscópicamente, la piel de ratones atímicos desnudos carece o tiene muy poca cantidad de pelo. Otra característica es su crecimiento retardado, fertilidad reducida, y una vida más corta debido a su debilidad general (Szadvari et al., 2016).

La mutación espontánea generó pérdida de función que resultó en una homocigosis recesiva en el locus del gen *FoxN1* (Forkhead box, anteriormente llamado *Whn* o *Hfh11*), que codifica factores de transcripción. Los heterocigotos no exhiben cambios fenotípicos (Szadvari et al., 2016). El modelo NUDE puede generar dificultad para el desarrollo de tumores debido a la actividad de las células NK, siendo sobretodo difícil el desarrollo de tumores provenientes de células hematopoyéticas malignas. Se recomienda el uso de ratones entre 5 a 10 semanas de edad para mejorar la tasa de injerto y la reproducibilidad de los estudios.

La realización de ensayos *in vivo* fue precedida por la autorización por el Comité Ético Asesor en Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza y se llevaron a cabo en el Animalario de Inmunodeprimidos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza dirigido por la Dra. Blanca Conde. En esta investigación se usaron modelos heterotópicos con administración subcutánea de líneas celulares tumorales en las que se ha descrito la expresión de MUC1-Tn: líneas de carcinoma de páncreas PANC-1, CAPAN-2 (Qu et al., 2004) y MIA PACA-2; línea de adenocarcinoma de mama MCF-7 (Medeiros et al., 2013) y adenocarcinoma de pulmón A549 (Croce et al., 1999). En primera instancia se estableció el inóculo más adecuado y la capacidad tumorigénica registrando el tamaño tumoral mediante un calibre electrónico. Se midió el largo y ancho, a partir de lo cual se calculó el volumen tumoral usando la fórmula: $V = \frac{\text{ancho}^2 * \text{largo}}{2}$

Una vez que se estableció el mejor modelo, en base a los ensayos *in vitro* de citotoxicidad, afinidad de las inmunotoxinas por Tn y crecimiento en los ratones NUDE, se escogió la línea tumoral de adenocarcinoma pancreático CAPAN-2 para realizar la prueba de tratamiento *in vivo*. Para ello se inyectaron 5×10^6 de células de forma subcutánea resuspendidos en matrigel. Los tratamientos no comenzaron hasta que el tumor hubiera alcanzado un tamaño de 200mm^3 , lo cual en el caso de este tumor ocurre tras 15 días-1 mes después de la inyección. Los ratones se dividieron en cuatro grupos experimentales, con 5 a 7 ratones por grupo: grupo control, en el que se hicieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 500 μl de PBS con 2% de glicerol cada dos días; grupo GRNLY, el que se inyectaron i.p. 0.5 nmol por g de peso siguiendo la misma pauta temporal; grupo SM3GRNLY, en el que se inyectaron i.p. 0.5 nmol por g de peso; y grupo AR20.5GRNLY en el que se inyectó i.p. 0.3 nmol por g de peso. Se realizaron 10 inyecciones sistémicas de los tratamientos correspondientes.

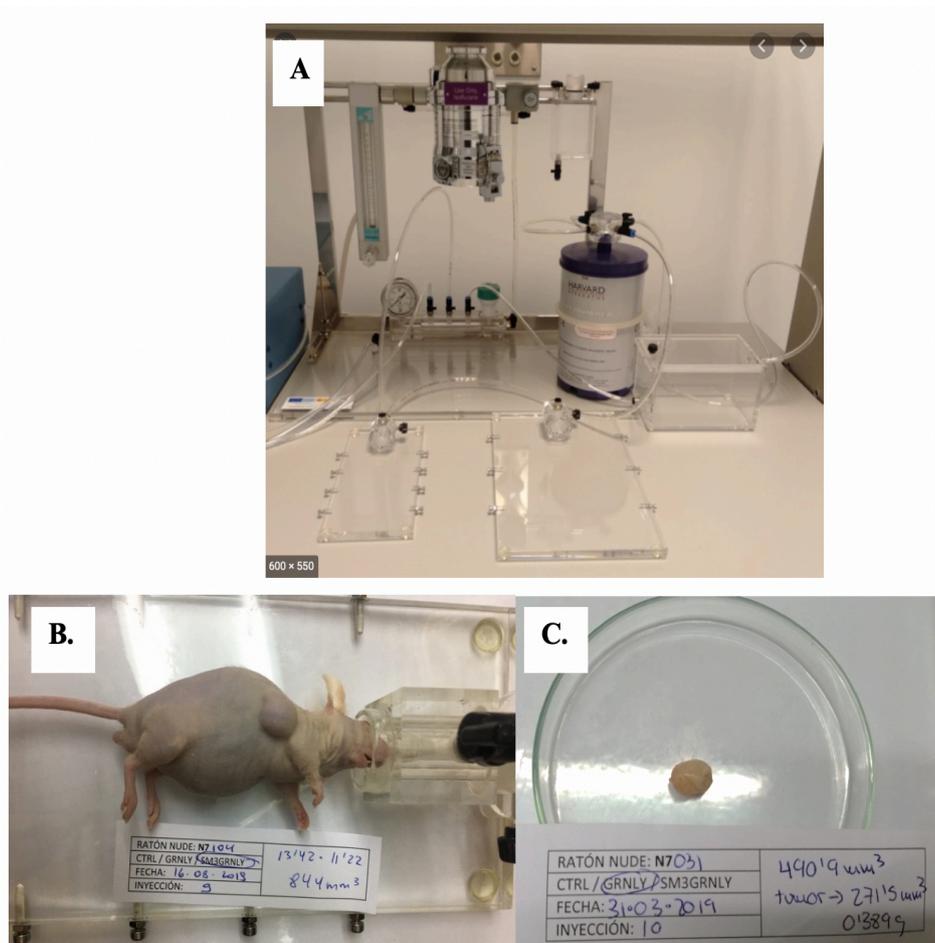


Fig. 27 Los ratones fueron anestesiados en un equipo de anestesia marca Harvard (A) con una mezcla de isoflurano/oxígeno en una cámara de anestesia a un flujo de 4 l /min y Oxígeno para inducción; luego, se trasladaron a una máscara de anestesia (B) y se procedió a medir el tamaño del tumor con un calibre electrónico y/o administrar el tratamiento correspondiente. Una vez extraído el tumor, se procedió a pesar y a medir nuevamente (C).

3.16.2.2 Modelo murino NOD Rag gamma, NRG

Los NRG son ratones congénitos NOD que poseen la mutación Rag1null (Rag1KO o Rag1tm1Mom) en el cromosoma 2 y la mutación IL2rγnull (IL2RγcKO o Il2rgtm1Wjl) en el cromosoma X. Estos ratones mutantes NRG también se denominan ratones mutantes dobles NOD-Rag1null IL2rγnull o ratones NOD.Rag1KO.IL2RγcKO. Se produjeron mediante el cruce de ratones NOD-Rag1null con ratones NOD-scid IL2rgnull. Las crías se cruzaron y criaron para que fueran homocigóticas para la mutación Rag1null, homocigóticas (para las hembras o hemicigóticas para los machos) para la mutación nula de IL2rγ ligada al cromosoma X, y de tipo salvaje para la mutación scid. El trasfondo genético es equivalente a N9. Toleran el injerto

de células madre de sangre de cordón después del acondicionamiento por irradiación (que conduce a poblaciones de células hematopoyéticas de múltiples linajes y un repertorio completo de células inmunes humanas, incluidas las células T humanas) y del injerto de células mononucleares de sangre periférica humana en ratones adultos no acondicionados. Son modelo para estudios de injerto de células linfohematopoyéticas humanas que requieren un huésped radiorresistente (jax.org, 2021; Maletzki et al., 2020).

Los ratones NRG carece de células T, B, NK y además tiene un sistema innato deficiente por una activación constitutiva de SIRP α , que da señales de “don't eat me” constantemente a los macrófagos (Takenaka et al., 2007).

Este modelo murino, se lo conoce también como: NOD-scid IL2R γ null, NOD-scid IL2R γ null, NSG, NOD scid gamma. Son extremadamente inmunodeficientes. Estos ratones portan dos mutaciones en su trasfondo genético NOD / ShiLtJ; inmunodeficiencia combinada grave (scid) y un alelo nulo completo de la cadena gamma común del receptor de IL2 (IL2R γ null). La mutación scid se encuentra en la proteína del complejo de reparación del ADN Prkdc y hace que los ratones sean deficientes en células B y T. La mutación IL2R γ null previene la señalización de citocinas a través de múltiples receptores, lo que conduce a una deficiencia en las células NK funcionales. La inmunodeficiencia grave permite que los ratones se humanicen mediante el injerto de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34 + humanas, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), xenoinjertos derivados del paciente (PDX) o células madre y tejidos adultos. Los ratones NSG inmunodeficientes permiten la investigación de la función inmunitaria humana, enfermedades infecciosas, diabetes, oncología y biología de células madre (Brendel et al., 2020; Okada et al., 2019; Wang et al., 2018).

Trece ratones NOD.Cg-Rag1tm1MomIL2rgtm1Wjl/SzJ de 3 semanas de vida fueron amablemente proporcionados por el Dr. Miguel Sanmamed. Los animales se manejaron en el Animalario del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra bajo las condiciones libres de patógenos con ciclos de luz/oscuridad de 14/10. Se realizó el xenotransplante de la línea de adenocarcinoma de colon HT-29. Para el efecto, previamente, se administró i.p. una solución de Ketamina 45% v/v (Ketamidol 100 μ mg/ml) y rocuronio 10% v/v (Rompur), se rasuró el flanco derecho y se inoculó vía subcutánea, 3×10^6 de células de la línea de adenocarcinoma de colon HT-29 suspendidas en PBS.

Luego de 24 horas se procesó 6 tubos de sangre de donantes sanos (volumen total de 80 ml) previa firma de consentimiento informado. La sangre se obtuvo mediante leucofóresis en la Clínica Navarra usando un equipo Cobe Spectra (Cobe). Se diluyó la sangre 1:2 en PBS en tubos de 50 ml y luego se separó las células mediante gradiente de Ficoll. Se centrifugó a 2200 rpm durante 22 min a 22°C con el programa de aceleración-desaceleración lenta. Se trasvasó los monocitos a un tubo de 50 ml y se centrifugó durante 4 minutos a 2000 rpm. El sedimento con los leucocitos se resuspendió en PBS. Se contó en la cámara de Neubauer. Se inyectó 8×10^6 de PBMCs (del inglés peripheral blood mononuclear cells) en un volumen 100 μ l con una jeringa de 300 μ l (aguja de 30G) en el seno venoso retro-orbital (ángulo externo del ojo derecho).

Los tumores se vigilaron hasta que alcanzaron un radio de 3,5 mm y se inició tratamiento a todos los ratones concomitantemente. Se dividió en tres grupos, uno recibió PBS, otro GRNLY (40 μ M) y dos ratones no recibieron tratamiento alguno para vigilar el crecimiento tumoral. Se administró cada 48 horas 50 μ l del tratamiento correspondiente intratumoral usando una jeringa de insulina de 0,5 ml y aguja de 30 G por 5 veces. Se vigiló estrechamente el peso de los animales y su estado de bienestar según la escala de severidad de la Directiva 2010/63/EU de Protección de los animales Utilizados para fines científicos. Uno de los animales falleció antes de iniciar el tratamiento y a otro se debió aplicar eutanasia en base los criterios de punto final humanitario antes de terminar el ensayo.

3.17 Análisis Histopatológicos

Los tumores extraídos de los ratones NUDE fueron fijados en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas a 4°C, tras lo cual, se trasvasaron a una solución alcohólica al 70%. Los tumores de los ratones humanizados NSG se fijaron de la misma manera y fueron procesados en el Laboratorio de Anatomía-Patológica del CIMA.

El procesamiento de los tejidos y posteriores tinciones (histoquímica, DAPI e inmunohistoquímica), fueron llevados a cabo en el Servicio Científico-Técnico de Anatomía Patológica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Las muestras de tejidos fueron procesadas en casetes con malla utilizando un protocolo estándar (procesador rápido de tejidos automático Tissue-Tek Xpress x50; Sakura, Japan). La confección de los bloques se realizó con la unidad de confección de bloques (Leica EG1150) tras lo cual se solidificaron en una placa fría. Las muestras embebidas en parafina se cortaron en secciones de 3µm de grosor (Microtomo de rotación Leica RM2255). Dichas secciones fueron recogidas en portaobjetos Superfrost y se dejaron secar durante toda la noche a 37°C.

3.17.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina

Para la tinción histoquímica de hematoxilina-eosina, las secciones obtenidas según el apartado 2.12.1 fueron desparafinadas en xileno durante 10 minutos y rehidratadas en soluciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 96%, 70%; 5 minutos cada una), y agua destilada (5 minutos). Los núcleos de las células fueron teñidos por inmersión en hematoxilina de Carazzi (Bio-Optica; ref.05-0612L) durante 22 min. Tras esto, las secciones fueron lavadas en agua corriente durante 5min. Los citoplasmas fueron teñidos por inmersión en una solución hidroalcohólica de eosina amarillenta al 3% (Chem-Lab; ref. CL04.0506.0025) durante 18 minutos, tras lo cual se realizaron inmersiones rápidas en etanol al 70% durante 30 segundos. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en soluciones ascendentes de etanol (70%, 96%, 100%; 15 segundos cada una), se limpiaron con xileno durante 15 segundos y se montaron con DPX (resina acrílica con base de xileno) utilizando cubreobjetos de vidrio.

3.17.2 Tinción nuclear con DAPI

El 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato o DAPI, es un marcador fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol, que se usa para la tinción de ADN (tinción nuclear) en microscopía de fluorescencia y en citometría de flujo.

Para la tinción nuclear con DAPI, las secciones procesadas previamente fueron desparafinadas y rehidratadas según se ha descrito anteriormente. Posteriormente, las secciones fueron montadas utilizando un medio de montaje que contenía DAPI (Fluoromont-G + DAPI) y cubiertas con cubreobjetos de vidrio. Pasados 15 minutos en oscuridad, las preparaciones fueron selladas y se conservaron en nevera a 4°C. Finalmente, las preparaciones fueron observadas en un microscopio de fluorescencia con excitación UV.

3.17.3 Tinción inmunohistoquímica con Caspasa 3

La expresión de caspasa-3 activa se analizó mediante tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo de conejo anti-caspasa 3 humana (Cell Signaling, Barcelona), el cual reconoce la forma activa fragmentada de la caspasa3.

Para ello, las secciones procesadas previamente fueron desparafinadas y rehidratadas según se ha descrito anteriormente, tras lo cual, se llevó a cabo la recuperación antigénica con el PT Link (Dako) a 95°C durante 20 min a pH bajo. Después de la recuperación antigénica, se llevó a cabo la inmunotinción automatizada (Autostainer Link48; Dako) con un protocolo previamente optimizado en el SCT de Anatomía Patológica, según el cual, la peroxidasa endógena se bloqueó durante 5 min con EnVision FLEX Peroxidase-Blocking, tras el cual se realizó otro bloqueo con suero de caballo al 2,5% durante 20 minutos y, a continuación, se incubó con el anticuerpo primario Caspasa-3 Activa (Cell Signaling, Barcelona) a una dilución 1/400 durante 60 minutos. Como sistema de visualización, se utilizó un sistema dual conjugado HRP de conejo para amplificación de la señal (Vector) y 3,3'-diaminobencidina (DAB) para el desarrollo de la señal después de la precipitación en los sitios de unión del anticuerpo primario.

4. DISCUSIÓN

Se conoce desde hace tiempo la función antibacteriana y antiparasitaria de la GRNLY de 9KDa, lo cual se ha confirmado y ampliado en estudios recientes (Crespo et al., 2020; Dotiwala et al., 2016; Stenger et al., 1998). Su función antitumoral en condiciones fisiológicas no ha sido demostrada, aunque existen abundantes datos que la relacionan con la respuesta inmune antitumoral y con un buen pronóstico (Kishi et al., 2002; Pagès et al., 2005; Sparrow & Bodman-Smith, 2020). En cualquier caso, estudios de nuestro grupo han demostrado que la GRNLY recombinante es capaz de matar células tumorales *in vitro* a través de la vía apoptótica mitocondrial (Aporta et al., 2014; Gamen et al., 1998; Martínez-Lostao et al., 2015). Esta actividad antitumoral de la GRNLY recombinante se ha demostrado también *in vivo*, mediante inyección intratumoral (Al-Wasaby et al., 2015). Para mejorar la direccionalidad de la molécula, con miras al tratamiento sistémico, una aproximación podría ser la conjugación de un anticuerpo dirigido contra una molécula tumoral, o antígeno asociado a tumor. Nuestro equipo diseñó tres inmunotoxinas que conjugaron la GRNLY con scFv, uno dirigido contra CEA (Antígeno carcino-embriionario) (Ibáñez-Pérez et al., 2019) y dos contra el antígeno Tn (Guerrero-Ochoa et al., 2020); antígenos tumorales ampliamente descritas en la literatura. La administración sistémica de la inmunotoxina MFE23GRNLY ha demostrado direccionalidad y capacidad citotóxica superior a GRNLY en un modelo murino (Ibáñez-Pérez et al., 2019). Es decir, esa inmunotoxina posee la combinación adecuada de estabilidad y alta especificidad del scFv, así como la capacidad citotóxica de la GRNLY. Usando *P. pastoris* como sistema de expresión fue posible llevar a cabo todos estos estudios. Sin embargo, el rendimiento de la producción de SM3GRNLY y AR20.5GRNLY basados en el mismo protocolo fue menor. En este contexto, el primer objetivo de esta tesis fue **optimizar un protocolo de producción de SM3GRNLY y AR20.5GRNLY**.

P. pastoris, actualmente *K. phaffii*, fue desarrollado como sistema de expresión de proteínas hace 50 años (Cereghino & Cregg, 1999). Invitrogen, dueño de la patente desde hace 28 años (Arguelles et al., 2014), desarrolló la cepa X-33, que se usó en la producción de nuestras inmunotoxinas. Asimismo, Invitrogen desarrolló un protocolo de producción para expresión de proteínas recombinantes, el mismo que ha servido como base para las investigaciones desarrolladas por nuestro grupo pero que no resultó enteramente eficaz para los objetivos de este estudio. Si bien se obtuvo proteína, el rendimiento de la producción fue

insuficiente para poder planificar ensayos *in vivo*. Asociado a una producción diez veces menor de AR20.5GRNLY comparado con SM3GRNLY, se observó un crecimiento del cultivo de *P. pastoris* X-33 transformada con *pPICZ α -A-AR20.5GRNLY* más lento, requiriéndose en un 40% de los casos prolongar la fase de crecimiento hasta alcanzar la concentración celular adecuada. Estudios previos indican que la cepa X-33 de *P. pastoris* presenta problemas de crecimiento por la menor disponibilidad de histidina debido a una mutación en el gen *HIS4p*, gen que interviene en la vía de síntesis de L-histidina (Brady et al., 2020). Respecto a si la transformación de la cepa con el plásmido *pPICZ α -A-AR20.5GRNLY* podría haber sido ineficiente, investigaciones han demostrado que la cepa X-33 tiene una pared celular más permeable y una mayor permisividad para las transformaciones, característica que se asoció a incremento de la productividad de proteínas asociadas a membrana (Brady et al., 2020).

Una de las aproximaciones innovadoras que se utilizaron para mejorar el rendimiento de la producción fue la técnica de electroporación con campos eléctricos pulsados o PEF. El uso de la electroporación por PEF con fines de producción de proteínas recombinantes solo se había reportado una vez antes de nuestro trabajo y se hizo usando la levadura metilotrófica *Hansenula polymorpha* como sistema de expresión de ferritina humana de cadena pesada (Ganeva et al., 2018). Las ventajas sobre procedimientos estándar de lisis celular son la disminución sustantiva de los contaminantes generados con esos protocolos, lo que da una clara ventaja para la purificación de las proteínas (Ganeva et al., 2015). La eficacia de la electroporación mediante PEF demostró que un alto porcentaje de proteínas recombinantes queda retenido en las levaduras, lo que no sucedió con las cepas productoras de GRNLY ni de MFE23GRNLY, de las que no se pudo extraer proteínas aplicando la misma técnica (Raquel Ibáñez, comunicación personal). Los ensayos de inactivación de las levaduras electroporadas demostraron que el protocolo usado para aplicar los pulsos eléctricos afecta al 99% de la población celular. En este sentido, podemos afirmar que tanto GRNLY como MFE23GRNLY recombinantes son secretadas mayoritariamente al sobrenadante del cultivo y que no se precisa extraer la proteína intracelular mediante PEF.

En el caso de SM3GRNLY y AR20.5GRNLY puede haber mecanismos generadores de degradación proteica (asociados a mal plegamiento y estrés de retículo) probablemente combinados con ineficiencia en la exocitosis de las proteínas, que ya se han descrito en estudios previos (Delic et al., 2013; Puxbaum et al., 2015) y podrían explicar su baja eficiencia de la secreción. Además, la cepa productora de GRNLY y MFE23GRNLY es la *SMD1168*, que difiere

de la X-33, usada para la expresión de las inmunotoxinas anti-Tn. La cepa X-33 expresa la proteasa A, una aspartil proteasa que incrementa la actividad de carboxipeptidasa Y y proteinasa B (Cregg, 1993). Podría ser que esta actividad proteasa fuera un factor que contribuye a la ineficiente producción de SM3GRNLY y AR20.5GRNLY.

Finalmente, en la producción inicial que se usó para la esta investigación no hubo un control estrecho de las condiciones bioquímicas del cultivo tales como pH, niveles de oxígeno, niveles de amoníaco, etc. Se ha descrito que la oxidación del metanol en presencia de oxígeno constituye el primer paso en la asimilación de esta fuente de carbono, así como en la obtención de energía a partir de la misma. Algunos informes plantean que el metabolismo del metanol en cultivos de alta densidad de *P. pastoris* trae como consecuencia un aumento en la demanda del oxígeno disuelto en el medio de cultivo, de modo que cuando las células crecen bajo condiciones limitantes de oxígeno disuelto disminuyen los niveles de producción de la proteína heteróloga (Lopes et al., 2014).

Estas consideraciones se tuvieron en cuenta en las mejoras en el protocolo de producción y purificación que se llevaron a cabo en este trabajo. Una vez que se logró mejorar la productividad de al menos una de las inmunotoxinas (SM3GRNLY), se debió abordar el segundo objetivo, **determinar la estabilidad de las inmunotoxinas con el objeto de realizar ensayos *in vitro* e *in vivo*.**

La estructura de las proteínas es uno de los factores que más influyen en la productividad en los sistemas de expresión y en la estabilidad de las moléculas; en el caso de las moléculas de pequeño tamaño, como es el caso de la GRNLY, hay menos área de superficie hidrofóbica oculta, por lo cual la transición entre el estado estable y el inicio de la degradación de las moléculas debería ser más progresivo (Ericsson, et al., 2006; Pantoliano et al., 2001). En nuestros estudios hemos sido incapaces de observar la desnaturalización térmica de la GRNLY, manteniéndose aparentemente estable a temperaturas superiores a 90°C. Este dato concuerda con la observación previa realizada por Ernst et al. (Clayberger et al., 2000) sobre la ausencia de efecto sobre su espectro de dicroísmo circular tras ebullición durante 10 minutos. Solamente se observó pérdida de su estructura tras reducción de sus puentes disulfuro, indicando que éstos son muy importantes en el mantenimiento de su bioactividad (Clayberger et al., 2000). Así

mismo, la experiencia de nuestro equipo de investigación ha mostrado que la estabilidad de la proteína se mantiene durante al menos tres meses a 4°C (Alwasaby, 2014; Aporta, 2013).

La estructura de los plásmidos de las inmunotoxinas anti-Tn codifican la GRNLY en la porción C-terminal seguida de la molécula de scFv y la cola de histidinas unidas a éste, con dos puentes disulfuro integrados ; mientras que la inmunotoxina anti-CEA fue construida con una estructura inversa y un solo puente disulfuro integrando la molécula. Además, MFE23GRNLY no ha presentado la precipitación masiva que se vio en el caso de las inmunotoxinas anti-Tn y no requiere complementarse con conservantes siendo la congelación suficiente para la conservación de la proteína (comunicación personal Raquel Ibañez P.). En este contexto, es evidente la estabilidad claramente superior de la GRNLY respecto a sus inmunotoxinas derivadas y, por otro lado, las diferencias estructurales de MFE23GRNLY respecto a SM3GRNLY y AR20.5GRNLY podrían otorgarle más estabilidad. Por otra parte, no se ha demostrado que las proteasas propias de las cepas de *P. pastoris*, puedan tener relevancia en estas diferencias.

Nuestros estudios mostraron que disuelta en PBS, la SM3GRNLY presenta un Tm más alto (58.4°C) AR20.5GRNLY (42,8°C), lo que concuerda con su mejor rendimiento productivo. Sin embargo, tanto AR20.5GRNLY como SM3GRNLY precisaron un conservante para estabilizarlas con fines de congelación/descongelación. Está descrito que la congelación induce importantes tensiones térmicas, osmóticas, mecánicas, físicas y químicas, las mismas que pueden hacer que las proteínas y las enzimas se dañen irreversiblemente por desnaturalización, agregación, cristalización o inclusive pierdan su actividad y eficacia. Por lo tanto, es necesario usar moléculas con actividad crio/lioconservante, que protejan para evitar variaciones espaciales en la distribución de otros excipientes (como los iones tamponantes y los agentes de carga) dentro del medio congelado (Twomey et al., 2015). Nordland y colaboradores (2006) describieron un método para buscar componentes de los tampones y pequeñas moléculas que aumenten la estabilidad térmica de la muestra. Ellos encontraron que los aditivos que aumentan la temperatura de desnaturalización aparente (Tm) de la muestra, también incrementaron el número de cristalizaciones exitosas de las proteínas, mientras que los componentes de los tampones que produjeron una disminución de la Tm, condujeron a un resultado opuesto. El uso de sacarosa y glicerol como conservantes se ha reportado en la industria alimentaria y farmacéutica (Tonnis et al., 2015; Twomey et al., 2015). Estos conservantes solucionaron los problemas de estabilidad tras la congelación y permitió la ejecución de los ensayos *in vitro* e *in*

vivo. Los azúcares pueden desacelerar las vías de degradación tanto química como física de la proteína en estado sólido mediante una reducción de la movilidad local y global a través de interacciones estrechas (es decir, enlaces de hidrógeno) con la proteína. Los azúcares son generalmente eficaces para proteger contra la deshidratación, la congelación y el estrés térmico (Mensink et al., 2017). Sobre la sacarosa se ha demostrado la recuperación de 94% de la bioactividad poscongelación de proteínas combinadas con este compuesto (Peters et al., 2014).

En una segunda estrategia de conservación de las inmunotoxinas, usamos la liofilización. La liofilización ha sido descrita como una herramienta muy útil para conservación de compuestos farmacológicos y alimentarios. La liofilización se asocia con congelación, deshidratación y tensiones interfaciales sólido-líquido. Los azúcares no son eficaces para contrarrestar estos efectos por lo que los tensioactivos se utilizan con frecuencia como protectores. Además, es pertinente mencionar que las condiciones de secado, p. Ej. la velocidad de congelación en la liofilización también es muy importante para maximizar la estabilización de las proteínas y, por lo tanto, estas condiciones deben elegirse con cuidado (Mensink et al., 2017). Los resultados demostraron que la liofilización, en las condiciones operadas en nuestro laboratorio, fueron eficientes para conservar la proteína tanto estructuralmente, como funcionamiento. Otra ventaja del uso de esta técnica es la posibilidad de incrementar la concentración de los preparados al liofilizarlas disueltas en agua destilada ultrafiltrada y luego reconstituidas con PBS.

Una vez optimizado el protocolo de producción y las condiciones de estabilidad más adecuadas para las inmunotoxinas, el siguiente paso fue **establecer la capacidad de las inmunotoxinas para reconocer su antígeno en modelos *in vitro*.**

La asociación entre un anticuerpo y su antígeno, para formar un complejo antígeno-anticuerpo, se compone de miríadas de interacciones no covalentes. Los residuos de aminoácidos en el sitio de unión del antígeno, el epítipo, y en el sitio de unión del anticuerpo, el paratopo, contribuyen íntimamente a la energía necesaria para la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo (Kapingidza et al., 2020). En los ensayos de SPR, las K_D mostradas para el péptido MUC21T por AR20.5GRNLY y SM3GRNLY alcanzaron niveles comparables a los de sus respectivas scFv independientes previamente descritas (Martínez-Sáez et al., 2015; Movahedin

et al., 2017), lo que nos proporcionó una información de que los constructos podían producir un efecto antitumoral eficiente. Los resultados del estudio de masas por MALDI TOF proporcionaron información acerca del peso molecular de SM3GRNLY e iSM3GRNLY cercano al teórico, aunque harían falta más estudios para establecer si existen diferencias en la glicosilación de ambas moléculas.

El reto del reconocimiento del antígeno en estructuras más complejas que las moléculas aisladas, como el caso de las células, fue superado tanto por las inmunotoxinas intracelulares, obtenidas mediante PEF como por las proteínas extracelulares obtenidas por el protocolo optimizado. Acorde con los ensayos de SRP, la capacidad de reconocimiento y unión a su antígeno se demostró con todas las proteínas recombinantes en líneas celulares en las que se había descrito la expresión del antígeno Tn: los adenocarcinomas de páncreas PANC-1, CAPAN-2 (Qu et al., 2004), el adenocarcinoma de mama MCF-7 (Medeiros et al., 2013), el adenocarcinoma de pulmón A549 (Croce et al., 1999) y la leucemia linfoide aguda JURKAT (Posey et al., 2016), usando como control negativo el adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (Fujita et al., 2019).

En general, el reconocimiento fue de mayor intensidad, comparado con su control, y en mayor número de líneas celulares, con la inmunotoxina AR20.5GRNLY con respecto a SM3GRNLY e iSM3GRNLY. Estas dos últimas reconocen el antígeno en las mismas líneas celulares demostrando que la táctica de electroporación por PEF produce proteínas recombinantes bioactivas y funcionales (Guerrero-Ochoa et al., 2020). Además, nuestras inmunotoxinas reconocen el antígeno Tn mediante citometría de flujo más eficazmente que anticuerpos comerciales anti-Tn (ver ANEXO 2).

Una vez que se estableció la capacidad de reconocimiento de su antígeno por parte de las inmunotoxinas, nos propusimos **determinar la capacidad antitumoral de las inmunotoxinas anti-Tn en líneas celulares tumorales.**

La capacidad citotóxica de las inmunotoxinas anti-Tn fue superior a GRNLY en muchas líneas celulares. La línea CAPAN-2, de adenocarcinoma de colon, mostró una gran respuesta citotóxica frente a AR20.5GRNLY, iAR20.5GRNLY, SM3GRNLY e iSM3GRNLY. El

reconocimiento sustancial de Tn por parte de AR20.5GRNLY, SM3GRNLY e iSM3GRNLY en esa línea celular fue concordante con la respuesta citotóxica superior en comparación con la GRNLY y respaldó la decisión de usarla para los ensayos *in vivo* en el modelo murino. En la línea H929, de mieloma múltiple, en la cual también hubo reconocimiento del antígeno Tn por parte de todas las inmunotoxinas, se observó una contundente respuesta citotóxica superior frente a SM3GRNLY e iSM3GRNLY, pero no así frente a AR20.5GRNLY o iAR20.5GRNLY, siendo estas últimas superadas por GRNLY. En estudios previos se ha visto una tasa de respuesta muy eficiente de esa línea frente a GRNLY tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, por lo que se pone de manifiesto su gran sensibilidad a la GRNLY que es posible que no pueda ser incrementada por las demás inmunotoxinas. Además, ésta es una línea celular que se cultiva en suspensión, de forma que la exposición de toda su superficie celular a la GRNLY podría tener un papel en los resultados observados.

La leucemia linfoblástica aguda JURKAT, presenta una mutación de Cosmc, una chaperona que participa en la función de la T-sintasa durante el proceso de glicosilación de MUC1. Esta mutación da paso a la formación del antígeno Tn, es así que, en esa línea celular, que además de ser positiva para las inmunotoxinas AR20.5GRNLY, iSM3GRNLY y SM3GRNLY fue la única que también lo fue para una IgM anti-Tn comercial; fue muy sensible a la acción citotóxica de SM3GRNLY e iSM3GRNLY, superando a la GRNLY de forma significativa.

En la línea MCF7, de adenocarcinoma de mama, en la cual el reconocimiento de Tn fue positivo solamente con AR20.5GRNLY, también la citotoxicidad celular se observó primordialmente frente a iAR20.5GRNLY y AR20.5GRNLY. Es decir, la respuesta citotóxica tuvo correlación con la capacidad de reconocimiento del antígeno. La respuesta citotóxica frente al adenocarcinoma de pulmón A549, en la cual tanto AR20.5GRNLY como SM3GRNLY reconocieron al antígeno Tn, fue relevante frente a AR20.5GRNLY. PANC-1, línea de adenocarcinoma de páncreas, a pesar de haber sido reconocido el antígeno Tn por AR20.5GRNLY, iSM3GRNLY y SM3GRNLY, sólo mostró una respuesta citotóxica frente a SM3GRNLY y en menor proporción frente a iAR20.5GRNLY, a la más baja concentración. Esto puede estar en relación con varias causas, primero, se puede postular que la capacidad de reconocimiento del antígeno no siempre se correlaciona con la respuesta citotóxica debido a que la afinidad por su antígeno puede estar limitada por un bloqueo estérico que dificulta la opsonización para acercar a la GRNLY a su diana, la membrana plasmática (Ragupathi et al., 2005). Por ejemplo en el caso de la terapia dirigida a HER2, se ha visto que el epítipo puede

estar enmascarado parcialmente por MUC4 o por hialuronano (Nagy et al., 2005; Pályi-Krekk et al., 2007). Segundo, la GRNLY debe acceder a los fosfolípidos de la cara externa de la membrana plasmática de las células tumorales. Esta interacción es sobre todo electrostática, entre las cargas positivas de la GRNLY y las cargas negativas de los fosfolípidos de membrana. Se ha descrito que la concentración de colesterol en la membrana celular interfiere en este proceso, generando membranas más neutras y más rígidas (Anel et al., 1990; Barman et al., 2006). Está descrito que las líneas tumorales difieren en la composición de las membranas plasmáticas comparada con las células normales y que esas diferencias pueden determinar la respuesta a las terapias. Se plantea pues la necesidad del estudio del llamado Lipidoma para mejorar la respuesta al combinarlo con terapias dirigidas (Wiśniewski et al., 2015; Zalba & ten Hagen, 2017). Además, las respuestas *in vitro* entre líneas celulares del mismo tipo histológico de cáncer pueden diferir debido a las diferencias en la composición de la membrana. Por ejemplo, PANC-1 y MIA PACA-2, ambas adenocarcinoma de páncreas, muestran diferencias relevantes en el perfil lipídico y de receptores proteicos (Watanabe, 2012). Esto podría tener relación con la respuesta a las inmunotoxinas en este estudio, en vista de que el mecanismo de acción de la GRNLY también depende de la composición lipídica de las membranas.

La diferencia en la respuesta frente a las inmunotoxinas entre las distintas líneas celulares en las cuales se identificó el antígeno Tn, podría radicar en que la escisión del segmento MUC1-N puede dar paso a la pérdida de eficacia de la terapia, lo que ha dado paso al desarrollo de anticuerpos que usan como blanco a MUC1-C (Panchamoorthy et al., 2018; Pichinuk et al., 2020). MUC1 presenta una alta diversidad estructural producto del empalme alternativo, la variabilidad en el número de VNTR y la glicosilación alterada (Ragupathi et al., 2005); lo que podría explicar la afinidad superior de las inmunotoxinas frente al anticuerpo IgM anti-Tn. Además, se conoce que la MUC1 derivada de tumores puede afectar el crecimiento de las células T (Agrawal et al., 1998) y proteger a las células transformadas de la muerte por las células NK y LT debido a una disminución de la adherencia para cumplir con la función efectora (van de Wiel-van Kemenade et al., 1993; Wilkie et al., 2008).

La línea control negativo de este estudio fue MDA-MB-231, de adenocarcinoma de mama, la cual no fue positiva para el reconocimiento del antígeno Tn por parte de ninguna inmunotoxina. En concordancia con ello, éstas tampoco aumentan la baja citotoxicidad de la GRNLY sobre esta línea celular.

Otro factor que influye en la respuesta inmune es la dependiente del estroma. Se ha descrito que especialmente en los tumores desmoplásicos, como es el caso del tumor generado a partir de la línea CAPAN-2, el estroma contribuye a la progresión, invasión, metástasis y quimiorresistencia y de los componentes del estroma, los fibroblastos asociados a tumor, contribuyen en gran medida (Norton et al., 2020). Estos modelos no pueden solventar esa dificultad, pero sería pertinente considerar ampliar los estudios sobre la relevancia de los componentes de la matriz extracelular, especialmente las células estelares pancreáticas activadas, que ya se ha descrito en cáncer de páncreas y los tumores xenoderivados de la línea CAPAN-2, PANC1 y MIA PACA-2, que juegan un rol decisivo en la respuesta inmune (Bolm et al., 2020; Gamradt et al., 2021). Asimismo, el paso siguiente sería usar un modelo murino humanizado adecuado para probar las inmunotoxinas con administración sistémica y demostrar que esas terapias desencadenan muerte inmunogénica.

Estos resultados nos permiten aseverar que la acción citotóxica de las inmunotoxinas, logró superar a la actividad de la GRNLY y esa función fue antígeno-específica.

Una vez que se pudo establecer la superioridad en cuanto a bioactividad de las inmunotoxinas en varias líneas celulares positivas para MUC1-Tn, quisimos indagar sobre el quinto objetivo, **estudiar el mecanismo de acción de las inmunotoxinas en líneas tumorales de cáncer que expresan el antígeno.**

En los primeros trabajos sobre la bioactividad de la GRNLY, los ensayos de citotoxicidad demostraron marcaje con Anexina-V, característico de la activación de la muerte celular mediante la vía apoptótica (Gamen et al., 1998; Pardo et al., 2001). Más tarde, la evidencia respaldó la capacidad de la GRNLY para activar predominantemente la vía intrínseca de la apoptosis, aunque otras vías como la necroptosis y la activación de esfingomielinasas contribuyen marginalmente también. (Aporta, 2014). Si bien el marcaje con Anexina-V ha sido empleado como un método típico para detectar apoptosis, éste también puede ser positivo en formas líticas de muerte celular como la necroptosis. Se ha probado que la necroptosis induce fagocitosis a partir de la externalización de PS generando señales de “cómeme” y que estructuras análogas a los cuerpos apoptóticos característicos de la apoptosis también son comunes a los dos tipos de muerte, llegando a generar señales de “encuétrame”

para atraer células del sistema inmune (Krysko et al., 2017; Shlomovitz et al., 2019; Zargarian et al., 2017).

El mecanismo de muerte que las inmunotoxinas activan sobre las líneas tumorales empleadas se analizó en primera instancia en ensayos en función del tiempo. Se pudo observar una cinética que mostró actividad lítica tras tan solo 30 minutos de exposición. Esto podría tener relación con una opsonización rápida del antígeno por un gran número de inmunotoxinas, lo que acercaría más rápida y eficientemente a la GRNLY a la membrana celular para que ejerza su función. La observación de la rápida aparición de un elevado porcentaje de fragmentos celulares que no marcaban para Anexina-V ni para 7-AAD tras exposición a las inmunotoxinas fue la primera indicación sobre un posible mecanismo necrótico en su mecanismo de acción. Esto nos hizo modificar las pautas clásicas de selección de la población o “gating” en los ensayos de citometría de flujo. El análisis de las imágenes de citometría de flujo que empleamos en este estudio tiene precedente en publicaciones previas donde se estudia la cinética de muerte celular empleando una metodología sin eliminar la población de “debris” (L. Jiang et al., 2016).

En relación con esta hipótesis y, a diferencia de lo que ocurre con la GRNLY, no se consiguió abolir la muerte inducida por las inmunotoxinas en dos líneas celulares con silenciamiento de BAK y BAX resistentes a la muerte apoptótica inducida a través de la vía intrínseca. Además, la inhibición de la muerte por Z-VAD-fmk, sólo o en combinación con inhibidores de la necroptosis, fue solamente parcial en el caso de las inmunotoxinas, indicando que, aparte del mecanismo apoptótico o necroptótico, también parecen activar un mecanismo netamente necrótico. Esto está en concordancia con la violenta desintegración de la membrana plasmática que se observa en la citometría de flujo (Green & Llambi, 2015).

Una estrategia para acercarnos más a dilucidar el mecanismo de acción sería el uso de protocolos específicos de citometría de flujo para separar las células que mueren por apoptosis temprana, tardía y necroptosis (L. Jiang et al., 2016).

Los mecanismos de acción aceptados de las inmunotoxinas se basan en dos conceptos, primero, el que desencadena la endocitosis y activación intracitoplasmática y segundo, el que concibe que la acción se irradia a células vecinas después de que el anticuerpo

reconozca su diana (Boni et al., 2020). En este estudio, el blanco de SM3 y AR20.5 está ubicado en los segmentos aberrantemente *O*-glicosilados de VNTR de MUC1-N. Siendo que hemos mostrado la superioridad citotóxica *in vitro* en varias líneas celulares, se podría dar el caso de que las inmunotoxinas sean endocitadas pero, en cualquier caso, la acción de la GRNLY debe ser por desestabilización de la membrana, ya sea de la plasmática o del correspondiente endosoma (Anderson et al., 2003). Por otro lado, la positividad de un segmento de la población celular tanto al marcaje con Anexina-V como al marcaje con 7-AAD, está en relación con las evidencias de que tanto en la apoptosis como en la necroptosis la fosfatidilserina se trasloca en la membrana (Krysko et al., 2017; Shlomovitz et al., 2019; Zargarian et al., 2017). Por otra parte, en los estudios histológicos de los tumores derivados de HT-29 y tratados con GRNLY se han observado catástrofes mitóticas. Sin embargo, al haberse observado en este contexto *in vivo*, no queda claro si es un efecto de la propia GRNLY o de células inmunitarias infiltrantes en el tumor.

Una vez que establecimos tanto la capacidad de reconocimiento del antígeno como la capacidad citotóxica frente a las diferentes líneas celulares, **estudiamos la direccionalidad de la molécula a través de ensayos *in vivo* mediante administración sistémica.**

El cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer se inició con el diseño de una estrategia terapéutica de ingeniería genética dirigida generando el primer anticuerpo recombinante monoclonal humanizado aprobado por la FDA que reconoce el subdominio IV de la fracción externa del receptor HER2, denominado trastuzumab (Schaller et al., 1999). Actualmente se sabe que el uso de esa terapia puede generar resistencia al tratamiento en el 60% de los casos. Se han desarrollado varias estrategias para subsanar este problema y una de ellas se basa en una inmunotoxina que combina una molécula de trastuzumab con 3,5 de emtansine-DM1, una droga citotóxica que inhibe el ensamblaje de microtúbulos, produce alteraciones en la mitosis, induce apoptosis y eventualmente, la muerte de las células (Barok, et al., 2014; Bon et al., 2020). Es decir, que la estrategia inmunológica de desarrollo de inmunoconjugados citotóxicos se está empleando en humanos y ha dado buenos resultados.

En el modelo *in vivo* de xenotransplante de adenocarcinoma de páncreas CAPAN-2 en ratones atímicos se ha demostrado que las inmunotoxinas anti-Tn son capaces de direccionar la GRNLY hacia el tumor tras inyección sistémica, efecto que no consigue la GRNLY

por sí sola. Esta respuesta se acompañó de una aparentemente buena tolerancia al tratamiento por parte de los animales de experimentación; sin embargo, es necesario realizar pruebas más exhaustivas que demuestren ausencia de toxicidad. En los animales tratados con SM3GRNLY se pudo alcanzar una inhibición del crecimiento tumoral del 42% con respecto al grupo control y, aunque sólo fue posible tratar un ratón con AR20.5GRNLY, los prometedores resultados de un 60% de inhibición del crecimiento tumoral, reafirman esta estrategia terapéutica con perspectivas a su uso en humano. Los hallazgos histológicos concuerdan con la morfología celular de la apoptosis en concordancia con las imágenes de los núcleos teñidos con DAPI.

En este trabajo utilizamos un modelo NRG humanizado para analizar esta hipótesis en un modelo más autólogo posible. En el xenotransplante con el adenocarcinoma colorrectal HT-29 se pudo observar la inhibición del crecimiento tumoral en los tumores tratados con GRNLY intratumoral de forma estadísticamente significativa. El análisis histopatológico mostró celularidad disminuída asociada a morfología típica de apoptosis, indicios de infiltración linfocitaria además de positividad en la tinción de Caspasa-3 activada. Todos estos hallazgos, en esta primera aproximación, nos permiten aseverar que este modelo es adecuado para estudiar esta posibilidad.

El modelo de xenotransplantes de tumores humanos en ratones NUDE es un modelo heterólogo. La GRNLY por su parte, es una proteína humana que no tiene homólogo en ratón. Aunque en estudios anteriores se había observado infiltración de células NK de ratones atílmicos en tumores humanos tratados por inyección intratumoral de GRNLY (Al-Wasaby et al., 2015), el modelo heterólogo no nos permitía asegurar que este efecto fuera debido a un efecto inmunogénico de la muerte tumoral inducida por la GRNLY. El modelo NRG humanizado no permite la supervivencia o expresión de las células NK humanas por ausencia de expresión de IL-15 humana. Además, exhiben deficiencia de la respuesta de los macrófagos humanos por motivos similares (Takenaka et al., 2007). Cabe destacar, sin embargo, que en el modelo NRG se observó una organización linfoide en la periferia del tumor, indicando una activación de la respuesta inmune adaptativa antitumoral tras tratamiento con GRNLY. Queda pendiente demostrar que ese infiltrado linfocitario, solamente observado por histología de tejido teñido con H/E corresponde a linfocitos y si éstos son más bien efectores citotóxicos CD8+ o “helper” CD4+. Seguidamente, deberán realizarse experimentos similares en el modelo NRG humanizado, pero usando inyección sistémica de las inmunotoxinas. Ha quedado claramente demostrado en un estudio anterior (Ibáñez-Pérez et al., 2019) y en este estudio, la

direccionalidad y eficacia antitumoral de las inmunotoxinas basadas en GRNLY. Si demostráramos además que el tratamiento con GRNLY o con sus inmunotoxinas es inmunogénico y coopera con el sistema inmunitario en la erradicación de los tumores, se allanaría el camino para el inicio de ensayos clínicos.

MUC1 se encuentra segunda posición en la lista de blancos terapéuticos más prometedores, según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. es el precursor de Tn (Panchamoorthy et al., 2018). A pesar del gran potencial terapéutico, aún no se ha aprobado ninguna terapia basada en MUC1 debido a la complejidad de la respuesta inmune asociada. Hasta el año 2019 se aprobaron 3 inmunotoxinas para su utilización clínica y todas dirigidas a tumores hematológicos, siendo que los tumores sólidos corresponden al 80% de todas las cánceres (Kim et al., 2019). Por consiguiente, es necesario seguir desarrollando terapias como las que abordamos en este estudio. Por otra parte, en un reciente estudio preclínico se ha demostrado la eficacia antitumoral de la inmunotoxina formada por el anticuerpo anti-MUC1 DMBSF3 conjugado con la exotoxina de *Pseudomonas* PE38 frente a tumores pancreáticos xenotransplantados en ratones atímicos o SCID (Pichinuk et al., 2020). Cabe destacar que el problema que suelen presentar las inmunotoxinas basadas en toxinas bacterianas es su elevado potencial inmunogénico, lo cual acaba inactivando el tratamiento por respuesta inmune del paciente contra la propia inmunotoxina. Nuestra aproximación no tendría este problema, ya que la GRNLY es una proteína humana que sería tolerada por los pacientes.

En cuanto a estudios clínicos previos realizados con los anticuerpos usados en este estudio, se llevó a cabo un estudio de fase I con AR20.5, llamado BrevaRex® comercialmente, que demostró su ausencia de toxicidad, pero al ser un anticuerpo monoclonal de ratón se observó la generación de anticuerpos anti-ratón y anti-idiotipo, lo cual reducía su capacidad terapéutica (de Bono et al., 2004). Posteriormente, se generó el anticuerpo humanizado anti MUC-1 AS1402 que llegó hasta fase II de experimentación clínica en tumores de mama en 2011 (Ibrahim et al., 2011). Además, AR20.5 se combinó con anticuerpos anti-PD-L1 y con el activador inmunitario poli ICLC, demostrando un buen perfil terapéutico en un modelo de ratón transgénico por MUC1 humano transplantado con tumores pancreáticos (Mehla et al., 2018).

Todos estos resultados, junto con los presentados en este trabajo, son alentadores y apuntan hacia una futura aplicación clínica de los anticuerpos anti-Tn-MUC1 y de sus inmunotoxinas derivadas.

En estudios previos, la GRNLY producida en *E. coli* contenía LPS, un inmunógeno muy potente, que previamente no fue posible eliminar de la GRNLY y que sería incompatible con su utilización clínica. Las proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* no contienen ese peligroso contaminante. Sin embargo, se ha reportado que las proteínas recombinantes expresadas por *P.pastoris* pueden presentar estructuras de glicanos similares a los de *Cándida albicans* y *Candida quilliermondii* (Delic et al., 2013; Nett et al., 2013). Esto, aunque no produzca toxicidad, podría generar una respuesta inmunitaria que redujera la potencia terapéutica de estas proteínas y es un aspecto a analizar en el futuro.

5. CONCLUSIONES

- Las mejoras en el protocolo de producción y purificación en el sistema de expresión *P.pastoris* basado en la cepa X33 permitieron incrementar el rendimiento de la producción de SM3GRNLY. A pesar de haber incrementado el rendimiento de AR20.5GRNLY, el sistema de expresión usado parece no ser el adecuado para esta inmunotoxina.
- La introducción de electroporación con PEF con la finalidad de incrementar el rendimiento de la producción de SM3GRNLY fue exitoso, generándose la proteína iSM3GRNLY, con características similares a la secretada. La producción de iAR20.5GRNLY se debería complementar con un protocolo de purificación más estricto que elimine los contaminantes.
- Se optimizó un protocolo con la finalidad de estabilizar las inmunotoxinas para almacenamiento a largo plazo usando congelación en presencia de glicerol.
- La liofilización mostró ser la técnica óptima para conservación de todas las proteínas recombinantes.
- Las inmunotoxinas demostraron su superioridad para reconocer el antígeno Tn en las líneas celulares en comparación con un anticuerpo comercial anti-Tn y este reconocimiento se asoció a respuesta citotóxica *in vitro*.
- De manera general, la citotoxicidad de las inmunotoxinas anti-Tn fue superior frente a las diferentes líneas celulares positivas para la expresión de Tn comparada con la GRNLY recombinante sola.
- Las evidencias sugieren que las inmunotoxinas actúan mediante la combinación de varios mecanismos de muerte: apoptosis, necroptosis y necrosis. Es necesario seguir profundizando sobre los marcadores moleculares asociados a cada tipo de muerte y usar técnicas que permitan diferenciar cada tipo de muerte celular.

- Las inmunotoxinas demostraron direccionalidad del tratamiento tras inyección sistémica, reduciendo el volumen tumoral de los xenotransplantes de adenocarcinoma de páncreas CAPAN-2 en ratones atímicos, mientras que la GRNLY recombinante sola no fue eficaz. Este resultado es estadísticamente significativo en el caso de SM3GRNLY, mientras que en el caso de AR20.5GRNLY sería necesario realizar experimentos en un número significativo de animales.
- La reducción del tamaño tumoral se asoció a inducción de apoptosis en el tejido tumoral, demostrado mediante tinción de la morfología nuclear con DAPI y tinción inmunohistoquímica de Caspasa-3 activada.
- Los resultados con el modelo NRG humanizado mostraron que la inyección intratumoral de la GRNLY recombinante en un xenotransplante del adenocarcinoma de colon HT-29, resultó en una reducción significativa del volumen tumoral e inducción de apoptosis, demostrando que este modelo sería válido para estudiar el carácter inmunogénico del tratamiento con GRNLY o con sus inmunotoxinas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2011). *Ficha técnica del Glicerol* (pp. 1–4). pp. 1–4. Retrieved from https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/67876/67876_ft.pdf
- Aggarwal, P., & Kehoe, S. (2010). Serum tumour markers in gynaecological cancers. *Maturitas*, 67(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.04.017>
- Agrawal, B., Gupta, N., & Konowalchuk, J. D. (2018). MUC1 mucin: A putative regulatory (checkpoint) molecule of T Cells. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02391>
- Agrawal, B., Krantz, M. J., Reddish, M. A., & Longenecker, B. M. (1998). Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nature Medicine*, 4(1), 43–49. <https://doi.org/10.1038/nm0198-043>
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- Al-Wasaby, S., De Miguel, D., Aporta, A., Naval, J., Conde, B., Martinez-Lostao, L., & Anel, A. (2015). In vivo potential of recombinant granulysin against human tumors. *OncolImmunology*, 4(9). Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edspsc&AN=000360239800017&site=eds-live>
- Alpert, M. E., Uriel, J., & de Nechaud, B. (1968). Alpha-1 fetoglobulin in the diagnosis of human hepatoma. *The New England Journal of Medicine*, 278(18), 984–986. <https://doi.org/10.1056/NEJM196805022781804>
- Alwasaby, S. (2014). *In vivo study of granulysin as a new immunotherapeutical agent against tumor development*. University of Zaragoza.
- Amrutkar, M., Aasrum, M., Verbeke, C. S., & Gladhaug, I. P. (2019). Secretion of fibronectin by human pancreatic stellate cells promotes chemoresistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5803-1>
- Andersen, L. M. K., Wegner, C. S., Simonsen, T. G., Huang, R., Gaustad, J. V., Hauge, A., ...

- Rofstad, E. K. (2017). Lymph node metastasis and the physicochemical microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts. *Oncotarget*, 8(29), 48060–48074. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18231>
- Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A., & Eisenberg, D. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 325(2), 355–365. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01234-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01234-2)
- Anel, A., Naval, J., Desportes, P., González, B., Uriel, J., & Piñeiro, A. (1992). Increased cytotoxicity of polyunsaturated fatty acids on human tumoral B and T-cell lines compared with normal lymphocytes. *Leukemia Research*, 6(7 (July)), 680–688.
- Anel, A., & Kleinfeld, A. M. (1993). Tyrosine phosphorylation of a 100-kDa protein is correlated with cytotoxic T-lymphocyte function. Evidence from cis unsaturated fatty acid and phenylarsineoxide inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(23), 17578–17587.
- Anel, Alberto. (2018). Cap.9. In A. Antón, A. Anel, L. Martínez-Lostao, J. Pardo, & R. Pazo (Eds.), *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer* (1 era.). Retrieved from <https://amazingbooks.es/inmunologia-tumoral-e-inmunoterapia-del-cancer>
- Anel, Alberto, Naval, J., González, B., Torres, J. M., Mishal, Z., Uriel, J., & Piñeiro, A. (1990). Fatty acid metabolism in human lymphocytes. I. Time-course changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blastic transformation of peripheral blood lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1044(3), 323–331. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90076-A](https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90076-A)
- Aporta, A. (2013). *Mecanismos de muerte celular implicados en la interacción patógeno-huésped: la granulicina como péptido antitumoral y el papel de la apoptosis en la inmunidad frente a M.tuberculosis*. Universidad de Zaragoza.
- Aporta, Adriana, Catalán, E., Galán-Malo, P., Ramírez-Labrada, A., Pérez, M., Azaceta, G., ... Anel, A. (2014). Granulysin induces apoptotic cell death and cleavage of the autophagy regulator Atg5 in human hematological tumors. *Biochemical Pharmacology*, 87(3), 410–423. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.004>
- Arguelles Arias, A., Joris, B., & Fickers, P. (2014). Dual mode of action of amylolysin: a type-B lantibiotic produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *Protein and Peptide Letters*, 21(4), 336–340. <https://doi.org/10.2174/09298665113206660102>

- Barman, H., Walch, M., Latinovic-Golic, S., Dumrese, C., Dolder, M., Groscurth, P., & Ziegler, U. (2006). Cholesterol in negatively charged lipid bilayers modulates the effect of the antimicrobial protein granulysin. *Journal of Membrane Biology*, 212(1), 29–39. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0040-3>
- Barok, M., Joensuu, H., & Isola, J. (2014). Trastuzumab emtansine: Mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Research*, 16(2). <https://doi.org/10.1186/bcr3621>
- Beatty, G. L., & Gladney, W. L. (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(4), 687–692. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860>
- Besmer, D. M., Curry, J. M., Roy, L. D., Tinder, T. L., Sahraei, M., Schettini, J., ... Mukherjee, P. (2011). Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis. *Cancer Research*, 71(13), 4432–4442. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4439>
- Bharucha, N., Liu, Y., Papanikou, E., McMahon, C., Esaki, M., Jeffrey, P. D., ... Glick, B. S. (2013). Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII. *Molecular Biology of the Cell*, 24(21), 3406–3419. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-04-0185>
- Bolm, L., Zghurskyi, P., Lapshyn, H., Petrova, E., Zemskov, S., Vashist, Y. K., ... Wellner, U. F. (2020). Alignment of stroma fibers, microvessel density and immune cell populations determine overall survival in pancreatic cancer - An analysis of stromal morphology. *PLoS ONE*, 15(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234568>
- Bon, G., Pizzuti, L., Laquintana, V., Loria, R., Porru, M., Marchiò, C., ... Vici, P. (2020). Loss of HER2 and decreased T-DM1 efficacy in HER2 positive advanced breast cancer treated with dual HER2 blockade: the SePHER Study. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01797-3>
- Boni, V., Sharma, M. R., & Patnaik, A. (2020). The Resurgence of Antibody Drug Conjugates in Cancer Therapeutics: Novel Targets and Payloads. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (40), e58–e74. https://doi.org/10.1200/edbk_281107
- Boraston, A. B., Sandercock, L. E., Warren, R. A. J., & Kilburn, D. G. (2003). O-glycosylation of a recombinant carbohydrate-binding module mutant secreted by *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 5(1), 29–36. <https://doi.org/10.1159/000068721>

- Bouillez, A., Rajabi, H., Jin, C., Samur, M., Tagde, A., Alam, M., ... Kufe, D. (2017). MUC1-C integrates PD-L1 induction with repression of immune effectors in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, *36*(28), 4037–4046. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.47>
- Brady, J. R., Whittaker, C. A., Tan, M. C., Kristensen, D. L., Ma, D., Dalvie, N. C., ... Love, J. C. (2020). Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain. *Biotechnology and Bioengineering*, *117*(2), 543–555. <https://doi.org/10.1002/bit.27209>
- Brendel, C., Rio, P., & Verhoeven, E. (2020). Humanized mice are precious tools for evaluation of hematopoietic gene therapies and preclinical modeling to move towards a clinical trial. *Biochemical Pharmacology*, *174*, 113711. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113711>
- Burchell, J., Gendler, S., Taylor-papadimitriou, J., Girling, A., Lewis, A., Millis, R., & Lampert, D. (1987). Development and Characterization of Breast Cancer Reactive Monoclonal Antibodies Directed to the Core Protein of the Human Milk Mucin. *Cancer Research*, *47*(17), 5476–5482. Retrieved from <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/47/20/5476.full.pdf>
- Cagnoni, A. J., Pérez Sáez, J. M., Rabinovich, G. A., & Mariño, K. V. (2016). Turning-off signaling by siglecs, selectins, and galectins: Chemical inhibition of glycan-dependent interactions in cancer. *Frontiers in Oncology*, *6*(MAY), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00109>
- Carson, D. D. (2008, July 8). The cytoplasmic tail of MUC1: A very busy place. *Science Signaling*, Vol. 1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.127pe35>
- Carvajal-Gonzalez, J. M., Balmer, S., Mendoza, M., Dussert, A., Collu, G., Roman, A. C., ... Mlodzik, M. (2015). The clathrin adaptor AP-1 complex and Arf1 regulate planar cell polarity in vivo. *Nature Communications*, *6*(6751). <https://doi.org/10.1038/ncomms7751>
- Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., & Delannoy, P. (2010). Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research*, Vol. 12, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1186/bcr2577>
- Cereghino, G. P., & Cregg, J. M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, *10*(5), 422–427. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00004-x](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00004-x)
- Chaika, N. V., Gebregiworgis, T., Lewallen, M. E., Purohit, V., Radhakrishnan, P., Liu, X., ...

- Singh, P. K. (2012). MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(34), 13787–13792. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203339109>
- Chase, H. A. (1994). Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends in Biotechnology*, *12*(8), 296–303. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90046-9)
- Chowdhury, P. S., Viner, J. L., Beers, R., & Pastan, I. (1998). Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(2), 669–674. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.669>
- Clayberger, C., Finn, M. W., Wang, T., Saini, R., Wilson, C., Barr, V. A., ... Krensky, A. M. (2012). 15 kDa Granulysin Causes Differentiation of Monocytes to Dendritic Cells but Lacks Cytotoxic Activity. *The Journal of Immunology*, *188*(12), 6119–6126. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200570>
- Clayberger, C., Hanson, D. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M., Modlin, R. L., Teitelbaum, R., ... Modlin, R. L. (2000). Granulysin, a T Cell Product, Kills Bacteria by Altering Membrane Permeability. *The Journal of Immunology*, *165*(12), 7102–7108. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.7102>
- Corfield, A. P., & Berry, M. (2015). Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(7), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.04.004>
- Cregg, J. (1993). The Pichia System. Retrieved from Keck Graduate Institute, Claremont, Calif website: https://pichia.com/wp-content/uploads/2012/07/pichia_system.pdf
- Crespo, Â. C., Mulik, S., Dotiwala, F., Ansara, J. A., Sen Santara, S., Ingersoll, K., ... Lieberman, J. (2020). Decidual NK Cells Transfer Granulysin to Selectively Kill Bacteria in Trophoblasts. *Cell*, 1125–1139. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.019>
- Criscitello, C., Viale, G., & Curigliano, G. (2019). Peptide vaccines in early breast cancer. *Breast*, *44*, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.02.003>
- Croce, M. V., Colussi, A. G., Price, M. R., & Segal-Eiras, A. (1999). Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549). *Pathology Oncology Research : POR*, *5*(3), 197–204.

<https://doi.org/10.1053/paor.1999.0212>

- Daly, R., & Hearn, M. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119–138. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>
- de Bono, J. S., Rha, S. Y., Stephenson, J., Schultes, B. C., Monroe, P., Eckhardt, G. S., ... Tolcher, A. W. (2004). Phase I trial of a murine antibody to MUC1 in patients with metastatic cancer: Evidence for the activation of humoral and cellular antitumor immunity. *Annals of Oncology*, 15(12), 1825–1833. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh472>
- Deckert, P. M. (2009). Current Constructs and Targets in Clinical Development for Antibody-Based Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, Vol. 10, pp. 158–175. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/138945009787354502>
- Delemotte, L., & Tarek, M. (2012). Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation. *Journal of Membrane Biology*, 245(9), 531–543. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9434-6>
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2013). The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 872–914. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12020>
- Dotiwala, F., Mulik, S., Polidoro, R. B., Ansara, J. A., Walch, M., Gazzinelli, R. T., ... Diseases, I. (2016). Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat.Med.*, 22(2), 210–216. <https://doi.org/10.1038/nm.4023.Killer>
- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., ... Liu, S. Q. (2016). Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394296-8.00007-5>
- Edry-Botzer, L., & Gerlic, M. (2017). Exploding the necroptotic bubble. *Cell Stress*, 1(2), 107–109. <https://doi.org/10.15698/cst2017.11.112>
- Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., DeTitta, G. T., Dekker, N., & Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal.Biochem.*, 357, 289–298.

- Fickers, P. (2014). *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(3), 354–363. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2268/177756>
- Fu, C., Zhao, H., Wang, Y., Cai, H., Xiao, Y., Zeng, Y., & Chen, H. (2016). Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA Immune Response Genetics*, 88(6), 275–286. <https://doi.org/10.1111/tan.12900>
- Fujita, R., Hamano, H., Kameda, Y., Arai, R., Shimizu, T., Ota, M., ... Takahata, M. (2019). Breast cancer cells expressing cancer-associated sialyl-Tn antigen have less capacity to develop osteolytic lesions in a mouse model of skeletal colonization. *Clinical & Experimental Metastasis*, 36(6), 539–549. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-09999-6>
- Gaidzik, N., Westerlind, U., & Kunz, H. (2013). The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens. *Chemical Society Reviews*, 42(10), 4421–4442. <https://doi.org/10.1039/c3cs35470a>
- Gamen, S., Hanson, D., Kaspar, A., Naval, J., Krensky, A., & Anel, A. (1998). of at Least Two Distinct Pathways Granulysin-Induced Apoptosis. I. Involvement. *J Immunol References*, 161, 1758–1764. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/161/4/http://www.jimmunol.org/content/161/4/1758.full#ref-list-1>
- Gamradt, P., De la Fourchardière, C., & Hennino, A. (2021). Stromal Protein-Mediated Immune Regulation in Digestive Cancers. *Cancers*, 13(146), 1–23. <https://doi.org/10.33909/cancers13010146>
- Ganeva, V., Galutzov, B., Angelova, B., & Suckow, M. (2018). Electroinduced Extraction of Human Ferritin Heavy Chain Expressed in *Hansenula polymorpha*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(4), 1286–1307. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2627-9>
- Ganeva, V., Stefanova, D., Angelova, B., Galutzov, B., Velasco, I., & Arévalo-Rodríguez, M. (2015). Electroinduced release of recombinant β -galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 211, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.418>
- Garner, A. L. (2019, October 1). Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, pp. 7917–7929. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10067-y>

- Gold, P., & Freedman, S. O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *The Journal of Experimental Medicine*, 122(3), 467–481.
<https://doi.org/10.1084/jem.122.3.467>
- Gong, Y.-N., Guy, C., Olauson, H., Ulrich Becker, J., Yang, M., Fitzgerald, P., ... Green, D. R. (2017). ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell*, 169(2), 286–300.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.020>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Guerrero-Ochoa, P., Aguilar-Machado, D., Macías, J., Ibáñez-Pérez, R., Hurtado-Guerrero, R., & Anel, A. (2020). Production of a Granulysin-Based , Tn-Targeted Cytolytic Immunotoxin Using Pulsed Electric Field Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6165), 1–13.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haque, M. A., Chen, J., Aldred, P., & Adhikari, B. (2015). Drying and denaturation characteristics of whey protein isolate in the presence of lactose and trehalose. *Food Chemistry*, 177, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.064>
- Häuselmann, I., & Borsig, L. (2014). Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Frontiers in Oncology*, 4 MAR(February), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00028>
- Hirschey, M. D., Deberardinis, R. J., Diehl, A. M. E., Janice, E., Frezza, C., Green, M. F., ... Gaslini, I. G. (2016). Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol.*, 1–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.10.002>
- Ibáñez-Pérez, R., Guerrero-Ochoa, P., Al-Wasaby, S., Navarro, R., Tapia-Galisteo, A., De Miguel, D., ... Anel, A. (2019). Anti-tumoral potential of a human granulysin-based, CEA-targeted cytolytic immunotoxin. *Oncolmmunology*, 8(11), 1–11.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1641392>
- Ibrahim, N. K., Yariz, K. O., Bondarenko, I., Manikhas, A., Semiglazov, V., Alyasova, A., ... Pegram, M. (2011). Randomized phase II trial of letrozole plus Anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(21), 6822–6830. <https://doi.org/10.1158/1078->

- Invitrogen. (2014). *PichiaPink™ Yeast Expression System*. 86. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiapink_expression_system_man.pdf
<https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-expression/yeast-protein-expression/pichiapink-yeast-expression-systems.html>
- Irani, Z., Kerkhoven, E., Shojaosadati, S., & Nielsen, J. (2016). Genome-scale metabolic model of *Pichia pastoris* with native and humanized glycosylation of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(5), 961–969. <https://doi.org/10.1002/bit.25863>
- jax.org. (2021). The Jackson Laboratory.
- Jiang, E., Yan, T., Xu, Z., & Shang, Z. (2019). Tumor Microenvironment and Cell Fusion. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5013592>
- Jiang, L., Tixeira, R., Caruso, S., Atkin-Smith, G. K., Baxter, A. A., Paone, S., ... Poon, I. K. H. (2016). Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nature Protocols*, 11(4), 655–663. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.028>
- Jongstra, J., Schall, T. J., Dyer, B. J., Clayberger, C., Jorgensen, J., Davis, M. M., & Krensky, A. M. (1987). The isolation and sequence of a novel gene from a human functional T cell line. *Journal of Experimental Medicine*, 165(March), 601–614.
- Ju, T., Otto, V. I., & Cummings, R. D. (2011). The Tn antigen, a structural simplicity and biological complexity. *Angewandte Chemie - International Edition*, Vol. 50, pp. 1770–1791. <https://doi.org/10.1002/anie.201002313>
- Kapingidza, A. B., Kowal, K., & Chruszcz, M. (2020). Antigen-Antibody Complexes. *Subcellular Biochemistry*, 94, 465–497. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_19
- Kaplan, H. (1929). The Aschheim-Zondek hormone test for pregnancy. *California and Western Medicine*, XXXI(6), 412–413.
- Karsten, U., Serttas, N., Paulsen, H., Danielczyk, A., & Goletz, S. (2004). Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumor-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). *Glycobiology*, 14(8), 681–692. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh090>
- Kaspar, A. A., Okada, S., Kumar, J., Poulain, F. R., Drouvalakis, K. A., Kelekar, A., ... Krensky,

- A. M. (2001). A Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin. *The Journal of Immunology*, *167*(1), 350–356. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.350>
- Katayose, Y., Kudo, T., Suzuki, M., Shinoda, M., Saijyo, S., Sakurai, N., ... Matsuno, S. (1996). MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: Inhibition of xenografted human bile duct carcinoma growth. *Cancer Research*, *56*(18), 4205–4212.
- Kaushik, N., Rohila, D., Arora, U., Raut, R., Lamminmäki, U., Khanna, N., & Batra, G. (2016). Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology*, *16*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0243-3>
- Khlebtsov, B. N., & Khlebtsov, N. G. (2011). On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid Journal*, *73*(1), 118–127. <https://doi.org/10.1134/S1061933X11010078>
- Kim, J.-S., Jun, S.-Y., & Kim, Y.-S. (2019). Critical Issues in the Development of Immunotoxins for Anticancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.037>
- Kishi, A., Takamori, Y., Ogawa, K., Takano, S., Tomita, S., Tanigawa, M., ... Fujita, S. (2002). Differential expression of granulysin and perforin by NK cells in cancer patients and correlation of impaired granulysin expression with progression of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *50*(11), 604–614. <https://doi.org/10.1007/s002620100228>
- Kodama, H., Suzuki, M., Katayose, Y., Shinoda, M., Sakurai, N., Takemura, S.-I., ... Kudo, T. (2002). Specific and effective targeting cancer immunotherapy with a combination of three bispecific antibodies. *Immunology Letters*, *81*, 99–106. Retrieved from www.elsevier.com/locate/
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., & Miklavčič, D. (2019). Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. *Annual Review of Biophysics*, *48*, 63–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118>
- Kowalski, M., Guindon, J., Brazas, L., Moore, C., Entwistle, J., Cizeau, J., ... MacDonald, G. C. (2012). A Phase II Study of Oportuzumab Monatox: An Immunotoxin Therapy for Patients

- with Noninvasive Urothelial Carcinoma In Situ Previously Treated with Bacillus Calmette-Guerin. *Journal of Urology*, 188(5), 1712–1718.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.07.020>
- Kreitman, R. J., Dearden, C., Zinzani, P. L., Delgado, J., Karlin, L., Robak, T., ... Giles, F. (2018). Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leukemia*, 32(8), 1768–1777. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0210-1>
- Kreitman, R. J., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E. S., Conlon, K. C., Steinberg, S. M., Wilson, W., ... Pastan, I. (2016). Complete Remissions of Adult T-cell Leukemia with Anti-CD25 Recombinant Immunotoxin LMB-2 and Chemotherapy to Block Immunogenicity. *Clinical Cancer Research*, 22(2), 310 LP – 318. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1412>
- Krensky, A. M., & Clayberger, C. (2009). Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*, 73(3), 193–198. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01218.x>.Biology
- Krysko, O., Aaes, T. L., Kagan, V. E., D'Herde, K., Bachert, C., Leybaert, L., ... Krysko, D. V. (2017). Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunological Reviews*, 280(1), 207–219. <https://doi.org/10.1111/imr.12583>
- Kumar, A., Bhakuni, K., & Venkatesu, P. (2019). Strategic planning of proteins in ionic liquids: Future solvents for the enhanced stability of proteins against multiple stresses. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(42), 23269–23282.
<https://doi.org/10.1039/c9cp04772g>
- Lamosa, P., Gonçalves, L. G., Rodrigues, M. V., Martins, L. O., Raven, N. D. H., & Santos, H. (2006). Occurrence of 1-glycerol-1-myoinositol phosphate in hyperthermophiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6169–6173.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00852-06>
- Lech, G., Słotwiński, R., Słodkowski, M., & Krasnodębski, I. W. (2016). Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology*, 22(5), 1745–1755. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i5.1745>
- Lettau, M., Dietz, M., Dohmen, K., Leippe, M., Kabelitz, D., & Janssen, O. (2019). Granulysin species segregate to different lysosome-related effector vesicles (LREV) and get mobilized by either classical or non-classical degranulation. *Molecular Immunology*, 107(December 2018), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.031>

- Liu, L., Gomathinayagam, S., Hamuro, L., Prueksaritanont, T., Wang, W., Stadheim, T. A., & Hamilton, S. R. (2013). The impact of glycosylation on the pharmacokinetics of a TNFR2:Fc fusion protein expressed in glycoengineered *pichia pastoris*. *Pharmaceutical Research*, 30(3), 803–812. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0921-3>
- Lopes, M., Oliveira, C., Domingues, L., Mota, M., & Belo, I. (2014). Enhanced heterologous protein production in *Pichia pastoris* under increased air pressure. *Biotechnology Progress*, 30(5), 1040–1047. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/btpr.1964>
- Loureiro, L. R., Carrascal, M. A., Barbas, A., Ramalho, J. S., Novo, C. Delannoy, P., Videira, P. A., ... Videira, P. A. (2015). Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens. *Biomolecules*, 5(3), 1783–1809. <https://doi.org/10.3390/biom5031783>
- Lucas, T. G., Gomes, C. M., & Henriques, B. J. (2019). Thermal shift and stability assays of disease-related misfolded proteins using differential scanning fluorimetry. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1873, pp. 255–264). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8820-4_16
- Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction The Current State of Cancer Research. *Cell*, 136(5), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024>
- Maeda, T., Hiraki, M., Jin, C., Rajabi, H., Tagde, A., Alam, M., ... Kufe, D. (2018). MUC1-C Induces PD-L1 and Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*, 78(1), 205 LP – 215. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1636>
- Maged, M., & Ayman, A. E. (2012). Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology. In *Structure and Function of Food Engineering* (pp. 275–306). <https://doi.org/10.5772/48678>
- Maletzki, C., Bock, S., Fruh, P., Macius, K., Witt, A., Prall, F., & Linnebacher, M. (2020). NSG mice as hosts for oncological precision medicine. *Laboratory Investigation*, 100(1), 27–37. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0298-6>
- Marco-Brualla, J., Al-Wasaby, S., Soler, R., Romanos, E., Conde, B., Justo-Méndez, R., ... Anel, A. (2019). Mutations in the ND2 subunit of mitochondrial complex I are sufficient to confer increased tumorigenic and metastatic potential to cancer cells. *Cancers*, 11(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers11071027>
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is

- a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1545–1556. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1545>
- Martinez-Lostao, L., De Miguel, D., Al-Wasaby, S., Gallego-Lleyda, A., & Anel, A. (2015). Death ligands and granulysin: Mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities. *Immunotherapy*, Vol. 7, pp. 883–898. <https://doi.org/10.2217/imt.15.56>
- Martínez-Sáez, N., Castro-López, J., Valero-González, J., Madariaga, D., Compañón, I., Somovilla, V. J., ... Corzana, F. (2015). Deciphering the Non-Equivalence of Serine and Threonine O-Glycosylation Points: Implications for Molecular Recognition of the Tn Antigen by an anti-MUC1 Antibody. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(34), 9830–9834. <https://doi.org/10.1002/anie.201502813>
- Martínez-Sáez, N., Peregrina, J. M., & Corzana, F. (2017). Principles of mucin structure: Implications for the rational design of cancer vaccines derived from MUC1-glycopeptides. *Chemical Society Reviews*, 46(23), 7154–7175. <https://doi.org/10.1039/c6cs00858e>
- Martínez, J. M., Luengo, E., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2017). C-phycoerythrin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. *Food Research International*, 99, 1042–1047. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.029>
- Maycock, C., Mendes, M., Lamosa, P., Santos, H., & Quininha, T. (2007). Patent No. PT103442A. Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/b3/b0/61/c6baa0766cf5d3/PT103442A.pdf>
- Medeiros, A., Berois, N., Incerti, M., Bay, S., Franco Fraguas, L., & Osinaga, E. (2013). A Tn antigen binding lectin from *Myrsine coriacea* displays toxicity in human cancer cell lines. *Journal of Natural Medicines*, 67(2), 247–254. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0671-x>
- Mehla, K., Tremayne, J., Grunkemeyer, J. A., O'Connell, K. A., Steele, M. M., Caffrey, T. C., ... Hollingsworth, M. A. (2018). Combination of mAb-AR20.5, anti-PD-L1 and Poly(I)C inhibits tumor progression and prolongs survival of MUC1.Tg mice challenged with pancreatic tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(3), 445–457. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2095-7>
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2017). How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of

- stabilization in relation to stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.024>
- Miotto, M., Olimpieri, P. P., Di Rienzo, L., Ambrosetti, F., Corsi, P., Lepore, R., ... Milanetti, E. (2019). Insights on protein thermal stability: A graph representation of molecular interactions. *Bioinformatics*, 35(15), 2569–2577. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1011>
- Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(4), 911–917. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0389-0>
- Moreau R, Dausset J, Bernard J, M. J. (1957). Anémie hémolytique acquise avec polyagglutinabilité des hématies par un nouveau facteur présent dans le sérum humain normal anti-Tn [Acquired hemolytic anemia with polyagglutinability of erythrocytes by a new factor present in normal blood]. *Bull Mem Soc Med Hop Paris.*, 73(20–21), 569–587.
- Mosquera-Vivas, E. S., Ayala-Aponte, A. A., Serna-Cock, L., Mosquera-Vivas, E. S., Ayala-Aponte, A. A., & Serna-Cock, L. (2019). Ultrasonido y Deshidratación Osmótica como Pretratamientos a la Liofilización de Melón (*Cucumis melo* L.). *Información Tecnológica*, 30(3), 179–188. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000300179>
- Movahedin, M., Brooks, T. M., Supekar, N. T., Gokanapudi, N., Boons, G. J., & Brooks, C. L. (2017). Glycosylation of MUC1 influences the binding of a therapeutic antibody by altering the conformational equilibrium of the antigen. *Glycobiology*, 27(7), 677–687. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww131>
- Munster, D. J., Quin, R. J., Bansal, A. S., Ward, B. G., & Mcguckin, M. A. (1998). Peritoneal fluid from ovarian cancer patients stimulates MUC1 epithelial mucin expression in ovarian cancer cell lines. In *J. Cancer* (Vol. 76). Wiley-Liss, Inc.
- Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A. I., Carraway, K. L., Isola, J., & Jovin, T. M. (2005). Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research*, 65(2), 473 LP – 482. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/2/473.abstract>
- Nath, S., & Mukherjee, P. (2014). MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 20, pp. 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.007>

- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220–228.
<https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nett, J. H., Cook, W. J., Chen, M. T., Davidson, R. C., Bobrowicz, P., Kett, W., ... Hamilton, S. R. (2013). Characterization of the *Pichia pastoris* Protein-O-mannosyltransferase Gene Family. *PLoS ONE*, 8(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068325>
- Nicolò, Eleonora, b,*; Zagami, Paola, b,*; Curigliano, Giuseppe, B. (2020). Antibody–drug conjugates in breast cancer: the chemotherapy of the future? *Current Opinion in Oncology*, 32(5), 494–502. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000656>
- Nishida A, Lau C, Zhang M, Andoh A, Shi H, Mizoguchi E, & Mizoguchi A. (2012). The Membrane-Bound Mucin Muc1 Regulates T Helper 17-Cell Responses and Colitis in Mice. *Gastroenterology*, 142(4), 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.gmet.2012.08.002>
- Norton, J., Foster, D., Chinta, M., Titan, A., & Longaker, M. (2020). Pancreatic cancer associated fibroblasts (CAF): Under-explored target for pancreatic cancer treatment. *Cancers*, 12(5), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers12051347>
- Nyame, K., Cummings, R., & Damian, R. (1988). Characterization of the N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins synthesized by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Parasitol.*, 74(4), 5662–572.
- Okada, Vaeteewoottacharn, & Kariya. (2019). Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells*, 8(8), 889. <https://doi.org/10.3390/cells8080889>
- Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., ... Galon, J. (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(25), 2654–2666.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa051424>
- Pályi-Krekk, Z., Barok, M., Isola, J., Tammi, M., Szöllosi, J., & Nagy, P. (2007). Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 43(16), 2423–2433. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.08.018>
- Panchamoorthy, G., Jin, C., Raina, D., Bharti, A., Yamamoto, M., Adeebge, D., ... Kufe, D. (2018). Targeting the human MUC1-C oncoprotein with an antibody-drug conjugate. *JCI Insight*, 3(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99880>

- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., ... Salemme, F. R. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J.Biomol.Screen. Off.J.Soc.Biomol.Screen.*, 6(6), 429–440.
- Pardo, J., Pérez-Galán, P., Gamen, S., Marzo, I., Monleón, I., Kaspar, A. A., ... Anel, A. (2001). A Role of the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor in Granulysin-Induced Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 167(3), 1222–1229.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1222>
- Peña, S. V., & Krensky, A. M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Seminars in Immunology*, 9(2), 117–125. <https://doi.org/10.1006/smim.1997.0061>
- Perkins, G. L., Slater, E. D., Sanders, G. K., & Prichard, J. G. (2003). Serum tumor markers. *American Family Physician*, 68(6), 1075–1082.
- Peters, B. H., Molnár, F., & Ketolainen, J. (2014). Structural attributes of model protein formulations prepared by rapid freeze-drying cycles in a microscale heating stage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(2), 347–356.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.02.016>
- Pichinuk, E., Chalik, M., Benhar, I., Ginat-Koton, R., Ziv, R., Smorodinsky, N. I., ... Wreschner, D. H. (2020). In vivo anti-MUC1+ tumor activity and sequences of high-affinity anti-MUC1-SEA antibodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02547-2>
- Posey, A. D., Schwab, R. D., Boesteanu, A. C., Steentoft, C., Mandel, U., Engels, B., ... June, C. H. (2016). Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. *Immunity*, 44(6), 1444–1454.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.014>
- Puxbaum, V., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2015). Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2925–2938. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6470-z>
- Qi, W., Schultes, B. C., Liu, D., Kuzma, M., Decker, W., & Madiyalakan, R. (2001). Characterization of an Anti-MUC1 Monoclonal Antibody with Potential as a Cancer Vaccine. *HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS*, 20(5).
- Qu, C. F., Li, Y., Song, Y. J., Rizvi, S. M. A., Raja, C., Zhang, D., ... Allen, B. J. (2004). MUC1 expression in primary and metastatic pancreatic cancer cells for in vitro treatment by

- 213Bi-C595 radioimmunoconjugate. *British Journal of Cancer*, 91(12), 2086–2093.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602232>
- Ragupathi, G., Liu, N. X., Musselli, C., Powell, S., Lloyd, K., & Livingston, P. O. (2005). Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent cytotoxicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(9), 5706–5712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5706>
- Rajabi, H., Hiraki, M., & Kufe, D. (2018). MUC1-C activates polycomb repressive complexes and downregulates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Oncogene*, 37(16), 2079–2088. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0096-9>
- Raju, J., Roberts, J., Sondagar, C., Kapal, K., Aziz, S. A., Caldwell, D., & Mehta, R. (2013). Negligible Colon Cancer Risk from Food-Borne Acrylamide Exposure in Male F344 Rats and Nude (nu/nu) Mice-Bearing Human Colon Tumor Xenografts. *PLoS ONE*, 8(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073916>
- Rodríguez, E., Schettters, S. T. T., & Van Kooyk, Y. (2018). The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 18(3), 204–211.
<https://doi.org/10.1038/nri.2018.3>
- Sánchez-Ruiz, J., & Sancho, J. (2003). La estabilidad de las proteínas. In C. Gómez-Moreno Calera & J. Sancho Sanz (Eds.), *Estructura de proteínas* (Primera ed, pp. 167–199). Barcelona - España: Editorial Ariel S.A.
- Sánchez F., E. M., Navo, C. D., Martínez-Sáez, N., Gonçalves-Pereira, R., Somovilla, V. J., Avenoza, A., ... Peregrina, J. M. (2016). Tn Antigen Mimics Based on sp2-Iminosugars with Affinity for an anti-MUC1 Antibody. *Organic Letters*, 18(15), 3890–3893.
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01899>
- Sanz, L., Kristensen, P., Blanco, B., Facteau, S., Russell, S. J., Winter, G., & AÁlvarez-Vallina, L. (2002). Single-chain antibody-based gene therapy: Inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Therapy*, 9(15), 1049–1053.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301725>
- Schaller, G., Bangemann, N., Becker, C., Bühler, H., Opri, F., & Weitzel, H. K. (1999). Therapy of metastatic breast cancer with humanized antibodies against the HER2 receptor protein. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(8–9), 520–524.
<https://doi.org/10.1007/s004320050311>

- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565–1570.
<https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Seleznick, M. J. (1992). Tumor markers. *Primary Care*, 19(4), 715–726.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & Maizel, J. V. J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5), 815–820. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90391-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90391-9)
- Shlomovitz, I., Speir, M., & Gerlic, M. (2019). Flipping the dogma - phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 17(1), 139.
<https://doi.org/10.1186/s12964-019-0437-0>
- Sparrow, E., & Bodman-Smith, M. D. (2020). Granulysin: The attractive side of a natural born killer. *Immunology Letters*, 217(October 2019), 126–132.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.11.005>
- Sperb, N., Tsesmelis, M., & Wirth, T. (2020). Crosstalk between tumor and stromal cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21155486>
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., ... Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282(5386), 121–125. <https://doi.org/10.1126/science.282.5386.121>
- Szadvari, I., Krizanova, O., & Babula, P. (2016). Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiological Research*, 65, S441–S453.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.933526>
- Takenaka, K., Prasolava, T. K., Wang, J. C. Y., Mortin-Toth, S. M., Khalouei, S., Gan, O. I., ... Danska, J. S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nature Immunology*, 8(12), 1313–1323.
<https://doi.org/10.1038/ni1527>
- Theron, C. W., Berrios, J., Delvigne, F., & Fickers, P. (2018). Integrating metabolic modeling and population heterogeneity analysis into optimizing recombinant protein production by *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 102, pp. 63–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8612-y>

- Tomé-Amat, J., Olombrada, M., Ruiz-de-la-Herrán, J., Pérez-Gómez, E., Andradas, C., Sánchez, C., ... Lacadena, J. (2015). Efficient in vivo antitumor effect of an immunotoxin based on ribotoxin α -sarcin in nude mice bearing human colorectal cancer xenografts. *SpringerPlus*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0943-5>
- Tonnis, W. F., Mensink, M. A., De Jager, A., Van Der Voort Maarschalk, K., Frijlink, H. W., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins. *Molecular Pharmaceutics*, 12(3), 684–694. <https://doi.org/10.1021/mp500423z>
- Trimble, R. B., Lubowski, C., Hauer, C. R., Stack, R., McNaughton, L., Gemmill, T. R., & Kumar, S. A. (2004). Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, 14(3), 265–274. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh036>
- Twomey, A., Kurata, K., Nagare, Y., Takamatsu, H., & Aksan, A. (2015). Microheterogeneity in Frozen Protein Solutions. *Inst J Pharm.*, 487(0), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Umehara, T., Kato, K., Park, Y. S., Lillehoj, E. P., Kawachi, H., & Kim, K. C. (2012). Prevention of lung injury by Muc1 mucin in a mouse model of repetitive *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Inflammation Research*, 61(9), 1013–1020. <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0494-y>
- van de Wiel-van Kemenade, E., Ligtenberg, M. J., de Boer, A. J., Buijs, F., Vos, H. L., Melief, C. J., ... Figdor, C. G. (1993). Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *The Journal of Immunology*, 151(2), 767 LP – 776. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/151/2/767.abstract>
- van Kooyk, Y., & Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 9(6), 593–601. <https://doi.org/10.1038/ni.f.203>
- van Vliet, S. J., Bay, S., Vuist, I. M., Kalay, H., García-Vallejo, J. J., Leclerc, C., & van Kooyk, Y. (2013). MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF- α secretion. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(2), 315–323. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012520>
- van Vliet, S. J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. H., & van Kooyk, Y. (2006). Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with

- CD45. *Nature Immunology*, 7(11), 1200–1208. <https://doi.org/10.1038/ni1390>
- Varki, A. (2011). Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology*, 21(9), 1121–1124. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr087>
- Varki, A. (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>
- Venkitachalam, S., Revoredo, L., Varadan, V., Fecteau, R., Ravi, L., Lutterbaugh, J., ... Guda, K. (2016). Biochemical and functional characterization of glycosylation-associated mutational landscapes in colon cancer. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23642>
- Walch, M., Dotiwala, F., Mulik, S., Thiery, J., Clayberger, C., Krensky, A. M., & Martinvalet, D. (2014). Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through Granulysin-mediated delivery of Granzymes. *Cell*, 157(6), 1309–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.062>.Cytotoxic
- Wang, M., Yao, L. C., Cheng, M., Cai, D., Martinek, J., Pan, C. X., ... Keck, J. G. (2018). Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB Journal*, 32(3), 1537–1549. <https://doi.org/10.1096/fj.201700740R>
- Watanabe, M. (2012). Metabolic Profiling Comparison of Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells and Three Pancreatic Cancer Cell Lines using NMR Based Metabonomics. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, 03(02), 513–529. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.s3-002>
- Wei, H. M., Lin, L. C., Wang, C. F., Lee, Y. J., Chen, Y. T., & Liao, Y. Di. (2016). Antimicrobial properties of an immunomodulator - 15 kDa human granulysin. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156321>
- Wilkie, S., Picco, G., Foster, J., Davies, D. M., Julien, S., Cooper, L., ... Maher, J. (2008). Retargeting of Human T Cells to Tumor-Associated MUC1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4901–4909. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4901>
- Wilson, R. M., & Danishefsky, S. J. (2013, October 2). A vision for vaccines built from fully synthetic tumor-associated antigens: From the laboratory to the clinic. *Journal of the*

American Chemical Society, Vol. 135, pp. 14462–14472.

<https://doi.org/10.1021/ja405932r>

Wiśniewski, J. R., Duś-Szachniewicz, K., Ostasiewicz, P., Ziolkowski, P., Rakus, D., & Mann, M. (2015). Absolute proteome analysis of colorectal mucosa, adenoma, and cancer reveals drastic changes in fatty acid metabolism and Plasma membrane transporters. *Journal of Proteome Research*, 14(9), 4005–4018.

<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00523>

Wolfert, M. A., & Boons, G. J. (2013, December). Adaptive immune activation: Glycosylation does matter. *Nature Chemical Biology*, Vol. 9, pp. 776–784.

<https://doi.org/10.1038/nchembio.1403>

Yang, Z., & Zhang, Z. (2018, January 1). Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, Vol. 36, pp. 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.002>

Yen, J.-H., Xu, S., Park, Y. S., Ganea, D., & Kim, K. C. (2013). Higher susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in *Muc1*-deficient mice is associated with increased Th1/Th17 responses. *Brain Behav. Immun.*, 29, 70–81.

<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

You, F., Jiang, L., Zhang, B., Lu, Q., Zhou, Q., Liao, X., ... Yang, L. (2016). Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Science China Life Sciences*, 59(4), 386–397. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5024-7>

Zalba, S., & ten Hagen, T. L. M. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev.*, 52, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>.Cell

Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., Croker, B. A., ... Gerlic, M. (2017). Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biology*, 15(6), 1–23.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002711>

Zhang, H., Zhong, C., Shi, L., Guo, Y., & Fan, Z. (2009). Granulysin Induces Cathepsin B Release from Lysosomes of Target Tumor Cells to Attack Mitochondria through Processing of Bid Leading to Necroptosis. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6993–7000.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802502>

7. ANEXOS

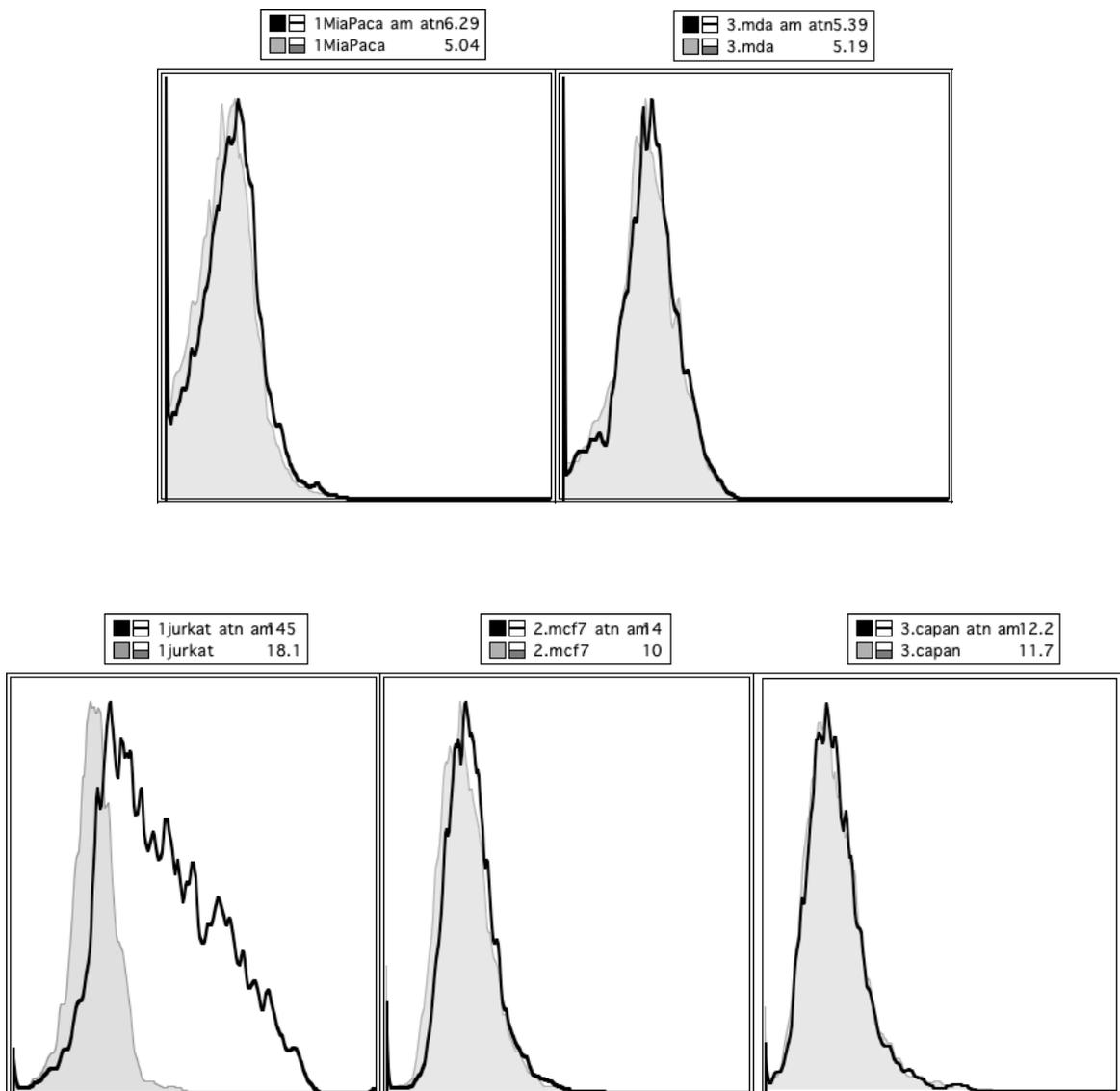
7.1 ANEXO 1

CONTROL PROCESOS <i>P.pastoris</i> SM3GRNLY # _____ AR20.5GRNLY # _____									
PARÁMETRO	Fecha inicio	Número de horas	Volumen	Mecanismo agitación	OD	Levaduras/ml	CONTAMINACIÓN		
							SI	NO	
Preinóculo									
Comentarios:									
BMGY									
Comentarios:									
BMMY									
Comentarios:									
Concentración				Comentarios:					
Diálisis				Comentarios:					
Purificación	volumen resina		Recipiente para incubación	Tiempo incubación resina	Tiempo lavados			Equipo de agitación	Volumen tampón elución
	nueva	reciclada			1°	2°	3°		
Comentarios:									

CONCENTRACIÓN				Citotoxicidad
Fecha	Comentarios	uM	vol. (ml)	
COOMASSIE, inmunoblot, Gel Agarosa				
1		1		1
2		2		2
3		3		3
4		4		4
5		5		5
6		6		6
7		7		7
8		8		8
FECHA:				9
				10
				11
				12
				13
				14
ESPECTRO DE ABSORCIÓN				

7.2 ANEXO 2

Ensayo de unión a Tn usando Tn antigen monoclonal antibody (Tn218) Cat. N°MA1-90544 Thermo Fisher Scientific. En la parte superior se puede ver el número la intensidad media de fluorescencia en cada línea. El ensayo se realizó usando el mismo procedimiento descrito para las inmunotoxinas usando una concentración del anticuerpo antes mencionado a una dilución 1:100.



7.3 ANEXO 3

CONTROL DE PESO DE LOS NUDES TRATADOS CON INMUNOTOXINAS ENSAYO CAPAN-2 NOVIEMBRE 2020

GRUPO EXPERIMENTAL	Nº	DOSIS 1	DOSIS 2	DOSIS 3	DOSIS 4	DOSIS 5	DOSIS 6	DOSIS 7	DOSIS 8	DOSIS 9	DOSIS 10	% PESO INICIAL COMPARADO CON EL PESO FINAL
AR20.5GRNLY	7180	37	36,7	37,2	37,8	39,2	38	38,3	37,8	37,7	37,7	101,89
SM3GRNLY	7177	32,2	32,4	32,5	33,2	32,2	32,2	32,9	33,1	34,04	34,3	106,52
	7178	35,1	33,8	34,2	33,7	33,6	33,9	34,12	35,5	36	36,5	103,99
	7179	34,6	34,2	34,1	34,5	34,4	34,6	34,93	32,3	34,6	34,5	99,71
	7172	32,92	33,42	33	32,03	32,8	33,4	32,4	33,3	34	33,4	101,46
	7170	35,98	35,5	34,8	34,82	34,6	35,5	34,6	34,9	35,5	35,3	98,11
GRNLY	7175	33,8	34,9	32,32	34,24	35,2	34,1	34,3	33,5	34,2	35,13	103,93
	7171	35,94	36,46	37,2	37,12	36,4	37,2	37	36,5	36	36,5	101,56
	7161	34,9	34,36	33,48	35,6	34,8	34,4	34,11	34,9	35,44	35,2	100,86
	7162	31	30,8	31,41	32	31,93	31,36	32,47	32,34	32,7	32,2	103,87
	7168	34,6	35,01	35,6	35,68	35,79	36	36,3	35,6	35,5	36,6	105,78
	7160	34,6	33,75	33,44	35,8	34,23	33,98	34,69	34,47	34,6	36	104,05

7.4 ANEXO 4

CONTROL DE PESO DE LOS RATONES NRG TRATADOS CON GRNLY ENSAYO CAPAN-2 NOVIEMBRE 2019

DIA 0: 14/11/2019		DIAS DE VIDA	Peso día 4 18/11/2019	Peso día 11 25/11/2019	Peso día 13 27/11/2019	Peso día 15 29/11/2019	Peso día 18 02/12/2019	Peso día 20 04/12/2019	Peso día 22 06/12/2019	Peso día 25 09/12/2019	Peso día 27 12/12/2019	PESO TUMOR día 27 12/12/2019
HT29	N	27	30.5	31.4	31	31.7	31.5	31.7	32	31.5	31	57
	I	27	31.1	32.8	32.6	32.2	33.1	32.7	33.2	31.6	31.4	276
HT29+TRATAMIENTO	N	27	32.2	32.4	32.4	33.2	33	33.4	33.3	33.4	33.1	538
	D	27	31.6	32.3	31.8	32.8	34.5	32.9	31.8	33.4	32.1	135
	I	27	27.3	28	27.8	28.2	27.3	28	28	27.8	27.1	140
	DI	27	32.6	33.2	33.2	33.3	33	33.1	33.6	33.1	33.2	245
	2D	27	33.8	35.5	34.6	34.6	32.3	32.7	34.2	34.5	33.4	239
HT29+PBS	N	27	31.7	31.7	31	32.1	32.5	32.3	32.5	31.6	30.8	203
	D	27	33	32.2	31	31.4	31.4	32.2	31.4	31.2	31.4	264
	I	27	33.6	34.4	33.8	34.4	34.3	34.3	34	34.5	33.6	336
	DI	15	31.3	31.6	30.6	26.5*						
	2D	27	36.9	37.4	36.4	36.9	36.6	36.8	36.8	36.4	37.1	564

*PUNTO FINAL HUMANITARIO (PFH)

7.5 ANEXO 5

Escala tomada del Documento Marco para la evaluación de severidad. Preocupándose por los animales hacia una ciencia mejor. Directiva 2010/63/EU Protección De los animales UtilizaDos Para fines científicos. 2012

Ejemplos de puntuaciones clínicas

Aspecto	Puntuación
Peso corporal	
Pérdida de peso del 5 % al 10 %	1
Pérdida de peso del 11 % al 15 %	2
Pérdida de peso del 16 % al 20 %	3
Pérdida de peso superior al 20 %	PFH
Estado del pelaje	
Pelaje ligeramente descuidado	1
Piloerección leve	2
Piloerección marcada	3

Funciones corporales	
Taquipnea (respiración rápida)	1
Disnea (dificultad para respirar)	3
Entorno	
Heces sueltas o diarrea	1
Sangre en la diarrea	PFH
Comportamiento	
Tenso y nervioso durante la manipulación	1
Muy angustiado durante la manipulación, por ejemplo, con temblores, vocalización, agresividad	3
Locomoción	
Postura/locomoción ligeramente anormales	1
Postura/locomoción muy anormales	2
Grandes problemas de movilidad/resistencia a moverse	3
Inmovilidad durante más de 24 horas	PFH
Indicadores específicos del procedimiento	
Tamaño del tumor superior a 1,2 cm	PFH
Ulceración del tumor	PFH
El tumor impide el movimiento	PFH

Acciones	
Puntuación 1	Revisar la frecuencia del seguimiento
2	Considerar la posibilidad de administrar cuidados suplementarios, por ejemplo, líquidos adicionales
4	Consultar a un veterinario
6	Adoptar un punto final humanitario



