

Máster en Biología Molecular y Celular

Curso 2022/23

Trabajo de Fin de Máster

**Desarrollo de anticuerpos
bienespecíficos de unión a células
NK (BiKE) frente al antígeno Tn
para inmunoterapia en cáncer**

Autor:

Jorge Paúl Bernal

Directores:

Julián Pardo Jimeno

Ramón Hurtado Guerrero

*Un recuerdo para mis abuelos Rosa, Pilar,
Juan y Jesús, y especialmente a Pilar y Jesús
que se fueron cuando estaba terminando la
carrera.*

*Vosotros siempre creísteis en mí, mucho más
de lo que yo podré hacerlo nunca.*

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
<i>Cáncer</i>	2
Definición y origen.....	2
Características comunes y habilitadoras del cáncer.....	3
Microambiente tumoral (TME).....	5
Antígenos tumorales.....	6
<i>Respuesta inmune al cáncer</i>	7
Inmunovigilancia y teoría de la inmunoección.....	7
Células dendríticas (DCs).....	8
Macrófagos.....	9
Neutrófilos.....	9
Células supresoras derivadas de precursores mieloides (MDSCs).....	10
Células NK.....	10
Linfocitos T citotóxicos (CD8 ⁺).....	12
Linfocitos T colaboradores (CD4 ⁺) o Th.....	12
Linfocitos T $\gamma\delta$	14
Linfocitos B.....	14
Estrategias del tumor para evadir al sistema inmune.....	15
<i>Antígeno Tn</i>	16
Glicosilación.....	16
O-glicanos asociados al cáncer.....	17
<i>Los anticuerpos en inmunoterapia</i>	19
Inmunoterapia.....	19
Anticuerpos.....	20
scFv biespecíficos de unión a células NK (BiKE).....	21
Antecedentes y objetivos.....	24
<i>Antecedentes</i>	24
G2D11.....	24
2D9.....	24
LSIV21.....	24
Inmunoterapias anti-Tn.....	25

<i>Hipótesis y objetivo</i>	26
Materiales y métodos	27
<i>Diseño de las secuencias y del vector</i>	27
<i>Obtención del vector</i>	28
Transformación de E. coli DH5 α	28
Purificación del plásmido (Gigaprep)	28
Cuantificación y esterilización del DNA.....	29
<i>Técnicas de cultivo in vitro y criopreservación</i>	29
Células HEK 293 6F	29
Otras líneas celulares	30
<i>Expresión y purificación de proteínas recombinantes</i>	31
Transfección HEK 293 6F	32
Purificación en sistema ÄKTA	32
Concentración de proteínas	33
Cuantificación de proteínas, esterilización y conservación.....	34
<i>Electroforesis y western blot</i>	34
Electroforesis (PAGE)	34
Western blot	35
<i>Marcajes y análisis por citometría de flujo</i>	35
<i>Experimentos de adhesión en placa</i>	35
<i>Ensayos de citotoxicidad de las proteínas</i>	36
<i>Ensayos de CDC in vitro</i>	36
<i>Ensayos de ADCC in vitro</i>	37
Aislamiento de PBMCs	37
Activación y expansión de células NK in vitro	37
Purificación de células NK	38
Experimento de ADCC in vitro.....	38
<i>Análisis estadístico</i>	38
Resultados	39
<i>Pruebas de expresión</i>	39
<i>Replicación de los vectores</i>	40
<i>Expresión de las proteínas en células HEK 293 6F</i>	40

<i>Pruebas de plegamiento del Fc</i>	43
Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes	44
Experimento de adhesión	44
<i>Fenotipado de líneas celulares</i>	45
<i>Pruebas de citotoxicidad inducida por los scFv-Fc y los BiKEs</i>	47
<i>Pruebas de CDC inducida por los scFv-Fc</i>	49
<i>Pruebas de unión de los scFv-Fc y BiKEs a células NK</i>	51
<i>Pruebas de ADCC inducida por los scFv-Fc y BiKEs</i>	53
Discusión.....	56
Conclusiones	60
Anexo I. Composición de los tampones.....	i
Bibliografía.....	ii

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADCP	Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos <i>Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis</i>
ATCC	Colección americana de cultivos tipo <i>American Type Culture Collection</i>
BiKE	Acoplador biespecífico de células asesinas <i>Bispecific Killer cell Engager</i>
BiTE	Acoplador biespecífico de células T <i>Bispecific T cell Engager</i>
CD	Cluster de diferenciación <i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento <i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>
Célula CAR-T	Célula T con receptor quimérico de antígeno <i>Chimeric Antigen Receptor-T cell</i>
Célula NK	Célula asesina natural <i>Natural Killer cell</i>
Célula Treg	Célula T reguladoras
Célula Th	Célula T colaboradora <i>Helper T cell</i>
CTL	Linfocito T citotóxico <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
DAMP	Patrón molecular asociado a daño <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
EGFR	Receptor del factor de crecimiento <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Fc	Fracción cristalizante o constante del anticuerpo
FcR	Receptor de Fc
FcγR	Receptor de Fc de las IgG
GFP	Proteína fluorescente verde <i>Green Fluorescent Protein</i>
gzm	Granzima
HER2	Receptor del factor humano de crecimiento epidérmico 2 <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Inmunoglobulina de clase G
IL	Interleucina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MSCD	Células supresoras derivadas de precursores mieloides <i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i>

PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Solución salina tamponada con fosfato <i>Phosphate-buffered saline</i>
PEI	Polieterimida
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones <i>Pattern Recognition Receptor</i>
scFv	Anticuerpo de cadena sencilla <i>single-chain variable fragment</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β <i>Transforming growth factor β</i>
TLR	Receptor de tipo Toll <i>Toll-Like Receptor</i>
TME	Microambiente tumoral <i>Tumor Microenvironment</i>
TriKE	Acoplador trispecífico asesino <i>Trispecific Killer Engager</i>
VPA	Ácido valproico <i>Valproic acid</i>

Resumen

Introducción y objetivo. Los BiKEs (“*bispecific killer cell engagers*”) son una nueva forma de inmunoterapia que consiste en dos scFv conectados. Un scFv reconoce a un antígeno tumoral y el otro se une a CD16 en la membrana de la célula NK, de esta forma las células NK se activan y se dirigen específicamente hacia el tumor. Se piensa que los BiKEs tendrían la ventaja respecto a los anticuerpos monoclonales de penetrar más fácilmente en tumores sólidos y generar un estímulo más fuerte en las células NK que sería capaz de activarlas incluso en las condiciones inmunosupresoras del microambiente tumoral. El objetivo de este trabajo es diseñar y expresar de forma recombinante dos BiKEs, además de otras tres proteínas, utilizando el antígeno Tn como diana. Este antígeno es un patrón de glicosilación aberrante específico de células tumorales y muy abundante en los tumores de origen epitelial.

Resultados. Las 5 proteínas se han expresado en células HEK 293 6F con un buen rendimiento y grado de pureza. Hemos podido demostrar que estas proteínas están correctamente plegadas, dimerizadas y glicosiladas. También se ha comprobado que los scFv de los BiKEs reconocen el antígeno Tn como estaba descrito en la bibliografía. No obstante, la capacidad de los BiKEs para activar a las células NK contra células tumorales en cultivos *in vitro* no ha podido ser demostrada debido a la falta de un control positivo adecuado.

Abstract

Introduction and objective. BiKEs (bispecific killer cell engagers) are a new form of immunotherapy that consists of two connected scFv. One scFv recognizes a tumor antigen and the other binds to CD16 on the NK cell membrane, thus NK cells are activated and specifically target the tumor. It's thought that BiKEs would have the advantage over monoclonal antibodies of more easily penetrating solid tumors and generating a stronger stimulus to NK cells that would be capable of activating them even in the immunosuppressive conditions of the tumor microenvironment. The objective of this work is to design and recombinantly express two BiKEs, in addition to three other proteins, using the Tn antigen as a target. This antigen is an aberrant glycosylation pattern specific to tumor cells and highly abundant in tumors of epithelial origin.

Results. The 5 proteins have been expressed in HEK 293 6F cells with a good yield and degree of purity. We have been able to demonstrate that these proteins are correctly folded, dimerized and glycosylated. We also have probed that the scFvs of the BiKEs recognize Tn antigen as is described in the literature. However, the ability of BiKEs to activate NK cells against tumor cells in *in vitro* cultures couldn't be demonstrated due to the lack of an adequate positive control.

Introducción

Cáncer

Definición y origen

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, después de la sepsis, según datos de la Organización Mundial de la Salud en 2020 fallecieron a causa del cáncer casi 10 millones de personas, esto es aproximadamente una de cada seis muertes registradas. Los tipos de cáncer más comunes son, en cuanto al número de nuevos casos y teniendo en cuenta ambos sexos, el cáncer de mama, seguido del cáncer de pulmón, colorrectal y próstata. Los tipos de cáncer que causaron más fallecimientos en 2020 fueron el cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal, hepático, gástrico y cáncer de mama (1).

El término **cáncer** hace referencia a un grupo muy amplio de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Un conjunto de células con la capacidad de dividirse de forma descontrolada produce un tumor o neoplasia, cuando el tumor no es capaz de crecer indefinidamente y no invade el tejido sano circundante se dice que es **benigno**. No obstante, un tumor que continúa creciendo y se vuelve progresivamente más invasivo se denomina **maligno**. El término cáncer se refiere específicamente a un tumor maligno (2).

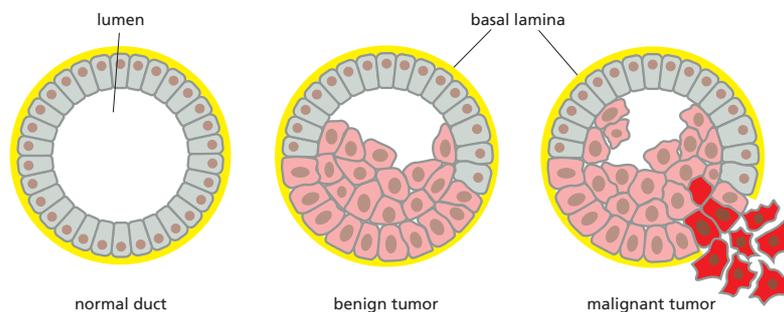


Figura 1. Diagrama general del proceso desarrollo de un tumor. Una célula que adquiere la capacidad de proliferar de forma descontrolada pero que no invade el tejido sano circundante forma un tumor benigno (rosa). Cuando el tumor atraviesa la lámina basal y destruye el tejido circundante se denomina maligno o cáncer (rojo). Fuente Alberts (3).

En la actualidad se considera que el cáncer es en esencia una enfermedad genética, puesto que la base del desarrollo del cáncer es la acumulación de mutaciones en el genoma de las células, aunque en la mayoría de los casos no es una enfermedad hereditaria (4). La transformación tumoral es un proceso progresivo en el que la célula va acumulando mutaciones en su DNA, una única mutación no es responsable del desarrollo de un tumor, sino que es necesaria la confluencia de varias mutaciones. Cada una de estas mutaciones va acercando a la célula progresivamente a una condición que permite la proliferación celular desregulada y la transformación tumoral (2).

El desarrollo del cáncer suele dividirse en cuatro fases denominadas iniciación, promoción, progresión y metástasis. La **iniciación** implica cambios en el genoma de la célula que aumentan su potencial de proliferación pero que en sí mismos no conducen a la transformación tumoral. En la **fase de promoción** estas células preneoplásicas comienzan a acumularse formando pequeños tumores benignos que no destruyen el tejido sano circundante. En esta fase los mecanismos de reparación del DNA todavía pueden revertir la célula a su estado original. Las fases de iniciación y promoción pueden durar bastante tiempo. En la **fase de progresión** las células adquieren nuevas alteraciones genéticas que inducen la proliferación celular descontrolada y la capacidad para atravesar la lámina basal y destruir el tejido sano circundante. En esta etapa el tumor se transforma en maligno y su tamaño suele aumentar rápidamente. Finalmente, en la fase de **metástasis** algunas células del tumor pierden la adhesión con las células vecinas, lo que les permite extravasarse a la sangre o vasos linfáticos y establecerse en otros tejidos generando tumores secundarios (2).

Las herramientas de secuenciación de células individuales han permitido observar que las células cancerosas dentro de un mismo tumor no son todas exactamente iguales, sino que existe una **heterogeneidad**. La hiperproliferación junto con el aumento de la inestabilidad genética genera subpoblaciones clonales distintas, y cada una de ellas contribuye con capacidades diferentes y complementarias al crecimiento del tumor. A su vez esta heterogeneidad puede contribuir a la resistencia a las terapias, puesto que todos los clones no tienen por qué ser igual de sensibles al tratamiento (5).

Características comunes y habilitadoras del cáncer

Hanahan y Weinberg propusieron ocho **características comunes** o “*hallmarks*” de las células tumorales y dos **características habilitadoras** o “*enabling*” que hacen posible la adquisición de las características comunes durante el proceso de desarrollo tumoral: inestabilidad genómica e inflamación (4). Las ocho características comunes se resumen a continuación.

La primera característica consiste en **[1] mantener señales de proliferación celular** y la segunda en **[2] evadir aquellas que suprimen el crecimiento celular**. Las células tumorales desregulan los sistemas de control del ciclo celular, por ejemplo estimulando a las células del estroma para que secreten factores de crecimiento, aumentando la expresión de sus receptores o a través de mutaciones en el gen *TP53* que codifica la proteína p53 encargada de inhibir la replicación celular si hay daño en el DNA. En relación con las dos primeras, la tercera señal consiste en **[3] resistir a los mecanismos de muerte celular**, encargados de eliminar células envejecidas o aberrantes, entre los cuales la apoptosis es el proceso más relevante. La entrada en apoptosis depende del balance entre señales activadoras e inhibitoras por parte de la familia de proteínas Bcl-2, estas activarían a las caspasas, unas proteasas que destruyen a la célula y finalmente esta es fagocitada por las células vecinas. Para terminar en lo referido al crecimiento celular, la cuarta característica implica la **[4] habilitación para replicarse indefinidamente** a través de la activación de la enzima telomerasa (4).

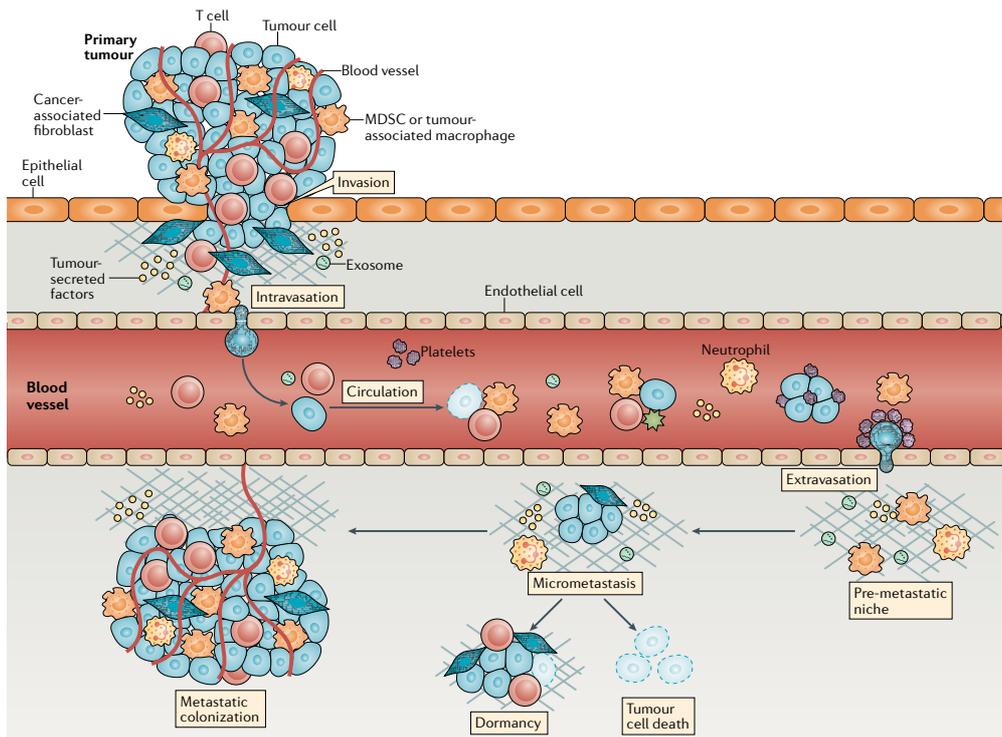


Figura 2. Esquema general del proceso de metástasis en el que una célula tumoral (azul) puede diseminarse desde el tumor primario a través de un vaso sanguíneo hasta otro tejido. En función de si la célula tumoral consigue adaptarse al nuevo tejido puede morir, generar micrometástasis latentes o colonizar el tejido formando un tumor secundario. Fuente Anderson et al. 2018 (6).

Por otro lado, el tumor necesita nuevos vasos sanguíneos para portar nutrientes y oxígeno, y eliminar los desechos, para ello [5] **estimulan la angiogénesis**, por ejemplo, secretando el factor de crecimiento vascular A (VEGF-A). Además, las células tumorales [6] **modifican el metabolismo celular**, estas células degradan la glucosa mayoritariamente a través de rutas anaerobias incluso en presencia de oxígeno, esta transición se denomina efecto Warburg. Aunque este efecto es desfavorable energéticamente, se piensa que beneficia al tumor porque así dispone de los intermediarios de la glucólisis para biosintetizar los aminoácidos y lípidos necesarios para el crecimiento celular. La séptima característica consiste en [7] **cambios que permiten la invasión y metástasis** (Figura 2), estos procesos implican una serie de cambios en la biología celular, generalmente la célula deja de expresar E-cadherina una proteína de adhesión célula-célula y en cambio sintetiza N-cadherina que media en los procesos de migración. Esto permite a la célula intravasarse a un vaso linfático o sanguíneo cercano, y después extravasarse en otro tejido donde deben adaptarse al nuevo microambiente para formar nuevos tumores macroscópicos. Finalmente, los tumores detectables han tenido que [8] **evitar la vigilancia continua del sistema inmune**, como se explicará más adelante (4).

La adquisición de estas ocho características comunes de las células tumorales es posible gracias a dos fenómenos denominados **habilitadores**: inestabilidad genética e inflamación. Posiblemente lo más importante para la transformación tumoral es la **inestabilidad genética**

porque gracias a ella una célula sana puede ir acumulando mutaciones por las cuales adquiere las ocho señas de identidad descritas anteriormente. Se conocen muchos genes cuyas mutaciones están implicadas en la transformación tumoral (p. ej. *TP53*, *RAS*, *MYC*, *Bcl-2* o *BRCA1/2*) (4).

En cuanto a la **inflamación**, la mayoría de los tumores están infiltrados por células del sistema inmune que median en la inflamación, y aunque la inflamación es una parte importante en el inicio de la respuesta inmune, si no se regula adecuadamente y se cronifica contribuye a la transformación tumoral (4). Una prueba de esto es que los pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales tienen un mayor riesgo de cáncer colorrectal (7) La inflamación puede contribuir al desarrollo tumoral porque las células del sistema inmune secretan factores de crecimiento, estimulan la angiogénesis y liberan enzimas que modifican la matriz extracelular favoreciendo la angiogénesis, la invasión y la metástasis (8). Además, se liberan moléculas químicas, como especies reactivas del oxígeno y de nitrógeno que provocan daño en el DNA (9). Por otro lado, la inflamación puede tener propiedades inmunosupresoras, puesto que puede atraer a células Treg y MDSCs, ambas con funciones inhibitorias de la respuesta inmune. En el caso de los linfocitos T citotóxicos, la inflamación crónica junto con la exposición continua al antígeno reduce su capacidad citotóxica llegando a un estado de agotamiento o “*exhaustion*” (10).

Microambiente tumoral (TME)

Hasta ahora hemos discutido las características de las células tumorales que evidentemente son el componente fundamental del cáncer, sin embargo, los tumores no están formados únicamente por células cancerosas (Figura 3). El tumor atrae distintos tipos de células sanas del estroma y modifica su biología para establecer un microambiente que soporte el crecimiento tumoral. La reprogramación de estas células del estroma se debe a diversos factores secretados por las células tumorales y modificaciones epigenéticas, en lugar de mutaciones en su genoma (11). Aunque la composición del estroma tumoral varía de un tumor a otro hay varios tipos celulares que se encuentran habitualmente en el microambiente tumoral, abreviado como TME por sus siglas en inglés “*tumor microenvironment*”.

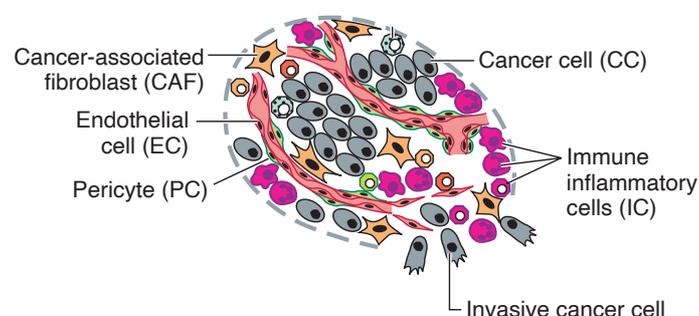


Figura 3. Representación del microambiente tumoral en el que además de células cancerosas (gris) encontramos otros tipos de células como fibroblastos y células inmunes, y células endoteliales y pericitos que forman los vasos sanguíneos. Fuente: modificado de Hanahan et al. 2012 (11).

Los **fibroblastos asociados al cáncer (CAF**, del inglés “*cancer-associated fibroblasts*”) son los fibroblastos que se encuentran en el interior o los alrededores del tumor. Los fibroblastos son células con fenotipos variables en función del tejido en el que se encuentren, aunque en general se encargan de sintetizar y mantener la matriz extracelular y de secretar sustancias como factores de crecimiento, interleucinas o quimiocinas que afectan a la regulación de otros tipos celulares. En el contexto del cáncer los fibroblastos remodelan la matriz extracelular y modifican su secretoma para soportar el crecimiento del tumor (12).

Las **células endoteliales** son otro componente habitual del microambiente tumoral ya que forman parte de los vasos sanguíneos que se forman para sostener el crecimiento del tumor. El crecimiento del endotelio está sometido a un complejo proceso de regulación en el que intervienen los **pericitos**, otro componente habitual del TME. Los pericitos rodean el endotelio y secretan sustancias que mantienen la integridad y funcionalidad del vaso sanguíneo (11).

Por último, en el microambiente tumoral también se encuentran **células del sistema inmune** tanto adaptativo como innato. El sistema inmune puede tener efectos tanto antitumorales como protumorales como se discutirá en el siguiente apartado. (9,13).

Antígenos tumorales

Las células tumorales siguen siendo células propias, por lo que la mayoría de sus antígenos están sometidos a los procesos de autotolerancia inmunológica que impiden el ataque autoinmune. Sin embargo, las células tumorales producen algunos antígenos nuevos o mutados, que pueden iniciar una respuesta inmunológica. En conjunto estos se denominan antígenos tumorales y pueden distinguirse dos grupos: antígenos tumorales específicos (TSA) y antígenos asociados a tumores (TAA) (14).

Los **antígenos tumorales específicos (TSA)** pueden ser el resultado de mutaciones en el genoma de la célula tumoral, entonces se denominan **neoantígenos**, o de la expresión de genes virales relacionados con el tumor. En cualquier caso se producen proteínas diferentes a las propias que pueden inducir una respuesta inmunológica y por ello son el blanco natural para la acción del sistema inmune contra el cáncer (14).

Los **antígenos asociados a tumores (TAA)** son proteínas normales que muestran patrones de expresión diferentes en el tumor, como la expresión de proteínas embrionarias en el adulto o la sobreexpresión de proteínas propias. Los TAA derivados de la expresión de genes embrionarios en el tumor, denominados **antígenos oncofetales**, pueden inducir una respuesta inmunológica puesto que estos antígenos solo se han expresado antes de que el sistema inmune fuera activo. Un ejemplo es el antígeno carcinoembrionario (CEA), una glucoproteína de membrana que en condiciones normales se expresa en las células gastrointestinales y hepáticas del feto, y que se puede expresar en algunos cánceres colorrectales (14).

El otro grupo de TAA lo forman **proteínas propias que se sobreexpresan** en el tumor, como pueden ser factores de crecimiento o sus receptores. Como estas proteínas se expresan de forma natural en el organismo están sujetas a los procesos de autotolerancia, por lo que no van a inducir una respuesta inmune. No obstante, debido a su expresión en las células tumorales es varios órdenes de magnitud superior respecto a la expresión en células sanas, estos antígenos se pueden utilizar como dianas en los tratamientos de inmunoterapia con anticuerpos (14).

Respuesta inmune al cáncer

Inmunovigilancia y teoría de la inmunoección

El sistema inmune es capaz de identificar y eliminar específicamente a las células tumorales en un proceso denominado **inmunovigilancia** del cáncer. La observación de que los modelos de ratón inmunodeficientes en células T y B ($RAG2^{-/-}$) desarrollaron más tumores al ser tratados con MCA (metilcolantreno, un carcinógeno químico) respecto a ratones inmunocompetentes, permitió demostrar experimentalmente el papel del sistema inmune en la prevención del cáncer (15). Además, otros resultados obtenidos mediante la transferencia de tumores de ratones inmunodeficientes a ratones singénicos inmunocompetentes y viceversa, permitieron concluir que los tumores que crecen en ausencia de la presión del sistema inmune son más inmunogénicos, por lo que el sistema inmune no solo nos protege de la formación del tumor, sino que también influye en la inmunogenicidad del tumor en un proceso de selección natural. Las células tumorales menos inmunogénicas pueden evadir la inmunovigilancia y por tanto tienen una ventaja para sobrevivir, respecto a aquellas más inmunogénicas que son eliminadas por el sistema inmune (16). Estas observaciones llevaron a plantear la **teoría de la inmunoección del cáncer**, un proceso dinámico en el que el sistema inmune tiene acciones antitumorales como protumorales. La acción del sistema inmune eliminando las células tumorales más inmunogénicas, ejerce una fuerte influencia sobre el desarrollo tumoral y acaba seleccionando a las células tumorales menos inmunogénicas y más capaces para evadir la respuesta inmune (10,17).

El proceso de inmunoección del cáncer se puede dividir en tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape (Figura 4). La **fase de eliminación** corresponde con el proceso de inmunovigilancia en el que el sistema inmune puede reconocer y eliminar las células tumorales (p. ej., a través de antígenos tumorales o ligandos NKG2D). En esta fase el tumor no se manifiesta clínicamente y el sistema inmune puede ser capaz de eliminar todas las células tumorales frenando así la aparición del cáncer. Sin embargo, en otros casos se establece un equilibrio entre la destrucción de células tumorales y la supervivencia de un pequeño número de ellas. En esta fase, denominada **fase de equilibrio**, el tumor sigue sin manifestarse clínicamente y puede quedar en esta fase durante el resto de la vida del hospedador. De hecho, la presencia de pequeños tumores en estado de equilibrio puede ser más frecuente de lo que se apreciaba anteriormente (10).

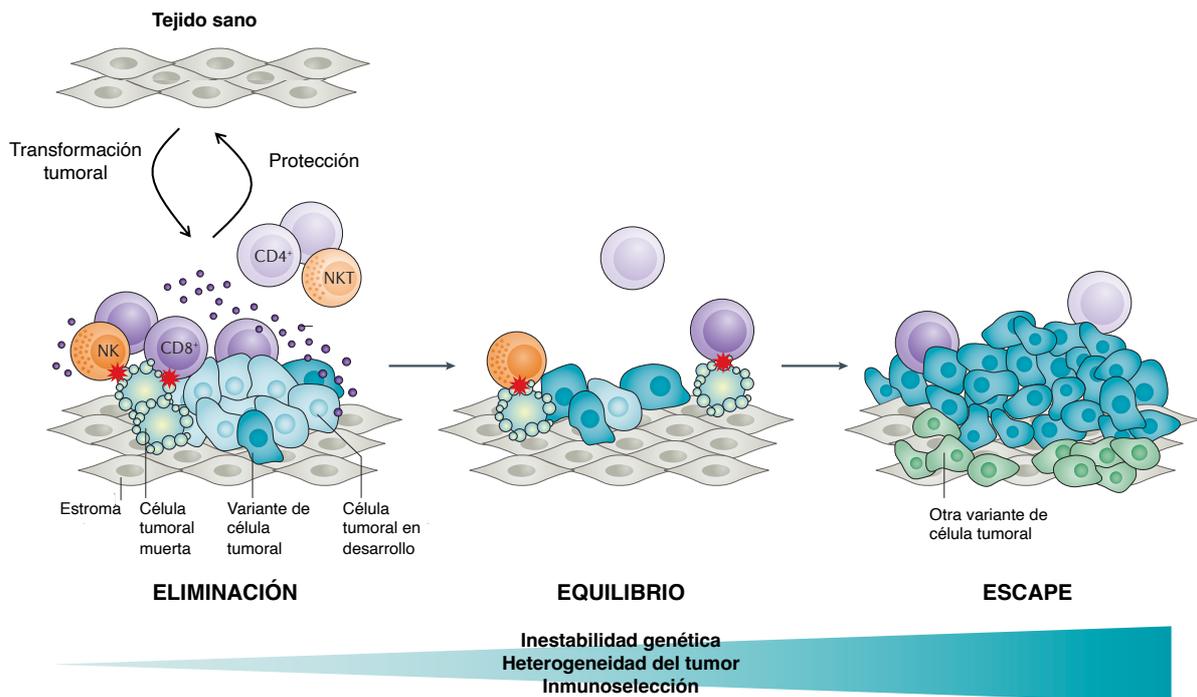


Figura 4. Diagrama general de las tres fases del proceso de inmun edición del cáncer: eliminación, equilibrio y escape. Modificado de Burg et al. 2016 (18).

Ocasionalmente, durante la fase de equilibrio pueden aparecer cambios en las células tumorales que les permitan evadir la acción del sistema inmune, por lo que las células tumorales escapan de la fase de equilibrio y comienzan a proliferar descontroladamente. El mismo efecto puede ocurrir por una inmunodepresión del hospedador. En esta **fase de escape** se producen las manifestaciones clínicas del cáncer, y con el tiempo empiezan a dominar las respuestas inmunitarias inhibitoras de forma que el sistema inmune pasa de tener una actividad antitumoral a protumoral (10).

Las **células inmunes asociadas al tumor** se dividen en dos grandes grupos dependiendo de si contribuyen al desarrollo tumoral o se oponen a éste. Los CTLs (linfocitos T CD8 activados), células NK, células dendríticas, los macrófagos M1 y neutrófilos N1 se oponen al desarrollo tumoral, mientras que las células Treg, las MDSCs (un conjunto de células derivadas de la línea mieloide) y los macrófagos M2 favorecen el desarrollo tumoral. En el caso de los linfocitos B se han descrito funciones en un sentido y en el contrario (9,13). Las funciones de todas estas células se discuten a continuación.

Células dendríticas (DCs)

Las células dendríticas son **células presentadoras de antígeno (APCs)** y exponen los antígenos, a través de sus moléculas de MHC, a los linfocitos T. Las células dendríticas migran por el cuerpo en un estado inactivo, pero son capaces de detectar señales de peligro como los PAMPs de los patógenos y los DAMPs endógenos a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los TLRs. Cuando esto ocurre las células dendríticas se activan, aumentan la expresión de MHC y expresan las proteínas de coestimulación

CD80/86 o B7 necesarias para la activación de los linfocitos T, y secretan citoquinas que promueven y mantienen la activación del sistema inmune (19). De esta forma las células dendríticas ejercen funciones anti-tumorales al activar a otras células inmunes capaces de destruir al tumor, un ejemplo de su relevancia son las inmunoterapias basadas en la activación *ex vivo* de las células dendríticas del paciente con antígenos tumorales para que los presenten a los linfocitos T.

Macrófagos

Los macrófagos se diferencian en los tejidos a partir de los monocitos que circulan por la sangre y son una de las células inmunes más abundantes en el TME, pudiendo llegar hasta el 50% de las células inmunes infiltradas en el tumor (13). En los estadios primarios del desarrollo tumoral los macrófagos residentes en el TME se polarizan hacia **macrófagos M1** (o clásicamente activados) que junto a los neutrófilos inician la respuesta inflamatoria y la activación del sistema inmune adaptativo. Además, secretan ROS que destruyen las células tumorales y citoquinas como el IFN- γ que estimulan la respuesta inmune antitumoral (20).

Por el contrario, en los tumores establecidos los factores liberados por las células del TME polarizan los macrófagos hacia el fenotipo M2 que presentan funciones protumorales. Los **macrófagos M2** (o alternativamente activados) tienen mayor capacidad fagocítica lo que les permite participar en los procesos de remodelación de la matriz extracelular, reparación tisular y angiogénesis que soportan el crecimiento del tumor. Además contribuyen a generar un ambiente inmunosupresor porque, entre otras cosas, reclutan células Treg, inducen la diferenciación de células mieloides a MDSCs, y secretan IL-10 y TGF- β que son fuertes inhibidores de los CTLs y células NK (20,21).

Neutrófilos

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes en sangre, normalmente son los primeros leucocitos en llegar al tejido e inician la respuesta inflamatoria liberando citoquinas, quimiocinas y enzimas que degradan la matriz extracelular (22). Los neutrófilos son también bastante abundantes en el TME y se han observado tanto funciones antitumorales como protumorales de los neutrófilos. Aunque no están tan bien caracterizados como los macrófagos se denomina N1 a los neutrófilos con funciones antitumorales y N2 a los neutrófilos con funciones protumorales (23).

Los neutrófilos pueden utilizar sus herramientas antimicrobianas para **eliminar células tumorales**, como son la liberación de gránulos con sustancias antimicrobianas y la fagocitosis. Además, los neutrófilos pueden reconocer las células tumorales opsonizadas por anticuerpos ya que expresan Fc γ RIIA (CD32A) y Fc γ RIIIB (CD16B), receptores para la fracción constante de las IgG, y destruirlas a través de la expresión de ligandos mortales o el proceso de trogocitosis, por el cual el neutrófilo endocita fragmentos de la membrana de la célula tumoral (23).

Por otro lado, la infiltración persistente de neutrófilos en un tejido es la seña característica de la inflamación crónica que contribuye a la **patología tumoral** y a la generación de un ambiente **inmunosupresor**. Por ejemplo, liberan CCL17, una quimiocina que atrae células Treg fuertemente inmunosupresoras, y las enzimas que liberan para degradar la matriz extracelular, con el objetivo de facilitar la extravasación de células inmunes, también favorecen el crecimiento del tumor. (24) Finalmente, es posible que los neutrófilos puedan dar lugar en el tumor a MDSCs, cuyo papel se discute a continuación (25).

Células supresoras derivadas de precursores mieloides (MDSCs)

El término células supresoras derivadas de precursores mieloides (MDSCs) hace referencia a un conjunto heterogéneo de células mieloides inmaduras con **funciones inmunosupresoras** que se encuentran en algunas situaciones patológicas como el cáncer. En el caso del cáncer se ha visto que la secreción de GM-CSF, IL-1 β , VEGF y PGE2 estimula la expansión y acumulación de MDSCs en el tumor (10).

Las MDSCs pueden inhibir las funciones de los linfocitos a través de diversos mecanismos: (a) producción de citoquinas inmunosupresoras como el TGF- β , (b) degradación de arginina y cisteína, dos aminoácidos necesarios para la función de los linfocitos T, (c) inhibición de la activación del linfocito T por nitrosilación de su TCR e (d) inducción de la diferenciación de células T reguladoras, cuyas funciones inmunosupresoras se comentarán más adelante (10).

Células NK

Las células NK (asesinas naturales o "*natural killer*") son células del sistema inmune con capacidad **citotóxica** por lo que son muy útiles en la respuesta antitumoral. Aunque las células NK comparten los mismos mecanismos efectores que los linfocitos T CD8⁺, difieren en su activación, las células NK no tienen TCR y su activación no es específica de antígeno puesto que pertenecen a la inmunidad innata. Las células NK se dividen en dos subtipos dependiendo de la expresión de su marcador de membrana CD56. Por un lado las células **CD56^{dim}** expresan menos CD56 pero expresan gran cantidad de CD16A (Fc γ RIIIa) por lo que producen respuestas citotóxicas potentes y son el subtipo de células NK más abundantes en sangre. Por un lado las células **CD56^{bright}** expresan gran cantidad de CD56 pero tienen baja expresión de CD16A, por lo que presentan menor capacidad citotóxica, aunque producen gran cantidad de citoquinas como el IFN- γ (26).

Las células NK, así como los CTLs de los que hablaremos a continuación, disponen de dos mecanismos citotóxicos, la exocitosis granular y la expresión de ligandos mortales. La **exocitosis granular** consiste en la liberación de gran cantidad de gránulos que contienen dos proteínas con capacidad citotóxica: perforina y granzimas (gzms). La perforina forma poros en la membrana de la célula diana a través de los cuales entran las granzimas, una familia de proteasas que cortan diferentes sustratos, incluidas las caspasas en el caso de la gzmB, activando el proceso de apoptosis en la célula diana. Por otro lado, la **expresión de ligandos mortales** consiste como su nombre indica en la expresión de ligandos en la membrana o su

secreción asociada a microvesículas, que cuando se unen a proteínas específicas en la membrana de la célula diana inducen la muerte por apoptosis de esta célula. Algunos ejemplos de estos ligandos son FasL y TRAIL que se unen respectivamente a Fas y DR4/DR5 en la superficie de la célula diana. Además, tanto los CTLs como las NK secretan **IFN- γ** , una citoquina que potencia la actividad citotóxica de CTLs y NKs y que tiene otras importantes funciones antitumorales que comentaremos más adelante (27).

La activación de las células NK depende del **balance entre las señales activadoras e inhibitoras** que reciba la célula a través de los diferentes receptores que expresan. Esta regulación debe permitir el ataque a lo perjudicial sin generar reacciones autoinmunes. Vamos a comentar las funciones de tres de ellos, no obstante, debemos tener en cuenta que las células NK expresan muchos más. En primer lugar los **receptores KIR** (*“killer-cell immunoglobulin-like receptors”*) interaccionan con las moléculas de MHC de clase I expresadas por todas las células nucleadas. La mayoría de los receptores KIR son inhibidores pero algunos activan a la célula. La expresión inicial de los KIR es aleatoria, pero conforme la célula madura se modifica la expresión de los KIR para asegurar la defensa manteniendo la autotolerancia. Las células tumorales o infectadas por virus tienden a reducir la expresión del MHC-I, por lo que la célula NK no recibe señales inhibitoras y elimina estas células, esta función se suele denominar “la detección del yo perdido” (28).

Por otro lado expresan **Fc γ RIIIA (CD16A)** el receptor de baja afinidad de la Fc de los anticuerpos IgG. CD16A es un receptor activador que permite a las células NK reconocer y eliminar a las células opsonizadas por anticuerpos de clase IgG. Finalmente comentaremos otro receptor activador, **NKG2D**, que reconoce algunas moléculas que normalmente están poco presentes en la membrana de célula sanas pero cuya expresión aumenta en respuesta a una infección o transformación tumoral. Estas moléculas se conocen como moléculas de estrés celular y actúan como señales de peligro. Un ejemplo de estas moléculas es MICA y MICB, dos proteínas similares al MHC-I pero que no presentan antígenos (28).

Finalmente, cabe destacar la existencia de las **células NKT**, un subtipo de linfocitos T, que expresan algunos de los receptores característicos de las células NK, algunas subpoblaciones de células NKT expresan CD16, y de los linfocitos T $\alpha\beta$. A diferencia de estos últimos el TCR de las células NKT presenta muy poca variabilidad y reconoce antígenos lipídicos presentados por CD1 (una molécula similar al MHC-I pero sin variabilidad). El tipo de células NKT más estudiadas con las iNKT (*“invariant”*) que expresan un TCR formado siempre por las mismas cadenas, por lo que siempre reconoce el mismo antígeno. Las células NKT pueden ejercer las funciones citotóxicas que comparten las células NK y los CTLs, y además también pueden ejercer las funciones regulatorias características de los linfocitos Th. Las células NKT parecen ser eficaces en la respuesta inmune antitumoral, no obstante, sus efectos en concreto se siguen investigando (29).

Linfocitos T citotóxicos (CD8⁺)

Los linfocitos T CD8⁺ son células del sistema inmune adaptativo puesto que generan respuestas inmunes específicas de antígeno en función del TCR que exprese en su membrana. Los linfocitos T circulan por el organismo en un estado inactivo denominado linfocito T *naïve*, que se activan cuando reconocen a su antígeno diana y siempre que se hayan activado previamente las células dendríticas encargadas de proporcionar la señal de coestimulación por B7. Los linfocitos T CD8⁺ activados se denominan CTLs y son capaces de eliminar a las células que presenten su antígeno diana asociado al MHC de clase I en su membrana, para ello utilizan las herramientas de exocitosis granular y ligandos morales explicadas en el apartado anterior.

Los linfocitos T CD8⁺ son muy eficaces en la **respuesta inmune antitumoral** ya que gracias a su capacidad citotóxica pueden eliminar a las células tumorales. De hecho, hay estudios en muchos tipos de cáncer diferentes en los que se observa que cuanto mayor es la infiltración de linfocitos T en el tumor, mejor es el pronóstico del paciente (30). Sin embargo, el ambiente inmunosupresor que se genera en el TME hace que la actividad de los CTLs se reduzca cuando estos llegan al tumor, de hecho la mayoría de los linfocitos T infiltrados en el tumor se encuentran en estados de anergia o exhaustos. Los linfocitos T entran en **anergia** cuando reconocen su antígeno diana a través del TCR pero no reciben la señal de coestimulación por B7, esto puede ocurrir porque, aunque el tumor genere antígenos tumorales específicos, normalmente no produce suficiente daño tisular como para activar correctamente a las células dendríticas. Los linfocitos T en anergia no son activos y si persiste esta falta de coestimulación acaban muriendo (31). Por otro lado, los **linfocitos T exhaustos** se generan en las infecciones crónicas y algunos tumores por la exposición prolongada al antígeno y señales inflamatorias. Los linfocitos T exhaustos van perdiendo progresivamente sus funciones citotóxicas pero no completamente y producen menos citoquinas, pero no se diferencian a células T de memoria (32).

Debido al potencial de los linfocitos T CD8⁺ en la respuesta antitumoral muchas **inmunoterapias** se basan en mejorar la eficacia de estos, como por ejemplo la activación de células dendríticas *ex vivo* con antígenos tumorales para favorecer la presentación antigénica o la generación de células CAR-T que son linfocitos T CD8⁺ modificados genéticamente para que expresen un TCR sintético que reconozca algún antígeno tumoral (33).

Linfocitos T colaboradores (CD4⁺) o Th

Los linfocitos T CD4⁺ se activan de la misma forma que los linfocitos T CD8⁺ con la única diferencia de que reconocen el antígeno presentado por una molécula de MHC de clase II. La función de los linfocitos T CD4⁺ es **soportar la respuesta inmune** liberando citoquinas y otras señales necesarias para activar y mantener la función de las células inmunes, de ahí que se les denomine colaboradores o "*helper*" (Th). En este sentido se han descrito varios subtipos de linfocitos Th dependiendo de las funciones que realizan. Los linfocitos Th se activan en el

ganglio linfático, algunos ejercen su función ahí, mientras que otros se desplazan a los tejidos (34).

La polarización hacia un subtipo en concreto de linfocito Th depende de las citoquinas presentes en el momento en el que se produce su activación, la presencia de determinadas citoquinas activa un factor de transcripción específico que estimula la síntesis de las citoquinas características de cada subtipo de linfocito Th. No obstante, la polarización hacia una respuesta no es definitiva, cambios en las citoquinas presentes pueden llevar a la repolarización hacia un subtipo diferente de linfocito Th (34).

Tabla 1. Subtipos de respuestas Th

	Th1	Th2	ThF	T reg
Citoquina polarizante	IL-12	IL-4	IL-6	TGF-β
Factor de transcripción	T-Bet	GATA3	Bcl.6	FoxP3
Citoquinas efectoras	IFN-γ	IL-4, IL-5	IL-21	IL-10
Respuesta principal	Respuesta celular (CTLs, macrófagos, NKs)	Defensa frente a parásitos (IgE)	Respuesta humoral (IgG)	Suprime la respuesta inmune

Fuente: Kaplan et al. 2015 (34).

Los **linfocitos Th1** producen como principal citoquina efectora el IFN-γ, un interferón de tipo II que estimula una respuesta inmune celular muy útil en la lucha contra infecciones virales y el cáncer (35). Aunque los linfocitos Th1 son los principales productores de IFN-γ también la secretan los CTLs, las células NK activadas y los macrófagos M1 (36).

Por otro lado, los **linfocitos Th2** producen citoquinas que estimulan el cambio de clase de los anticuerpos, llegando el linfocito B a producir IgE, y la actividad de eosinófilos y basófilos, por lo que son más útiles en la defensa contra parásitos. En cuanto a los **linfocitos ThF** expresan gran cantidad de IL-21 por lo que son muy útiles para regular la maduración de los linfocitos B en los centros germinales y la mejora de la afinidad de los anticuerpos (35).

Por último, los **linfocitos T reguladores** (Treg) tienen una función fuertemente inmunosupresora a través de diversos mecanismos: (a) secretan gran cantidad de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF-β, (b) expresan altos niveles del receptor de IL-2 de alta afinidad por lo que compiten con los linfocitos T por la IL-2 que estimula su activación, (c) inhiben la activación de las células presentadoras de antígeno, (d) expresan los puntos de control inmunitarios CTLA-4 y PD-1 y (e) pueden matar directamente a los linfocitos T a través del mecanismo de exocitosis granular (37).

Existen otros tipos de linfocitos Th (como Th17, Th9, ...) que modulan la respuesta inmune, detectándose varios subtipos de linfocitos Th en el microambiente tumoral (35). Una predominancia de linfocitos Th1 se correlaciona un mejor pronóstico del paciente (38), sin

embargo, algunos tipos de tumores secretan citoquinas que polarizan la respuesta hacia Th2 evitando así la diferenciación a Th1 (35,39) o producen TGF- β para inducir la diferenciación de células Treg que inhiben a los linfocitos que infiltran el tumor (37).

Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son un tipo de linfocitos T poco abundantes que expresan un TCR formado por las cadenas $\gamma\delta$, que no reconoce antígenos presentados por moléculas de MHC sino que generalmente reconocen pequeñas moléculas fosforiladas, como el isoprenil pirofosfato (PPI) que se acumula en las células tumorales por la desregulación de la ruta del mevalonato, o antígenos lipídicos asociados a CD1. Además, expresan receptores de activación como PRRs o NKG2D propios de la inmunidad innata. Una vez activados los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden ejercer las funciones tanto de los linfocitos Th como de los CTLs ejerciendo una función mayoritariamente antitumoral (40).

Linfocitos B

Los linfocitos B son células del sistema inmune adaptativo que una vez activados se encargan de producir anticuerpos específicos para un antígeno. La activación de un linfocito B requiere la colaboración de un linfocito Th previamente activado, ya que solo estos expresan CD40L que es necesario para proporcionar la señal de coestimulación (41).

Los anticuerpos pueden ser útiles en la respuesta antitumoral porque pueden activar **respuestas efectoras**, como son la ADCC, la ADCP y la CDC; que pueden eliminar a las células tumorales. En el caso de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (**ADCC**, por sus siglas en inglés) una célula inmune reconoce a través de sus Fc γ Rs a una célula tumoral opsonizada y la elimina. Las principales células efectoras de la ADCC son las células NK que liberan gránulos con granzima y perforina como se ha explicado anteriormente. No obstante, macrófagos y neutrófilos también pueden ejercer ADCC liberando distintas sustancias antimicrobianas y enzimas que producen ROS para eliminar a la célula tumoral (42). Por otro lado, los principales efectores de la fagocitosis dependiente de anticuerpos (**ADCP**, por sus siglas en inglés) son los **macrófagos** que reconocen a las células tumorales opsonizadas a través de sus Fc γ Rs lo que induce la fagocitosis de la célula tumoral (43). Cabe destacar que las células inmunes son capaces de fagocitar de forma independiente a la presencia de anticuerpos, pero la ADCP aumenta la eficacia.

Tanto para la ADCC como la ADCP es fundamental la presencia de **receptores de la fracción constante de los anticuerpos (FcR)** (44). Los anticuerpos más abundantes en la respuesta inmune son las IgG, los receptores que reconocen a estos anticuerpos pertenecen a la familia Fc γ R cuyos miembros se resumen en la Tabla 2 y la mayoría de ellos activan a la célula inmune que los expresa. Además de la familia Fc γ R existen receptores para el resto de isotipos de anticuerpos (Fc α R, Fc μ R y Fc ϵ R) y un miembro especial, el FcR neonatal (FcRn), que participa en la transferencia de los anticuerpos maternos a la leche y en el reciclado de los anticuerpos para aumentar su vida media en sangre (45).

Tabla 2. Receptores de la fracción Fc de los IgG (FcγR)

	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB
CD	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B
Función	Activar	Activar	Inhibir	Activar	Activar	Señuelo
Afinidad	Alta	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja
Células donde se expresa	Macrófagos DC	Macrófagos DC Neutrófilos	DC Linfocitos B	Macrófagos Neutrófilos Células NK	Macrófagos Células NK	Neutrófilos

Fuente: Bruhns et al. 2015 (45).

Finalmente, la citotoxicidad dependiente del complemento (**CDC**) consiste en la activación del sistema del complemento por los anticuerpos cuando se encuentran unidos a la superficie de una célula. El sistema del complemento consiste un conjunto de proteínas que circulan por la sangre en forma inactiva pero cuando se activan generan poros en la membrana de la célula provocando la lisis celular. En este caso la activación no depende de FcR sino que es el componente C1 del complemento el que reconoce al anticuerpo y activa el sistema (44).

No obstante, cabe destacar que el reconocimiento de los inmunocomplejos por parte de los macrófagos y neutrófilos a través de sus FcR puede activar otros mecanismos de estas células con **funciones protumorales** como ya se ha comentado. Pueden liberar citoquinas proinflamatorias y enzimas para remodelar la matriz extracelular favoreciendo la angiogénesis y metástasis. Además, la activación del complemento también va a generar señales proinflamatorias. También se ha observado la existencia de **linfocitos B reguladores** que producen anticuerpos IgA, gzmB y citoquinas inmunosupresoras, y se ha visto en modelos de ratón que inhiben la capacidad citotóxica de los linfocitos T. Por lo tanto, de nuevo los linfocitos B son células inmunes que pueden tener funciones pro y antitumorales (41)

Estrategias del tumor para evadir al sistema inmune

El sistema inmune como se ha comentado restringe la aparición de células tumorales a través del proceso de inmunovigilancia, no obstante, los tumores que evolucionan hasta la fase de escape y se manifiestan clínicamente deben haber evadido la respuesta del sistema inmune. Se han observado una gran variedad de mecanismos a través de los cuales el tumor puede evadir la respuesta inmune, pero normalmente pueden encuadrarse en uno de estos grupos: modificaciones de las células tumorales y generación de un ambiente inmunosupresor (46).

Modificaciones de las células tumorales. Debido a la presión que ejerce el sistema inmune eliminando las células más inmunogénicas, en la fase de escape predominan las células que expresan menos antígenos tumorales. Además es habitual que las células tumorales dejen de expresar proteínas implicadas en los mecanismos de presentación antigénica (como por ejemplo TAP1, MHC-I o β2-microglobulina) (10), o los ligandos de los receptores activadores de las células NK (47). Esto puede ocurrir por mutaciones en sus genes o regulación epigenética. En el mismo sentido las células tumorales pueden volverse insensibles al IFN-γ porque dejen de expresar su receptor o los componentes de su cascada de transducción de

señal, lo cual interfiere con sus funciones como la estimulación de la síntesis del MHC o la inhibición de la proliferación celular (48).

Los cambios descritos hasta ahora en las células tumorales van encaminados a ocultarse del sistema inmune, no obstante, una alternativa diferente es volverse resistente a las funciones efectoras. En este sentido las células tumorales pueden expresar formas inactivas de los receptores de ligandos morales (Fas y el receptor de TRAIL), aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o expresar los ligandos de los puntos de control inmunitarios (CTLA-4 y PD-1) para inactivar a los linfocitos T (10).

Generación de un ambiente inmunosupresor. En el microambiente tumoral hay una alta concentración de citoquinas inmunosupresoras, quimiocinas que atraen a células inmunes con funciones inmunosupresoras y otras moléculas que inhiben al sistema inmune. Las principales citoquinas inmunosupresoras en el microambiente tumoral son el TGF- β y la IL-10 (10). Las células tumorales también secretan metabolitos del esteroide, estos inhiben la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en las células dendríticas, necesario para que cuando estas células se activen en el tumor puedan migrar a los ganglios linfáticos para presentar los antígenos tumorales a los linfocitos (49). Otra molécula secretada por las células tumorales es la enzimaIDO que metaboliza el triptófano lo que resulta en la inhibición de las células T (50).

Las condiciones del microambiente tumoral favorecen el reclutamiento y activación de células inmunes con funciones inmunosupresoras y protumorales. Por ejemplo, la presencia de altas concentraciones de TGF- β polariza a los linfocitos Th hacia el fenotipo Treg inmunosupresor (37). Los macrófagos se polarizan a macrófagos M2 que participan en la remodelación de la matriz extracelular, reparación tisular y angiogénesis lo que favorece el crecimiento del tumor y la metástasis. En cuanto a los neutrófilos predomina la polarización hacia N2 que también favorecen el crecimiento tumoral. Además, los macrófagos y neutrófilos pueden originar MDSCs que ejercen potentes funciones inmunosupresoras (10).

Antígeno Tn

Glicosilación

La glicosilación es la modificación postraduccional más común de las proteínas. Dependiendo del aminoácido al cual se une el glicano se diferencia entre N-glicosilación, el azúcar se une al grupo amino de la cadena lateral de una asparagina, y O-glicosilación, el azúcar se une al grupo hidroxilo de la cadena lateral de una serina o una treonina (51).

En las células sanas la O-glicosilación (Figura 5) se lleva a cabo en el aparato de Golgi por una diversidad de enzimas glicosiltransferasas. El primer paso siempre consiste en la transferencia de una N-acetilgalactosamina (GalNAc) desde la UDP-GalNAc al hidroxilo de una serina o treonina (51). Sobre este primer azúcar pueden actuar dos enzimas glicosiltransferasas. Por un lado está la enzima T sintasa que añade una molécula de galactosa (Gal) al glicano en

crecimiento para formar el denominado núcleo 1 o antígeno T. Por otro lado, podría actuar otra glicosiltransferasa que transfiere una molécula de glucosa sobre la GalNAc para formar el núcleo 3. A partir de este punto, sobre núcleo 1 y núcleo 3 pueden actuar diferentes glicosiltransferasas, las rutas de biosíntesis se ramifican y esto da lugar a la gran diversidad de O-glicanos que se pueden encontrar en la célula (52).

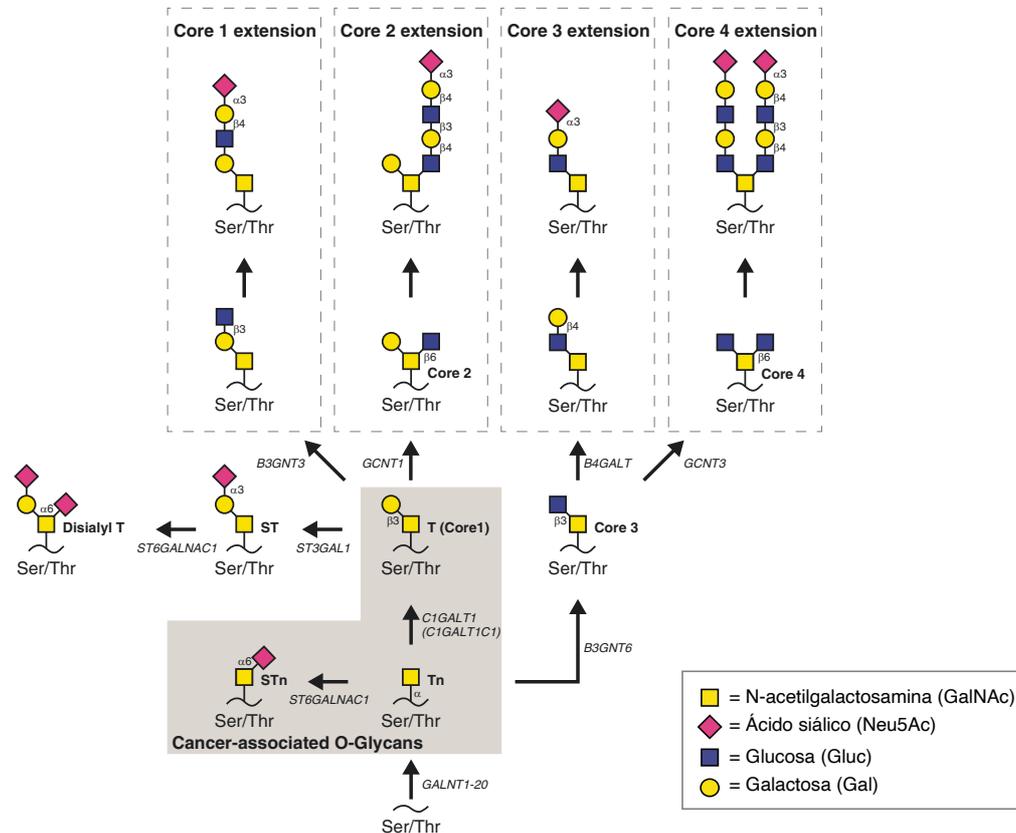


Figura 5. Diagrama general del proceso de O-glicosilación de proteínas que se desarrolla en el aparato de Golgi de las células sanas. En las células cancerosas este proceso se detiene de forma prematura, lo que da lugar a la aparición de O-glicanos truncados que actúan como antígenos glucídicos asociados a tumores (TACAs), aparecen sombreados en marrón. Fuente Rømer et al (53).

O-glicanos asociados al cáncer

En las células cancerosas es común la presencia de O-glicanos truncados, como son los denominados **antígenos T, Tn y sTn** (Figura 5 y Tabla 3). Esto se debe a que el proceso de O-glicosilación se detiene antes de tiempo por la ausencia de enzimas glicosiltransferasas funcionales que puedan elongar los O-glicanos (52). La acumulación de estos antígenos en células cancerosas es consecuencia de la falta de las enzimas glicosiltransferasas que elongan el glicano, bien por mutaciones, cambios en su localización subcelular o modificaciones epigenéticas que repriman su expresión (como la hipermetilación de su promotor) (54).

En algunos tipos de cáncer se ha observado que la expresión de O-glicanos truncados contribuye a la **supervivencia del tumor**. Por ejemplo, se ha observado *in vitro* que la expresión del antígeno Tn en células de cáncer de páncreas aumenta su capacidad de

migración y la supervivencia (55). En cáncer de mama triple negativo, se ha demostrado que la expresión del antígeno Tn en células cancerosas produce tumores más grandes, con mayor potencial de metástasis en el pulmón y peor pronóstico (56). Finalmente, se ha visto que cuando los receptores de lectina tipo C (CLR) de las células dendríticas inmaduras reconocen al antígeno Tn en MUC1 inducen un fenotipo de inmunosupresión y tolerancia (57).

Tabla 3. O-glicanos asociados al cáncer

Nombre	Azúcares que lo forman
Antígeno Tn (Thomsen-nouveau)	GalNAc
Antígeno T (Thomsen-Friedenreichs)	GalNAc-Gal
Antígeno sTn (sialyl-Tn)	GalNAc-Neu5Ac

En definitiva, la expresión de O-glicanos truncados se ha relacionado con un peor pronóstico y una mayor capacidad de metástasis en algunos tipos de cáncer; en otros tumores la presencia de estos antígenos no tiene por qué ser relevante para la supervivencia del tumor. Proporcione o no una ventaja para el tumor, se ha observado que la expresión de O-glicanos truncados es **específica de células cancerosas**, solo se ha encontrado en células tumorales y no en tejidos sanos, por lo que se puede usar como **diana** en tratamientos de inmunoterapia (53). Estos antígenos que están presentes principalmente en células tumorales se denominan antígenos asociados a tumores (TAAs) y en el caso de antígenos glucídicos se denominan TACAs por sus siglas en inglés (“*tumor-associated carbohydrate antigens*”).

Tabla 4. TACAs en cánceres humanos

	Tn	sTn	T
Cáncer de mama	57%	33%	32%
Cáncer colorrectal	51%	80%	20%
Cáncer de pulmón	16%	33%	10%
Cáncer de piel	33%	24%	25%
Cáncer de páncreas	53%	56%	16%
Osteosarcoma	0%	N/D	0%
Médula ósea	0%	0%	N/D
Tumores del SNC	5%	1%	23%

N/D: no determinado

Fuente Rømer et al (53).

Para plantear el uso de alguno de estos TACAs (Tn, sTn o T) como diana en inmunoterapia, es necesario comprobar que no se encuentra en células sanas, para evitar reacciones citotóxicas inespecíficas, y si se encuentra en la membrana de las células, ya que solo así serían accesibles a anticuerpos u otros tratamientos de inmunoterapia basados en estos (p. ej. células CAR-T). Rømer et al. en 2021 analizaron más de 700 tumores con los anticuerpos 5F4 (anti-Tn), 3F1 (anti-sTn) y 3C9 (anti-T). Observaron la expresión de altos niveles de los antígenos Tn, T y sTn en la membrana cánceres humanos derivados de tejidos epiteliales, como en el **cáncer de mama, colon, pulmón, páncreas y piel**. En contraste con los tumores epiteliales, apenas se

ha detectado expresión de O-glicanos truncados en la superficie de células cancerosas derivadas del sistema nervioso central (Tabla 4) (53).

Por otro lado, analizaron la expresión de estos antígenos en tejidos humanos sanos. No detectaron la expresión del antígeno Tn en ninguno de los 30 tejidos analizados, sin embargo, si detectaron expresión del antígeno sTn en el tracto gastrointestinal y del antígeno T en muestras de páncreas y piel. Por ello, debido a la importancia de dirigir específicamente la acción del sistema inmune sobre las células cancerosas y no al tejido sano, el **antígeno Tn** tiene un **mayor potencial como diana** en tratamientos de inmunoterapia (53).

El antígeno Tn puede estar presente en **muchas proteínas diferentes**. Generalmente los carcinomas (como el cáncer de mama, colon, pulmón, páncreas y piel) expresan altos niveles de antígeno Tn asociado a las **mucinas**, mientras que en los tumores derivados del sistema nervioso central se encuentra una menor expresión del antígeno Tn y habitualmente se encuentra asociado a CD43 (sialoporina) (58).

Los anticuerpos en inmunoterapia

Inmunoterapia

La inmunoterapia es una forma de tratamiento del cáncer basada en utilizar o impulsar la respuesta inmune del paciente contra el tumor que normalmente se ha inhibido durante el proceso de desarrollo tumoral. Es un campo actualmente en expansión, con multitud de ensayos clínicos en proceso y nuevas formas de inmunoterapia en fase de investigación (59).

Respecto a los tratamientos convencionales del cáncer como la radioterapia y la quimioterapia, la inmunoterapia es más precisa, el sistema inmune se dirige contra las células tumorales y no contra las células sanas, por lo que previsiblemente la inmunoterapia genera **menos efectos secundarios**. No obstante, algunas formas de inmunoterapia siguen generando efectos secundarios que se relacionan con la sobreestimulación del sistema inmune, estos efectos secundarios pueden ir desde síntomas leves de inflamación hasta casos más graves similares a las enfermedades autoinmunes, aunque generalmente son controlables. Por otro lado, otra ventaja de la inmunoterapia es su capacidad para generar **células de memoria** inmunológica que dan lugar a remisiones duraderas (33,59).

La inmunoterapia ha triunfado donde otros tratamientos no son efectivos, un ejemplo es el caso de Emily Whitehead una niña de 12 años con leucemia que no remitía tras 16 meses de tratamiento de quimioterapia, en 2012 recibió una inmunoterapia de células CAR-T que consiguió eliminar completamente el tumor. En la actualidad Emily sigue libre del cáncer y el tratamiento, denominado Kymriah™, fue aprobado por la FDA en 2017 (60).

Aunque la inmunoterapia ha llegado a la clínica a principios de este siglo la idea fue planteada por William Coley a finales del siglo XIX. Este enfermero trató a pacientes con cáncer con extractos inactivados de *S. pyogenes* y *S. marcescens* consiguiendo la remisión de algunos

tipos de cáncer. No obstante, la falta de reproducibilidad y una explicación científica, y la llegada de la quimioterapia y la radioterapia impidió el desarrollo de este campo, que se retomó a finales del siglo XX gracias a un mayor conocimiento del sistema inmunológico (61).

Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser eficaces para el tratamiento del cáncer, pueden unirse específicamente a las células tumorales y actuar de dos maneras. Por un lado, la unión del anticuerpo puede **impedir la unión de otros factores** necesarios para el crecimiento y la supervivencia del tumor. Este es el caso de Trastuzumab que bloquea HER2, el receptor de un factor de crecimiento, o Cetuximab que bloquea el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por otro lado, la región Fc del anticuerpo es responsable de la **activación de mecanismos efectoros** (ADCC, CDC y ADCP) como se ha explicado (62).

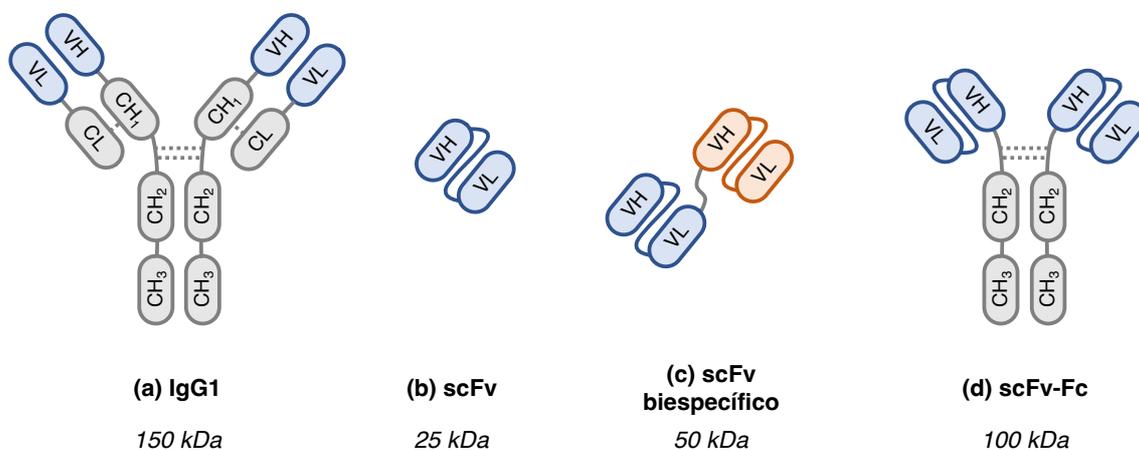


Figura 6. Estructura del anticuerpo IgG1 y moléculas derivadas. Las regiones constantes se representan en gris y las regiones variables encargadas de reconocer al antígeno se representan en color azul o naranja. **(a)** Un anticuerpo natural puede unirse a dos antígenos iguales, **(b)** un scFv solo puede unirse a un antígeno, **(c)** un scFv biespecífico puede unirse a dos antígenos diferentes a la vez y **(d)** un scFv-Fc actúa funcionalmente como un anticuerpo natural pero tiene un tamaño menor. Fuente: elaboración propia.

No obstante, la terapia con anticuerpos tiene que enfrentarse a algunos problemas. Por un lado está la **baja tasa de penetración** en tumores sólidos, solamente el 20% de la dosis administrada llega hasta la superficie del tumor (62). Una solución para incrementar la penetración en el tumor es su conversión en un **scFv** (“single-chain variable fragment”). Un scFv está formado únicamente por los dos dominios variables (VH y VL) de un anticuerpo unidos por una secuencia flexible (Figura 6 b), de esta forma el scFv mantiene la especificidad del anticuerpo pero es mucho más pequeño. La principal desventaja de un scFv es que al carecer de la región Fc no tiene las propiedades efectoras de los anticuerpos y su vida media en sangre es mucho menor porque no participa en el proceso de reciclado que depende de receptores FcRn (63). También, pueden expresarse **scFv-Fc** (Figura 6 d) que siguen siendo más pequeños que un anticuerpo completo y pueden activar las funciones efectoras. En este sentido se ha demostrado que solamente con incluir los dominios CH2 y CH3 de la región Fc

es suficiente para activar estas funciones efectoras, pero tienen que estar correctamente glicosilado y dimerizado, por lo que a diferencia de los scFv que pueden expresarse en bacterias o levaduras, los scFv-Fc deben expresarse en células de mamífero y resulta más costoso. Otra alternativa es conjugar los scFv con drogas de quimioterapia u otras toxinas para dirigirlas específicamente hacia el tumor y reducir sus efectos secundarios (62).

Otro problema que puede disminuir la eficacia de los anticuerpos es el **ambiente inmunosupresor** del microambiente tumoral, de esta forma la unión del anticuerpo a los FcR puede no ser suficiente para activar las funciones efectoras (62). Para combatir este problema muchos de los anticuerpos utilizados en inmunoterapia tienen su **Fc modificada** para aumentar su afinidad por el receptor y generar estímulos más potentes capaces de activar a las células inmunes en el contexto del microambiente tumoral. Por ejemplo, el anticuerpo Rituximab tiene cambios en algunos aminoácidos de su Fc que interactúan con el receptor y en su patrón de glicosilación (64). Otra opción es generar **anticuerpos biespecíficos** (Figura 6 c) que por un lado se unen al tumor y por otro lado interactúan con las células inmunes (p. ej. una célula NK) activándolas y acercándolas a la célula tumoral (62).

scFv biespecíficos de unión a células NK (BiKE)

Los scFv biespecíficos de unión a células NK, también denominados en inglés “*bispecific killer cell engager*” o BiKEs, están formados por dos scFv conectados por una secuencia flexible (Figura 6 c). Uno de los scFv se une a CD16A en la membrana de la célula NK y el otro reconoce un antígeno tumoral. Como se ha explicado previamente el receptor CD16A o FcγRIIIa es un receptor activador de las células NK que reconoce la fracción Fc de los anticuerpos IgG. De hecho cuando CD16A reconoce al anticuerpo media una potente activación de la célula NK sin necesidad de coestimulación por otros receptores, por lo que es muy buena diana para los BiKE. Los BiKE utilizan anticuerpos anti-CD16 que se unen a este receptor induciendo la activación de la célula NK sin necesidad de otros estímulos (65).

Los BiKE (Figura 7 c) presentan la ventaja respecto a los anticuerpos convencionales (Figura 7 a) de que tienen mayor afinidad por CD16. El BiKE se une a CD16 a través de un scFv por lo que su **afinidad es muy alta** ($K_d = 10^{-9}$), mientras que la afinidad del receptor CD16 por la Fc de un anticuerpo es baja ($K_d > 10^{-6}$). Este aumento de la afinidad permite una mayor activación de las células NK por parte de los BiKE en comparación con los anticuerpos convencionales, lo que puede contrarrestar el ambiente inmunosupresor generado por el tumor. Además, la eficacia de los anticuerpos convencionales *in vivo* está atenuada por la presencia de otros anticuerpos en el plasma que **saturan los receptores CD16** de las células NK, por lo que se establece una competencia entre los anticuerpos que no ocurre en el caso de la terapia con BiKEs, puesto que el anti-CD16 del BiKE se une a una región diferente del CD16A (65). Por ejemplo, el BiKE CD16xHER2 desarrollado a partir del anticuerpo Trastuzumab ha demostrado una mayor capacidad para inducir ADCC con respecto a Trastuzumab en ensayos *in vitro* (66). Otro ejemplo destacable es el BiKE CD16xCD33 que ha

demostrado *in vitro* ser capaz de activar las células NK obtenidas de pacientes con tumores cuyo microambiente tumoral está inhibido por la presencia de MDSCs (67).

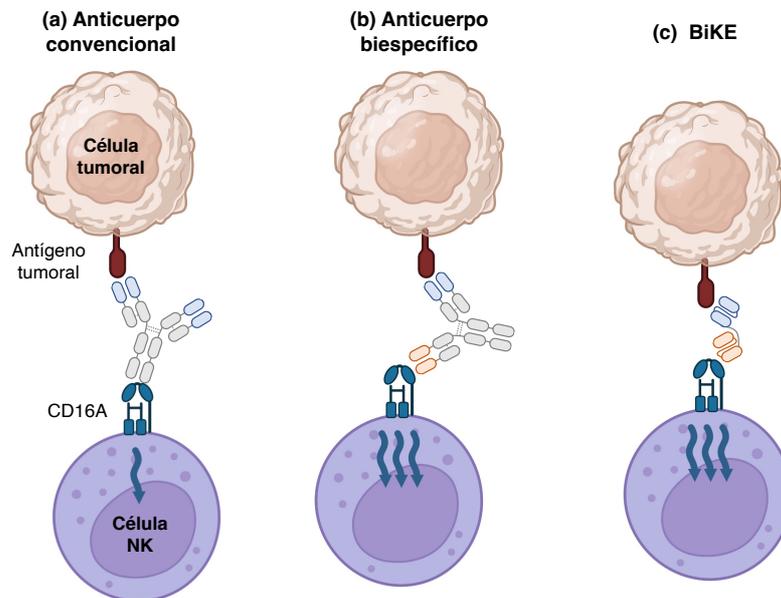


Figura 7. Funcionamiento de los anticuerpos convencionales, anticuerpos biespecíficos y BiKE en la activación de las células NK frente al tumor. El número de flechas desde CD16 al interior celular represente (no a escala) la intensidad de la activación de la célula NK. Fuente: elaboración propia.

Otra ventaja de los BiKE es que al estar formados por dos scFv conectados tienen un tamaño bastante inferior al de un anticuerpo lo que facilita su **penetración en tumores sólidos**. No obstante, la desventaja es que se **eliminan rápidamente** por el riñón por lo que es necesario administrar dosis altas y frecuentes del fármaco. Aunque al tratarse de un único polipéptido que no requiere la formación de puentes disulfuro ni glicosilaciones para su funcionalidad pueden expresarse en sistemas de bacterias o levaduras que resultan mucho más rápidos y **económicos**, al contrario que los anticuerpos que deben expresarse en cultivos de células de mamífero que son mucho más caros (65).

Es cierto que existen **anticuerpos biespecíficos** (Figura 7 b), estos son anticuerpos completos pero modificados para que, en lugar de unirse a dos antígenos iguales, se unan por un lado al antígeno tumoral y por el otro a CD16. Al igual que los BiKE son más eficaces a la hora de activar a las células NK contra el tumor que un anticuerpo convencional. No obstante tienen dos desventajas principalmente. La primera consiste en que al mantener la fracción Fc pueden ser reconocidos por los FcR de otras células inmunes, como macrófagos y neutrófilos, que dependiendo de las condiciones del microambiente tumoral pueden polarizarse hacia fenotipos protumorales como se ha explicado anteriormente. Los BiKE al carecer de la fracción Fc no van a generar estos posibles efectos indeseados, aunque es cierto que el anti-CD16 puede unirse a CD16A en los macrófagos y activarlos, o al CD16B en los neutrófilos pero en este caso no generaría ningún efecto porque este receptor tiene una función de señuelo. La otra desventaja de los anticuerpos biespecíficos es que su producción es muy compleja puesto que están formados por cuatro cadenas polipeptídicas diferentes que deben

ensamblarse adecuadamente. La unión al azar de estas cadenas genera 16 combinaciones posibles, de las cuales solo 2 se corresponden con la configuración de un anticuerpo biespecífico funcional (62).

Finalmente se han desarrollado moléculas similares a los BiKE para activar a los linfocitos T, las otras células del sistema inmune con capacidad citotóxica. Estas moléculas se denominan scFv biespecíficos de unión a células T, en inglés “*bispecific T cell engager*” o **BiTE**, y se unen por un lado al antígeno tumoral y por el otro a CD3. La molécula CD3 es la encargada de la transducción de señal del TCR por lo que puede activar al linfocito T; no obstante, la activación del linfocito T *naïve* requiere además de la señal de coestimulación de CD28. En este sentido los BiTE se piensa que serían más eficaces para reactivar a los linfocitos T infiltrados en el tumor cuya actividad se ha reducido por el microambiente tumoral que para activar a los linfocitos T *naïve*. Por otro lado, también se han desarrollado scFv trispecíficos, denominados en inglés “*trisppecific killer engager*” o **TriKE**, que pueden unirse a dos antígenos tumorales y a CD16A o CD3 para activar a la célula NK o al linfocito T respectivamente (65).

Podemos comparar los BiKE, BiTE o TriKE con la terapia con **células CAR-T**, estas moléculas tienen el mismo objetivo que los sistemas CAR-T, activar células con capacidad citotóxica contra el tumor. En la terapia con CAR-T los linfocitos del paciente se modifican genéticamente para que reconozcan un antígeno tumoral y se activen, la logística de esta terapia es compleja y los efectos secundarios son frecuentes, no obstante, produce respuestas antitumorales robustas. En el caso de las moléculas biespecíficas o trispecíficas se unen a CD3 o CD16 en la membrana de los linfocitos T o células NK del paciente para activarlos, sin necesidad de modificarlos *ex vivo* por lo que su uso sería más sencillo y se espera que tengan una eficacia similar a la de las células CAR-T, no obstante, como la mayoría están todavía en fase de investigación por lo que no hay datos suficientes sobre su eficacia.

Como se acaba de comentar, a pesar de su gran potencial para el tratamiento del cáncer ningún BiKE ha sido aprobado por las agencias regulatorias todavía. No obstante, AFM24 un BiKE para el tratamiento de tumores EGFR positivos inició los ensayos clínicos a finales de 2021 (ClinicalTrials.gov: NCT05099549) (68). Al no haber ningún BiKE en fases avanzadas de los ensayos clínicos desconocemos sus posibles efectos secundarios. En el caso de los BiTE hay al menos una molécula aprobada, es el caso de Blinatumomab (Blincito) un BiTE CD3xCD19 en cuyos ensayos clínicos el 43% de los pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) que no respondía a otros tratamientos mejoró, y en la mayoría de ellos el cáncer desapareció. No obstante, en algunos pacientes el Blinatumomab tuvo efectos secundarios relacionados con una excesiva activación de los linfocitos T (69).

Antecedentes y objetivos

Antecedentes

G2D11

El anticuerpo G2D11 es específico para **dos antígenos Tn consecutivos** con una dependencia mínima del fondo proteico. Fue desarrollado por Persson et al. en 2017 a partir de uno de los anticuerpos producidos por un ratón inmunizado con una variedad de glicopéptidos. Para evaluar su especificidad analizaron la unión de G2D11 a microarrays con diferentes péptidos que contenían combinaciones del antígeno Tn, sTn y del antígeno del grupo sanguíneo A. Además determinaron su constante de disociación ($K_d = 1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$) que concuerda con los valores de afinidad obtenidos habitualmente para los anticuerpos (58)

2D9

Las mucinas son una familia de proteínas altamente glicosiladas que se expresan en muchos epitelios, MUC1 es el miembro más estudiado de la familia de las mucinas, es una proteína transmembrana con una región extracelular formada por un número variable de repeticiones de una secuencia de 20 aminoácidos altamente conservados (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA) que consta de 5 sitios potenciales para la O-glicosilación. Se ha observado que gran parte de los carcinomas aumentan la expresión de MUC1 y esta presenta O-glicanos truncados como el antígeno Tn. El anticuerpo 2D9 se une al **antígeno Tn o sTn en la proteína MUC1**, más concretamente en la región GSTA de las repeticiones, a diferencia de la mayoría de los anticuerpos generados contra MUC1-Tn que se unen a la región PDTR. Este anticuerpo fue desarrollado por Tarp et al. en 2007 a partir de uno de los anticuerpos producidos por un ratón inmunizado con las repeticiones de MUC1 con O-glicanos truncados (70).

LSIV21

El anticuerpo LSIV21 desarrollado por Reusch et al. en 2014 es el primer anticuerpo capaz de **unirse específicamente a CD16A** expresado por las células NK y los macrófagos, pero no a CD16B en los neutrófilos. Los anticuerpos anti-CD16 desarrollados previamente eran capaces de unirse tanto a CD16A como a CD16B puesto que tienen un 96% identidad en su secuencia. La afinidad de LSIV21 para CD16A es muy elevada ($K_d = 10^{-9} \text{ M}$) mientras que no se une a CD16B. Esto es importante para el desarrollo de un BiKE puesto que los neutrófilos representan hasta el 70% de los leucocitos mientras que las células NK solo suponen alrededor del 3%. De esta forma un anti-CD16 capaz de unirse a las formas A y B se uniría mayoritariamente a los neutrófilos. No obstante, cabe destacar que la unión a CD16B no activaría al neutrófilo puesto que este receptor tiene una función señuelo porque no tiene dominio intracelular (Tabla 2). De este modo no generaría efectos secundarios, pero quedaría poca cantidad de anticuerpo disponible para activar a las células NK y sería necesario

administrar grandes dosis. Finalmente se ha visto que la unión de LSIV21 a CD16A es capaz de **activar a la célula NK** e inducir respuestas de ADCC contra células tumorales (71).

Inmunoterapias anti-Tn

Los experimentos *in vitro* han demostrado que los **anticuerpos anti-Tn** pueden reducir el crecimiento del tumor a través de varios mecanismos. Por un lado, los anticuerpos pueden activar las herramientas de ADCC y CDC que resultan en la eliminación de las células tumorales (72). Por otro lado, se ha visto que cuando el antígeno Tn se expresa en receptores esenciales para el crecimiento del tumor, como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la unión del anticuerpo bloquearía la señal a través de este receptor resultando en una reducción del crecimiento del tumor. El antígeno Tn se expresa solamente en células tumorales pero el EGFR se expresa también en células sanas, de esta forma un anticuerpo que reconozca Tn-EGFR permite dirigir la terapia específicamente a las células tumorales en comparación con un anticuerpo que reconozca solamente al EGFR (73). La unión del anticuerpo a Tn-EGFR iniciaría las dos respuestas: bloquearía su función como receptor del factor de crecimiento e iniciará la ADCC y CDC contra la célula tumoral.

Entre los anticuerpos en fases preclínicas destaca **5E5** puesto que ha demostrado potentes respuestas de ADCC y CDC *in vitro* contra líneas celulares que expresan el antígeno Tn. El anticuerpo más avanzado en los ensayos clínicos es **Gatipotuzumab** (PankoMab-GEX™) que reconoce el antígeno Tn en la secuencia PDTRP que se encuentra en la proteína MUC1. Este anticuerpo mostró una gran capacidad para inducir ADCC *in vitro* y el ensayo clínico de fase I con pacientes con tumores sólidos avanzados demostró que era seguro. No obstante, en la fase II, Gatipotuzumab no obtuvo mejores resultados que el placebo a la hora de mantener la respuesta tras el tratamiento de quimioterapia en pacientes con cáncer de ovario. Tras este fracaso en 2021 se realizó otro ensayo clínico de fase I en combinación con un anticuerpo anti-EGFR en el que se vio que era seguro y sí que se observó eficacia contra cáncer colorrectal (72).

Hay muchos anticuerpos anti-Tn en fases de investigación preclínica (p. ej. CU-1, MLS128, SM3, KM3413, 5E5 o PankoMab) no obstante su **eficacia antitumoral es bastante variable**. Esto puede explicarse por el hecho de que el antígeno Tn es una estructura demasiado simple para conformar por sí mismo un epítipo, por lo que la mayoría de los anticuerpos anti-Tn reconocen el antígeno junto con la secuencia peptídica a la que están unidos o estructuras formadas por varios antígenos Tn consecutivos, lo que podría ser responsable de la variabilidad en la respuesta (72). En nuestro caso, el anticuerpo G2D11 reconoce dos antígenos Tn consecutivos con una dependencia mínima del fondo peptídico por lo que podría unirse al antígeno Tn en cualquier proteína (58). 2D9 se une al antígeno Tn en la proteína MUC1 que es muy abundante en los epitelios por lo que sería útil para el tratamiento de carcinomas (70). A pesar de la variedad de anticuerpos anti-Tn no hemos encontrado en la bibliografía **ningún estudio de anticuerpos biespecíficos, BiKE, BiTE o TriKE** que utilicen el antígeno Tn como diana, por lo que nuestras proteínas serían novedosas en el campo. No

obstante, como se ha explicado en la introducción, si hay ejemplos de BiKE dirigidos contra otros antígenos que han demostrado ser más eficaces que los anticuerpos convencionales correspondientes.

También cabe destacar que se está desarrollando una **vacuna** para impulsar la respuesta inmune anti-Tn en pacientes susceptibles de padecer o reincidir en tumores que expresen el antígeno Tn. Esta vacuna está compuesta por el toxoide tetánico que porta el antígeno Tn junto con otros glicanos asociados al cáncer. En el ensayo clínico de fase I los 7 pacientes desarrollaron altos niveles de anticuerpos anti-Tn (72). Finalmente comentar también que hay un sistema de **CAR-T**, linfocitos T modificados genéticamente para reconocer un antígeno tumoral, basado en el anticuerpo 5E5 que ha demostrado ser efectivo en modelos tumorales de ratón y ahora se encuentra en la fase I de los ensayos clínicos (74).

Hipótesis y objetivo

En este trabajo se plantea la **hipótesis** de que se podrían generar fragmentos de anticuerpos frente al antígeno Tn que eliminen directamente el tumor o que activen otras células inmunes para eliminarlo.

El **objetivo** principal de este trabajo es desarrollar fragmentos de anticuerpos biespecíficos que activen células NK (BiKE) para eliminar células tumorales que expresen el antígeno Tn. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener los plásmidos que codifican las distintas proteínas: BiKE para el antígeno Tn (G2D11-antiCD16 y 2D9-antiCD16), los correspondientes scFv-Fc para utilizarlos como control (G2D11-Fc y 2D9-Fc), y una variante de G2D11 mutado que no es capaz de unirse al antígeno G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc.
- Expresar las diferentes proteínas en células HEK 293 6F y purificarlas por cromatografía.
- Analizar el perfil de expresión del antígeno Tn en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer.
- Determinar por citometría de flujo la capacidad de los Fc y de los anti-CD16 que forman parte de los BiKE para unirse a células NK obtenidas de donantes sanos.
- Analizar el perfil de citotoxicidad de las proteínas producidas en cultivos *in vitro*.
- Analizar la funcionalidad de los scFv-Fc para inducir citotoxicidad mediada por el sistema del complemento (CDC) en cultivos *in vitro* de líneas tumorales.
- Analizar la funcionalidad de los scFv-Fc y de los BiKE producidos para inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) en co-cultivos *in vitro* de líneas tumorales y células NK obtenidas de donantes sanos.

Materiales y métodos

Diseño de las secuencias y del vector

El primer paso en el diseño de un scFv es identificar el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. En cuanto a la secuencia que une los dos dominios es fundamental tanto su composición como su longitud. Se utilizan secuencias de glicina y serina ya que son aminoácidos flexibles y no hidrofóbicos, y una longitud de al menos 12 aminoácidos para dejar el espacio suficiente para que los dos dominios se ensamblen correctamente. El diseño de un **scFv biespecífico** (Figura 6 c), como el BiKE, consiste en la unión de las secuencias de dos scFv por una secuencia flexible. Esta secuencia también está constituida por glicinas y serinas, pero su longitud tiene que ser inferior para que no haya ensamblaje entre los dominios variables de los dos scFv distintos, lo que alteraría su especificidad (62). El grupo de investigación disponía de las secuencias de los scFv G2D11 y 2D9, mientras que como secuencia del scFv anti-CD16A se utilizó el clon LSIV21 que se une a CD16A expresado por las células NK y macrófagos pero no a CD16B expresado en los neutrófilos (71). En el caso de los scFv-Fc después de la secuencia del scFv se añadió la secuencia de los dominios CH2 y CH3 de la Fc de las IgG1 (UniProt: P01857), estas igual que los anticuerpos deben dimerizar formando un puente disulfuro para generar una Fc funcional (Figura 6 d).

El DNA que codifica las proteínas de interés se mandó sintetizar a GenScript en el vector pHL-sec (Figura 8). Este vector tiene un origen de replicación de bacterias y un marcador de resistencia a ampicilina para poder replicarlo en *E. coli*. Por otro lado tiene el promotor del gen de la β -actina de pollo, que es funcional en células de mamífero, la secuencia Kozak (para el inicio de la transcripción), una secuencia señal para secretar la proteína, 12 histidinas, la proteína GFP que actúa como proteína de fusión, el sitio de corte de la proteasa TEV, la secuencia de la proteína de interés, el codón de stop y la secuencia de poliadenilación de la β -globina de conejo (75).

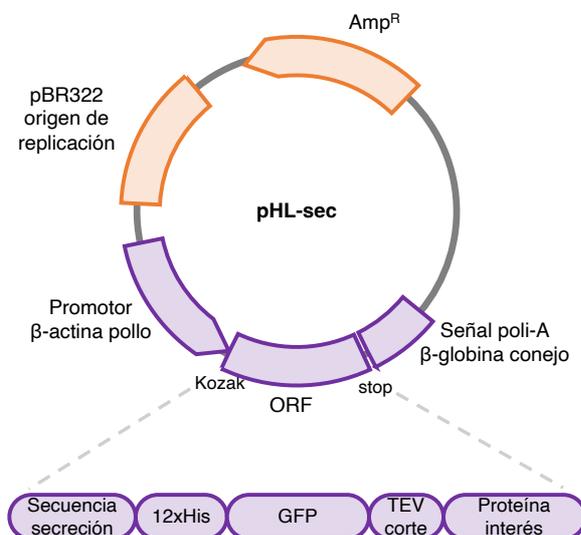


Figura 8. Representación esquemática del vector pHL-sec y de la proteína obtenida tras su expresión en células de mamífero. Fuente elaboración propia.

En este TFM se expresaron las 5 proteínas cuya composición se detalla a continuación. La proteína de interés, es decir, la proteína obtenida tras todo el proceso de purificación se destaca en negrita.

- 12xHist – GFP – TEV corte – **G2D11 – antiCD16**
- 12xHist – GFP – TEV corte – **2D9 – Fc**
- 12xHist – GFP – TEV corte – **2D9 – antiCD16**
- 12xHist – GFP – TEV corte – **antiCD16 – Fc**
- 12xHist – GFP – TEV corte – **G2D11(H32A-H35A-S52A) – Fc**

Se utilizará también en los experimentos la proteína **G2D11-Fc** que ya había sido producida y purificada previamente en el laboratorio del Dr. Ramón Hurtado siguiendo el mismo protocolo que se explica a continuación.

Obtención del vector

Transformación de E. coli DH5α

GenScript nos proporcionó 4 ng de cada DNA plasmídico liofilizado que se disolvieron en 20 µl de agua miliQ estéril obteniendo así una concentración de 200 µg/µl. Este DNA se replica transfecando células de *E. coli* DH5α para obtener la cantidad necesaria para transfectar células de mamífero.

La transfección de estas bacterias consiste en añadir 200 µg del DNA plasmídico a una alícuota de 250 µl de *E. coli* DH5α competentes e incubarlas en hielo durante 30 minutos, a continuación se realiza un choque térmico que consiste en incubar las células a 42 °C durante 1 minuto y después 2 minutos en hielo. Finalmente se añaden 500 µl de medio LB (Luria-Bertani) líquido y se incuba a 37 °C 220 rpm entre 1 y 3 horas. Transcurrido ese tiempo el precultivo se transfiere a 100 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml para seleccionar las células transformadas y se incuba durante toda la noche. Al día siguiente el cultivo se transfiere a 2 litros de medio LB fresco con ampicilina 100 µg/ml y se incuba durante otras 24 horas.

Purificación del plásmido (Gigaprep)

Los 2 litros de cultivo de *E. coli* DH5α transformadas se centrifugaron 15 minutos a 10.000 x g y 4 °C y el DNA plasmídico se purificó a partir del pellet de células según las instrucciones del kit de gigaprep (PureLink™ Expi Endotoxin-Free Giga Plasmid Purification Kit, Invitrogen). En resumen el pellet se resuspende con RNasa, se añade una solución con NaOH y SDS para precipitar proteínas y ácidos nucleicos, después el pH se neutraliza bruscamente añadiendo ácido acético. El DNA plasmídico se vuelve a solubilizar pero moléculas más grandes como el DNA cromosómico no. La solución se filtra para eliminar el precipitado. A la solución que pasa a través del filtro se le añade un reactivo que elimina las endotoxinas y se vuelve a pasar por otro filtro que contine una resina cargada positivamente,

en la que quedan retenidas las moléculas de DNA debido a su carga negativa. El DNA se eluye con un tampón con alta concentración salina. Finalmente el DNA se precipita primero con isopropanol y luego con etanol para eliminar la sal, se centrifuga y el pellet se resuspende en 4 ml de agua miliQ.

Cuantificación y esterilización del DNA

El DNA plasmídico se cuantificó utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX que mide la absorbancia en muestras de 1 µl de volumen. La concentración de DNA se puede calcular a partir de la absorbancia a 260 nm y el coeficiente de extinción molar del DNA de doble hebra mediante la ecuación de Beer-Lambert. La concentración de DNA plasmídico se ajusta para dejarla entre 1000 y 2000 µg/ml añadiendo agua miliQ, generalmente el DNA plasmídico se deja entre 8 y 10 ml de agua miliQ totales. El DNA plasmídico tras la precipitación con isopropanol y etanol suele ser estéril, puesto que el alcohol va a lisar a todas las bacterias. No obstante, para mayor seguridad se esterilizó calentándolo a 65 °C durante 30 minutos.

Técnicas de cultivo in vitro y criopreservación

Células HEK 293 6F

La línea HEK 293 6F, adaptada de la línea HEK 293, crece rápidamente en suspensión y es fácilmente transfectable por lo que tiene las características idóneas para su uso en la expresión de proteínas recombinantes (76). Las células HEK 293 6F se cultivaron, tanto para su mantenimiento como en la expresión de proteínas, en medio FreeStyle™ F17 Expression Medium (Gibco™) con GlutaMAX 20 µl/ml de medio (2% volumen), Kolliphor P188 10 µl/ml de medio (1% volumen) y sin suero fetal bovino (SFB). Estas células se cultivan en matraces Erlenmeyer estériles con tapones con filtro para permitir el intercambio gaseoso, estos matraces no se llenan a más de 1/3 de su capacidad para que el cultivo se airee bien y se incuban en agitación a 135 rpm, 37 °C y atmósfera enriquecida al 7.5% en CO₂ y saturada en humedad.

Se mantuvo un stock de 20 ml de células HEK 293 6F en cultivo a una densidad celular entre 0.5 y 4 x10⁶ células/ml, realizando pases o subcultivos cada 2-3 días y durante un máximo de 30 pases. El subcultivo, al tratarse de células en suspensión, consiste en determinar la densidad celular y diluir el cultivo para ajustar la densidad celular a 0.5x10⁶ células/ml y un volumen de 20 ml. Se conservan alícuotas de HEK 293 6F disueltas en SFB con 10% dimetilsulfóxido (DMSO) como criopreservante en criotubos en N₂ líquido. Cuando el cultivo se acerca a los 30 pases se descongela una alícuota nueva añadiendo medio de cultivo atemperado a 37 °C, una vez descongelado se centrifuga 5 minutos a 300 x g y el pellet de células se resuspende en medio de cultivo.

Otras líneas celulares

El resto de las líneas celulares utilizadas en este trabajo se cultivaron, tanto para su mantenimiento como en los experimentos, en su medio apropiado según la base de datos de la ATCC y siempre con 10% SFB de complementado y 1 % GlutaMAX. Estas células se cultivaron en frascos de 25 cm² para cultivos de 5 ml o frascos de 75 cm² para cultivos de 15 ml y se incubaron a 37 °C y en atmósfera enriquecida al 5% de CO₂ y saturada en humedad.

Tabla 5. Líneas celulares utilizadas

Línea celular	Tipo de células	Medio de cultivo	Tipo de crecimiento
SK-BR-3	Cáncer de mama	RPMI-1640	Adherente
PC-3	Cáncer de próstata	DMEM/F-12	Adherente
LNCaP	Cáncer de próstata	RPMI-1640	Adherente
Jurkat	Leucemia T	RPMI-1640	Suspensión
Raji	Linfoma B	RPMI-1640	Suspensión
R69	Linfoma B	RPMI-1640	Suspensión

Los stocks de estas líneas celulares se mantuvieron realizando subcultivos cada 2-3 días según las recomendaciones específicas de la ATCC para cada línea celular y durante un máximo de 30 pases. Superado este número de pases se descongeló una nueva alícuota. Una vez por semana se analizaron muestras de todos los cultivos que se mantenían en el incubador para verificar la ausencia de micoplasmas. Estos análisis fueron realizados por el servicio de cultivos celulares del IISA.

Las líneas celulares adherentes se subcultivan justo antes de alcanzar la confluencia, esto es aproximadamente cada 2-3 días, para ello se incuban 5 minutos con tripsina-EDTA a 37 °C, se añade medio fresco, se centrifugan 5 minutos a 300 x g, el pellet se resuspende en el medio apropiado y se diluyen 1/2 (SK-BR-3) o entre 1/3 y 1/6 (LNCaP y PC-3) según las recomendaciones de la ATCC. En las líneas celulares en suspensión el subcultivo debe realizarse antes de alcanzar una densidad celular superior a 3x10⁶ células/ml, esto es aproximadamente cada 2-3 días. En estas células el subcultivo consiste en determinar la densidad celular y diluir el cultivo para ajustar la densidad a 0.5x10⁶ células/ml.

Se conservan alícuotas con entre 5 y 8x10⁶ células de cada línea celular en criotubos a -80 °C en SFB con 10% DMSO como criopreservante. Estas alícuotas se prepararon a partir de cultivos con pocos pases para asegurar que mantienen las características de la línea celular. El proceso de congelación consiste en, despegar las células con tripsina-EDTA en caso de que sean adherentes, centrifugar 5 minutos a 300 x g, resuspender el pellet en 500 µl de SFM con 10% DMSO y llevarlas rápidamente al ultracongelador a -80 °C.

En caso de necesitar descongelar una alícuota, la descongelación se realiza añadiendo medio de cultivo atemperado a 37 °C desde un tubo con 10 ml de medio al criotubo y devolviéndolo de nuevo al tubo, de esta forma se diluye el DMSO. Posteriormente el tubo se centrifuga 5

minutos a 300 x g y el pellet de células se resuspende en 5 ml el medio de cultivo apropiado. Estas células no se subcultivan hasta que observamos que han reanudado el crecimiento porque el medio cambia a color amarillo.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes

En términos generales la proteína de interés se expresa en células HEK 293 6F y se secreta al sobrenadante, a los 6 días de la transfección el cultivo se centrifuga y la proteína se purifica a partir del sobrenadante. Las proteínas de interés se expresaron fusionadas a la proteína GFP, lo que permitió seguir visualmente el proceso de purificación puesto que la proteína GFP es verde. El sobrenadante se pasa por una columna de níquel y la proteína queda retenida por la cola de histidinas, la proteína se eluye con un gradiente de imidazol y se pasa por una columna de desalinización para cambiar el tampón a PBS y eliminar el imidazol. A continuación se digiere con la proteasa TEV para separar la proteína de interés de la GFP y la cola de histidinas, tras esto se vuelve a pasar por una columna de níquel en la que queda retenida la GFP, porque mantiene la cola de histidinas, y la proteasa TEV, mientras que la proteína de interés atraviesa la columna. Finalmente la proteína se concentra utilizando sistemas Centricon, se cuantifica por espectrofotometría, se esteriliza y se congelan alícuotas en N₂ líquido que se conservan a – 80 °C.

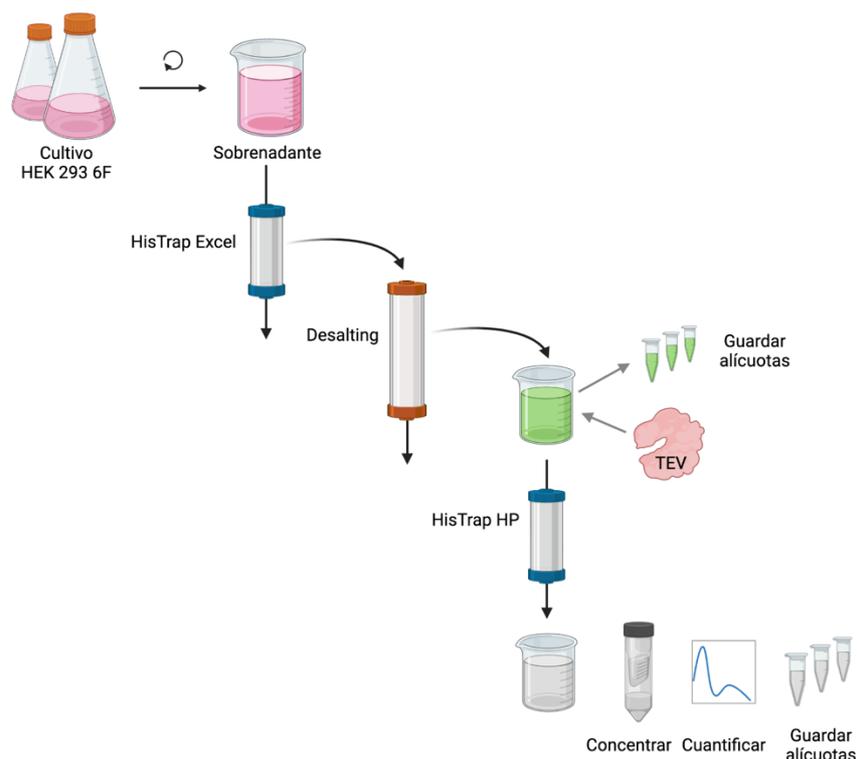


Figura 9. Representación esquemática del proceso de expresión y purificación de proteínas recombinantes mediante la transfección de células HEK 293 6F y cromatografía. En el proceso se guardan alícuotas de la proteína de interés fusionada a la GFP (representada en verde) y de la proteína de interés pura (representada en gris). Fuente elaboración propia (BioRender).

Transfección HEK 293 6F

La transfección se realiza en la mitad del volumen final en el que se van a incubar las células durante los 6 días que durará la expresión de proteínas. Es decir, para una expresión en 800 ml de medio, la transfección se realizará en 400 ml. El día de la transfección las células se centrifugan 5 minutos a 300 x g, se elimina el sobrenadante y el pellet de células se resuspende en medio de expresión FreeStyle™ F17 (Gibco™) con 2% de GlutaMAX y 1% de Kolliphor P188 a una densidad entre 2 y 3 x10⁶ células/ml. El DNA se añade gota a gota por toda la superficie del cultivo para obtener una concentración final de 3 µg DNA/ml de cultivo, y se incubó durante 5 minutos en agitación a 37 °C. Transcurrido este tiempo se añadió al cultivo polietilenimina (PEI) a una concentración final de 9 µg PEI/ml cultivo. El DNA se unirá a la superficie de las células durante la incubación de 5 minutos y posteriormente el PEI, que es un polímero catiónico, se piensa que formará poros en la membrana por los que podrá penetrar el DNA.

Tras 24 horas de incubación en agitación a 37 °C se duplica el volumen del medio y se añade al cultivo ácido valproico (VPA) a una concentración final de 220 mM, una vez duplicado el medio. El VPA es un inhibidor de las histonas deacetilasas, estas enzimas promueven que el DNA se compacte dificultando su transcripción, de esta forma el VPA aumenta la transcripción del DNA (77). En estas condiciones las células se incuban durante 5 días más, es decir, 6 días en total desde la transfección.

Finalizada la incubación la proteína se habrá expresado y secretado al medio. El cultivo se centrifuga 10 minutos a 300 x g y temperatura ambiente, el pellet de células se descarta y el sobrenadante se vuelve a centrifugar 15 minutos a 10.000 x g, de nuevo el pellet de células se descarta. Se añade TRIS al sobrenadante para obtener una concentración final de 100 mM TRIS pH 7.5, se pasa por filtros de 0.45 µm para eliminar fragmentos celulares que puedan taponar las columnas de cromatografía y se conserva a 4 °C hasta la purificación.

Purificación en sistema ÄKTA

Para realizar las purificaciones por cromatografía se utilizó el equipo **ÄKTA purifier P-900/UPC-900 (Amersham Biosciences)**. En este sistema se acopla la columna que sea necesaria para cada etapa del proceso de purificación y consta de dos bombas que van a hacer pasar el tampón o sobrenadante a través de la columna a un flujo (ml/minuto) determinado. Además, como el equipo tiene dos bombas puede mezclar dos tampones los que permite generar gradientes de concentración, lo que es útil a la hora de eluir proteínas de la columna. A la salida de la columna el líquido pasa por un detector de absorbancia a 280 nm, los que permite identificar si están saliendo o no proteínas, y por un conductímetro, lo que es útil para identificar diferenciar que tampón está saliendo de la columna cuando utilizamos tampones con concentraciones salinas diferentes. Finalmente, la solución que sale de la columna es recogida automáticamente en fracciones de un volumen determinado.

En primer lugar se realizó una cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) utilizando la columna **HisTrap™ Excel (Cytiva)** para separar la proteína de interés del sobrenadante del cultivo, esta columna tiene el níquel inmovilizado de forma más fuerte puesto que el medio de cultivo tiene agentes quelantes que serían capaces de secuestrar el níquel de una columna normal. Tras equilibrar la columna con tampón A (Anexo I) se dejó pasando el sobrenadante del cultivo lentamente durante toda la noche, para que la proteína de interés quedase retenida en la columna. Al día siguiente la columna se lavó con un gradiente de tampón B (Anexo I) para eluir la proteína de interés.

A continuación se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna **HiPrep™ 26/10 Desalting (Cytiva)** para cambiar el tampón en el que se encuentra la proteína, que es una mezcla entre tampón A y B, por tampón PBS (Anexo I). El motivo de este cambio de tampón es que la concentración salina tan alta y la presencia de imidazol en la solución de la proteína no son las condiciones idóneas para conservar la proteína, para la actuación posterior de la proteasa TEV ni para el uso de esta proteína en ensayo con cultivos celulares *in vitro*.

El siguiente paso consiste en cuantificar la cantidad de proteína mediante la técnica de **Bradford**. Este método utiliza un reactivo que reacciona con algunos residuos de la proteína pasando de tener color marrón a color azul después de la reacción. Se mezclan 100 µl del reactivo con 1 µl de la muestra y se mide la absorbancia a 595 nm (correspondiente al color azul). Se cuantifica también una muestra de BSA de concentración conocida, lo que permite calcular la concentración de la muestra por proporcionalidad. Una vez calculada la cantidad de proteína obtenida se añadió 1 mg de la **proteasa TEV** por cada 30 mg de proteína a digerir y se incubó durante toda la noche a 18 °C. Esta digestión va a separar la GFP y la cola de histidinas de la proteína de interés. La eficacia de la digestión se analizó por **electroforesis**, si la proteasa ha cortado correctamente pasaremos de ver una banda antes de la digestión a ver una o dos bandas de menor peso molecular.

Tras la digestión con TEV se volvió a realizar una cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) utilizando en este caso la columna **HisTrap™ HP (Cytiva)**, para separar la proteína de interés de la proteasa TEV y la proteína GFP. En este caso la proteína de interés no queda retenida en la columna y sale en el líquido que atraviesa la columna. La columna se eluye primero con un 10% de tampón B para recoger un 2º pico de proteína de interés que puede quedar retenida, si en el gel vemos que este pico no está contaminado con GFP lo mezclamos con el resto.

Concentración de proteínas

Después de la purificación las proteínas se concentraron utilizando sistemas Centricon con un tamaño de poro de 30 kDa (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck Millipore). El Centricon se llena con la disolución de la proteína (15 ml) y se centrifuga entre 5 y 10 minutos a 2.000 x g. El tampón pasa a través del filtro del Centricon pero la proteína no cabe por los

poros del filtro y queda en la solución que hay sobre el filtro. Después de centrifugar el tampón que ha atravesado el filtro se descarta, la solución que queda sobre el filtro se homogeneiza con una pipeta, se mezcla con la solución de proteína original y se vuelve a cargar el Centricon. Este proceso se repite hasta que alcancemos el volumen de proteína deseado o hasta que empecemos a ver que la proteína precipita. Conforme la proteína se va concentrando el tampón pasa más lentamente a través del filtro, por lo que hay que ir aumentando el tiempo de centrifugación. Es importante eliminar la proteína precipitada centrifugando 2 minutos a 2.000 x g porque puede actuar como núcleos que estimulan la precipitación de más proteína.

Cuantificación de proteínas, esterilización y conservación

A continuación la proteína se esterilizó por filtración en campana de flujo laminar con filtros de 0.22 μm con baja afinidad por proteínas (Millex-GV Filter, Merck Millipore). La proteína filtrada se recoge en el mismo tubo para homogeneizar la concentración y después se reparte en alícuotas en tubos eppendorf estériles. La concentración de proteína se cuantificó utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX que mide la absorbancia en muestras de 1 μl de volumen. La concentración de proteína en mg/ml se puede calcular a partir de la absorbancia a 280 nm, el coeficiente de extinción molar teórico obtenido a partir de su secuencia mediante ProtParam (78), el peso molecular y la ecuación de Beer-Lambert.

Finalmente las alícuotas se congelan con N_2 líquido, para que el proceso de congelado sea lo más rápido posible, y se conservaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Electroforesis y western blot

Electroforesis (PAGE)

La electroforesis en **condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)** se utilizó para analizar la presencia de determinadas proteínas en distintos momentos de la purificación. Se utilizaron geles de 0.75 mm de grosor y 10 pocillos con una región de running preparada al 12% de poliacrilamida y una región de stacking al 4% de poliacrilamida, ambas con un 20% de dodecilsulfato sódico (SDS) para generar condiciones desnaturizantes.

La preparación de las muestras a analizar se realizó mezclando 6 μl de tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol, SDS y β -mercaptoetanol) y 18 μl de la muestra, y se calentaron a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos para desnaturizar las proteínas. En el primer pocillo de todos los geles se cargó 3 μl del marcador de pesos moleculares (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher) y en el resto de pocillos se cargaron entre 10 y 15 μl de las respectivas muestras. Los geles se corrieron en cubetas de electroforesis vertical sumergidos en running tampón (25 mM TRIS, 200 mM glicina, 0.1% SDS) a 130 V durante aproximadamente 90 minutos. Una vez finalizada la separación electroforética el gel se tiñó con 25 ml de Quick Coomassie (Neo Biotech) durante toda la noche en agitación. Al día siguiente el gel puede pasarse a agua destilada para conservarlo pero con este reactivo no es necesario desteñir.

Por otro lado se realizaron electroforesis en **condiciones no desnaturalizantes** para verificar la formación de dímeros en los scFv-Fc. Estas electroforesis se realizaron siguiendo el mismo protocolo pero sin añadir SDS, ya que es una agente desnaturalizante que rompe los puentes disulfuro, ni calentar las muestras a 100 °C.

Western blot

La técnica de western blot permite determinar la presencia de una proteína específica en un gel de electroforesis utilizando anticuerpos específicos contra dicha proteína. Para realizar esta técnica las proteínas se transfieren desde el gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (difluoruro de polivinilo) utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD). Una vez finalizada la transferencia la membrana se bloqueó con 0.05 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en PBS con Tween 0.1% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Este paso se realiza para evitar un marcaje inespecífico por el anticuerpo.

A continuación se añadieron 0.4 µl del anticuerpo THE™ His Tag Antibody [HRP] (mAb, Mouse, GenScript) a los 5 ml de BSA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda la noche. Este anticuerpo reconoce las colas de histidinas que presentan todas las construcciones diseñadas y está conjugado con una peroxidasa por lo que no es necesario utilizar un anticuerpo secundario. Después del marcaje la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS con Tween 0.1%. Finalmente se utilizó el reactivo SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (ThermoFisher) y se reveló en el visualizador ChemiDoc (BIO RAD) para detectar la quimioluminiscencia producida por la peroxidasa.

Marcajes y análisis por citometría de flujo

Se realizaron marcajes para detectar la presencia de diferentes proteínas o antígenos en la superficie de células utilizando para ello tanto anticuerpos comerciales como las alícuotas de las proteínas expresadas en este trabajo que se guardaron antes de eliminar la GFP. El protocolo utilizado fue en todos los casos el mismo únicamente cambia el anticuerpo utilizado. Para cada marcaje se aislaron aproximadamente 50.000 células en un tubo Eppendorf, estas se centrifugan 2 minutos a 800 x g y se resuspenden en 50 µl de una dilución de PBS con 5% SFB y la concentración deseada del anticuerpo o anticuerpos. Las células se incuban 20 minutos a 4 °C, posteriormente se rellena el tubo Eppendorf con PBS 5% SFB, se centrifuga 2 minutos a 800 x g, se descarta el sobrenadante y se vuelve a lavar. Las células deben analizarse por citometría de inmediato para evitar la fagocitosis del anticuerpo.

Experimentos de adhesión en placa

Estos experimentos se basan en el mismo principio que los ensayos tipo ELISA en los que los anticuerpos se pegan directamente al plástico a través de sus fracciones Fc. Este experimento se realizó para verificar que la Fc de los scFv-Fc expresados en este trabajo es funcional. Para ello se añadieron 50 µg del scFv-Fc a 3 pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo plano,

se rellenó con PBS hasta 50 μ l, otros 3 pocillos se llenaron solo con PBS como control, y se incubó a 4 $^{\circ}$ C durante toda la noche (79). Al día siguiente se añaden 5.000 células Jurkat/pocillo los 6 pocillos y se dejó incubar durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C. Transcurrido este tiempo se utilizó el sistema de análisis de células en tiempo real Incucyte[®] SX5 (Sartorius) para tomar fotografías de los pocillos y contar el número de células. A continuación se retiró el medio por un lateral del pocillo y se lavó muy lentamente con PBS. Finalmente se repitieron las fotografías y se volvió a contar.

Ensayos de citotoxicidad de las proteínas

Se realizaron experimentos de citotoxicidad celular para determinar si los scFv-Fc y los BiKEs expresados en este trabajo tienen por si mismo algún efecto citotóxico sobre líneas de células tumorales *in vitro*. Para ello se sembraron 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C. Al día siguiente se añadieron diluciones seriadas desde 1.000 nM hasta 0.01 nM de cada proteína, a otros tres pocillos se les añadió 500 μ M de cisplatino como control positivo y se dejaron otros 3 pocillo sin nada como control. Tras esto las placas se incubaron durante 4 días a 37 $^{\circ}$ C y se determinó el porcentaje de muerte celular por citometría.

Para determinar la muerte celular las células, en caso de que sean adherentes, se despegaron del pocillo con tripsina y cada pocillo se resuspendió en 20 μ l de tampón ABB ("*anexin V binding buffer*") con 1 μ l de anexina V-FITC y 1 μ l de 7-AAD. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente se añadieron 30 μ l de tampón ABB y se analizó por citometría de flujo. La anexina V es una proteína que se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido que se transloca de la cara interna de la membrana celular a la externa al iniciarse la apoptosis, por lo que permite detectar a las células apoptóticas. Por otro lado, el 7-aminoactinomicina D (7-AAD) es una molécula que no puede atravesar las membranas celulares, por lo que solo puede entrar a la célula si hay poros en la membrana, una vez dentro de la célula se une al DNA y emite fluorescencia. Solamente se consideraron viables las células que fueron negativas para el marcaje tanto con anexina V como con 7-AAD.

Ensayos de CDC *in vitro*

Se realizaron experimentos de citotoxicidad inducida por el complemento (CDC) para determinar si los scFv-Fc expresados en este trabajo tenían una Fc funcional capaz de activar al sistema del complemento. Para ello se sembraron 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C. Al día siguiente se añadieron diluciones seriadas desde 1.000 nM hasta 0.01 nM de cada proteína y se incubaron durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C, a continuación se añadió suero humano sin decomplementar (obtenido de donantes sanos a través del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón) a los pocillos para obtener una concentración final del 10% y se incubó durante 3.5 horas a 37 $^{\circ}$ C. Finalmente las células se despegaron con tripsina, en caso de que fueran adherentes, y se determinó el porcentaje de

muerte celular por citometría con marcaje con anexina V y 7-AAD como se ha escrito en el apartado Ensayos de citotoxicidad de las proteínas.

Como control se prepararon pocillos sólo con células, con células tratadas solo con el anticuerpo y con células tratadas solo con el suero. Además, como control positivo se utilizó el anticuerpo rituximab dirigido contra CD20 y las células Raji, que expresan CD20, como diana.

Ensayos de ADCC *in vitro*

Estos ensayos se realizaron para comparar la capacidad de los scFv-Fc y de los BiKE expresados en este trabajo para inducir citotoxicidad celular (ADCC). El planteamiento inicial consistía en utilizar células NK activadas *in vitro* como se explicará a continuación, no obstante, al no seguir correctamente el protocolo las células NK en cultivo acababan muriendo, y al no disponer de suficiente tiempo para repetir de nuevo el experimento se decidió no realizar la activación y purificar directamente las células NK a partir de los PBMCs recién aislados.

Aislamiento de PBMCs

Los PBMCs (“*peripheral blood mononuclear cells*”) son una mezcla de linfocitos, monocitos y células dendríticas que pueden aislarse a partir de un leukopak que es un producto obtenido a partir de muestras de sangre periférica. Para aislar los PBMCs se utilizaron leukopak proporcionados por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, el protocolo consistió en diluir 5 ml de leukopak hasta 20 ml totales con PBS estéril, que después se añadieron sobre 20 ml de Ficoll (un polisacárido altamente ramificado) en un tubo de 50 ml. A continuación el tubo se centrifugo 20 minutos a 400 x g sin freno, de esta forma los eritrocitos y granulocitos atraviesan el Ficoll, sobre el Ficoll queda un anillo formado por los PBMCs y sobre este queda el plasma sanguíneo. Finalmente se recoge el anillo de PBMCs, se lava dos veces con PBS estéril y resuspenden en medio RPMI-1640.

*Activación y expansión de células NK *in vitro**

Las células NK pueden purificarse directamente a partir de los PBMCs y utilizarse en los ensayos de ADCC, no obstante, se ha descrito que las células NK activadas con las células R69 tienen una mayor expresión de los receptores activadores y de gzmB (80). Las células R69 provienen de una leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL) transformada con el virus de Epstein-Barr (EBV) por lo que expresa muchos estímulos activadores de las células NK.

El protocolo utilizado para esta activación consistió en sembrar los PBMCs obtenidos en el apartado anterior a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con 1% glutamax, 10% SFB y sin antibióticos. Como estímulos para la activación de las células NK se añadieron 100 UI/ml de **IL-2** (Miltenyi), 5 ng/ml de **IL-15** (Miltenyi) y las células **R69** se añaden en una proporción 1/10 con respecto a la cantidad de PBMCs e inactivadas con mitomicina C. A los 5 días, y a partir de entonces cada 3 días, se ajusta la concentración de

PBMCs a 1×10^6 células/ml añadiendo medio RPMI y la cantidad apropiada de interleucinas y células R69. Este protocolo se mantuvo hasta los 14 días desde la siembra. Para inactivar las células R69 se incuban 90 minutos a 37 °C en medio RPMI-1640 sin SFB y con 25 µg/ml de mitomicina C, después se lavan con medio con SFB, se incuban durante 30 minutos a 37°C y se vuelven a lavar.

Purificación de células NK

Las células NK se purificaron a partir de los PBMCs recién aislados o después del proceso de activación mediante el kit de separación inmunomagnética MACS® (Miltenyi Biotec) con anticuerpos anti-CD56 unidos a micropartículas magnéticas según el protocolo de la casa comercial. En resumen cada 10^7 células se resuspendieron en 80 µl de tampón MACS® y 20 µl del anticuerpo, se incubaron 15 minutos a 4 °C, se lavaron con tampón MACS® y se separaron con una columna magnética. De esta forma los PBMCs se enriquecieron en células CD56⁺, que es el marcador característico de las células NK como se ha explicado en la introducción.

La eficacia de la separación se verificó analizando por citometría de flujo la expresión de CD56, CD3 (el marcador de los linfocitos T) y CD16 (el receptor de Fc de las células NK), siguiendo el protocolo explicado en el apartado Marcajes y análisis por citometría de flujo.

Experimento de ADCC in vitro

Para estos experimentos se sembraron 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se añadieron diluciones seriadas desde 1.000 nM hasta 0.01 nM de cada proteína y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, a continuación se añadieron 50.000 células NK/pocillo previamente marcadas con eFluor™ 670 (Invitrogen) y se incubó durante 3.5 horas a 37 °C. Finalmente las células se despegaron con tripsina, en caso de que fueran adherentes, y se determinó el porcentaje de muerte celular por citometría con marcaje con anexina V y 7-AAD como se ha escrito en el apartado Ensayos de citotoxicidad de las proteínas.

Como control se prepararon pocillos sólo con células, con células tratadas solo con la proteína y con células tratadas solo con las células NK. Además, como control positivo se utilizó el anticuerpo Rituximab dirigido contra CD20 y las células Raji, que expresan CD20, como diana.

Análisis estadístico

Los gráficos se realizaron utilizando GraphPad Prism 9 y el análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel. Los valores medios se expresan como la media más-menos la desviación estándar de la media. Se ha utilizado el test-t de Student para comparar la media entre 2 grupos y el test ANOVA cuando se ha comparado la media de 3 o más grupos, con un nivel de significancia $\alpha = 0.01$. Los valores estadísticos se presentan como “ns” cuando $p > 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Resultados

Pruebas de expresión

De forma previa a la purificación de los vectores por gigaprep y la expresión recombinante de las proteínas a gran escala se realizaron pruebas de expresión para verificar que las proteínas se expresan correctamente. Para las pruebas de expresión los vectores se replicaron en cultivos de *E. coli* DH5 α y se purificaron por miniprep, posteriormente se utilizaron para transfectar 10 ml de cultivo de células HEK 293 6F con 2-3x10⁶ células/ml siguiendo el protocolo detallado en materiales y métodos. Transcurridos 6 días desde la transfección, se recogió el sobrenadante del cultivo y se analizó por Western Blot. Para ello las proteínas del sobrenadante se separaron por electroforesis SDS-PAGE, a continuación las bandas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF y esta se reveló con el anticuerpo THE™ His Tag Antibody [HRP] (GenScript). Este anticuerpo está dirigido contra la cola de histidinas que tienen todas las proteínas expresadas en este trabajo y está conjugado con una enzima peroxidasa que produce quimioluminiscencia al añadir su sustrato.

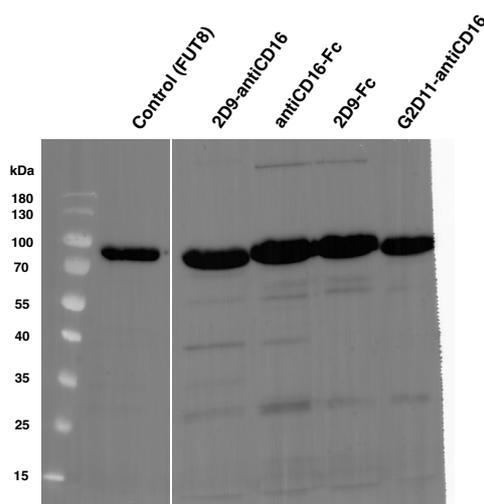


Figura 10. Western-blot de las pruebas de expresión llevadas a cabo para las proteínas expresadas en este trabajo. Como control se utilizó la proteína FUT8 que es una de las proteínas que mayor rendimiento ha generado de las expresadas previamente por el grupo. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra las colas de histidinas y conjugado con una enzima peroxidasa para revelar la membrana.

El resultado de las pruebas de expresión se muestra en la Figura 10 donde podemos observar que la expresión de nuestras proteínas es tan elevada como la expresión de FUT8, una proteína utilizada como control en las pruebas de expresión por ser una de las proteínas de las que se ha obtenido un mayor rendimiento en el grupo, por lo tanto la expresión de nuestras proteínas de interés es muy buena. Para la quinta proteína expresada en este trabajo, G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc, no se realizó prueba de expresión porque su vector llegó más tarde y asumimos que la expresión también sería buena. Cabe destacar que en el Western Blot de las dos proteínas que tienen Fc, se observa proteína agregada en los pocillos, según la experiencia del grupo es habitual que cuando la expresión es alta una pequeña parte

de la proteína agregue a través del Fc. Por otro lado, en los 4 carriles podemos observar una banda a la altura de 25 kDa, esta podría ser la proteína GFP, ya la traducción puede abortarse de forma prematura sintetizándose solo la cola de histidinas con la GFP, esto no es un problema porque se eliminará durante la purificación. El resto de las bandas serán otras proteínas minoritarias que sintetiza la célula y que tienen histidinas por lo que se marcan con este anticuerpo.

Replicación de los vectores

Los vectores con el gen que codifica las diferentes proteínas se mandaron sintetizar a GenScript, pero debido a que se necesita una gran cantidad de DNA para transfectar las células estos vectores se replicaron posteriormente en cultivos de 2 litros de *E. coli* DH5 α de los que se purificó el vector mediante gigaprep (PureLink™ Expi Endotoxin-Free Giga Plasmid Purification Kit, Invitrogen). La gigaprep nos permite obtener cantidades mucho mayores de DNA, y más concentradas y puras en comparación con la miniprep. Los resultados de la gigaprep y criterios de pureza se muestran en la Tabla 6. La relación entre la absorbancia a 260/280 nm debe estar entre 1.8 y 2.0 para muestras puras de DNA, si la relación es inferior podría haber proteínas contaminando el DNA puesto que estas absorben a 280 nm, mientras que valores superiores a 2.1 se relacionan con la presencia de RNA. La relación 260/230 es más variable, dependiendo de factores como la concentración o el tampón, pero se considera que una muestra es pura cuando está entre 1-8 y 2.2, un valor inferior sugiere contaminación por compuestos fenólicos u otras moléculas químicas que absorben a 230 nm. En nuestro caso el criterio 260/280 siempre está en el rango óptimo, mientras que el criterio 260/230 es ligeramente superior aunque, como hemos comentado, este criterio es más variable.

Tabla 6. Resultados de las Gigaprep

Plásmido	Concentración	Volumen	Abs 260/230	Abs 260/280
G2D11-antiCD16	2073 $\mu\text{g/ml}$	10 ml	2.25	1.98
2D9-antiCD16	1395 $\mu\text{g/ml}$	10 ml	2.32	2.03
2D9-Fc	1608 $\mu\text{g/ml}$	10 ml	2.33	2.01
antiCD16-Fc	1308 $\mu\text{g/ml}$	8 ml	2.36	1.94
G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc	1731 $\mu\text{g/ml}$	10 ml	2.27	1.99

Expresión de las proteínas en células HEK 293 6F

Los vectores replicados según lo descrito en el apartado anterior se utilizaron para transfectar cultivos de células HEK 293 6F, se transfectaron volúmenes de 200 o 400 ml dependiendo de la proteína, con una concentración de entre 2 y 3×10^6 células/ml. Al día siguiente se duplica el medio, llegando a 400 u 800 ml de volumen final y se añade VPA para estimular la expresión génica, siguiendo el protocolo explicado en materiales y métodos. Transcurridos 6 días desde la transfección se recogió el sobrenadante del cultivo, la expresión de la proteína de interés puede verificarse a simple vista puesto que el medio de cultivo adquiere un ligero color verde

debido a la presencia de la GFP, que también puede confirmarse exponiéndolo a la luz UV. La proteína se purificó a partir del sobrenadante como se explica en materiales y métodos, en resumen, en primer lugar se pasa por una columna de níquel donde la proteína queda retenida por la cola de histidinas, a continuación se eluye con un gradiente de imidazol y se utiliza una columna de desalting para cambiar el tampón por PBS. El siguiente paso es la digestión con la proteasa TEV para separar la proteína de interés de la GFP, finalmente se vuelve a pasar por una columna de níquel, pero ahora la proteína de interés no queda retenida y atraviesa la columna. No obstante, parte de la proteína de interés puede quedar parcialmente retenida por la presencia de histidinas en su superficie, esto es especialmente relevante en las proteínas que se expresan con Fc, puesto que cada monómero del dímero Fc tiene 4 histidinas juntas en su superficie. Por ello, se eluye la columna en un primer momento con 10% de tampón B para recoger esta fracción de proteína de interés que puede haber quedado retenida, esto es el denominado segundo pico. Finalmente, la proteína se concentra utilizando sistemas Centricon, se cuantifica midiendo su absorbancia a 280 nm y se esteriliza como se explica en materiales y métodos.

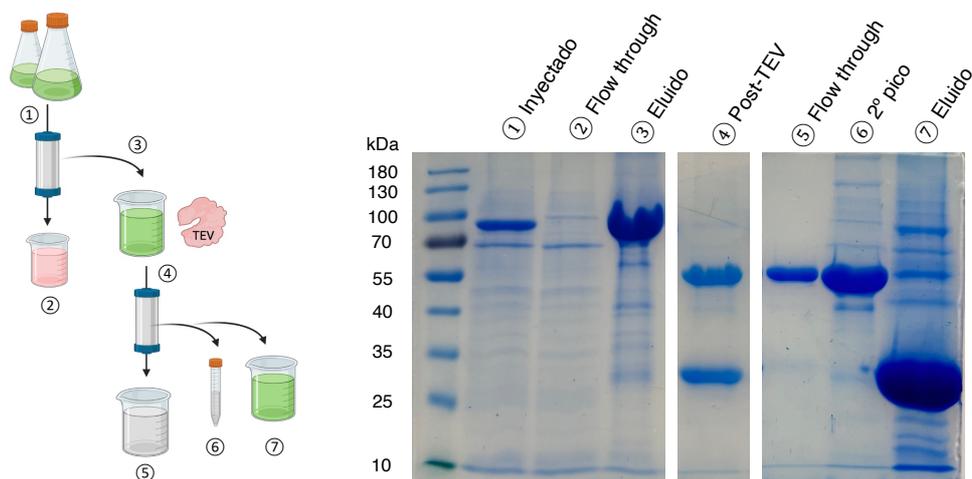


Figura 11. Ejemplo representativo de las electroforesis (SDS-PAGE) que se realizan durante el proceso de purificación de cada proteína, en este caso correspondientes a la purificación de la proteína 2D9-antiCD16. El diagrama de la izquierda explica a qué parte del proceso corresponde cada carril.

En la Figura 11 se muestran los gels de electroforesis (SDS-PAGE) que se realizan a lo largo de todo el proceso de purificación del BiKE 2D9-antiCD16 para ir verificando la eficacia de este. Los mismos gels se realizaron para la purificación del resto de proteínas, aunque solo se muestre uno como ejemplo. En carril del sobrenadante ① podemos ver la proteína de interés, en este caso es un BiKE que pesa 50 kDa y que junto con la GFP y secuencias conectoras aparece aproximadamente a 80 kDa. También podemos ver en este carril una proteína de algo menos de 70 kDa, esta es una proteína habitualmente expresada por las HEK 293 6F sin transfectar como podemos ver en la Figura 12. No obstante, esta proteína no va a afectar porque se elimina en el líquido que atraviesa la columna ②, donde también podemos verificar que no se pierde nada de 2D9-antiCD16. En el eluido ③ podemos observar la banda correspondiente al 2D9-antiCD16 y otras más intensas que no aparecían antes. Esto se debe

a que ahora todas las proteínas se han concentrado al pasar de 800 o 400 ml de sobrenadante a aproximadamente 100 ml en el eluido. Por ejemplo, en el eluido podemos ver una banda a aproximadamente 30 kDa, que no veíamos en el sobrenadante, y que seguramente será la GFP sola. Después de la digestión con la proteasa TEV ④ siempre que hay que verificar por electroforesis que toda la proteína se ha digerido, como se puede observar la banda a 80 kDa ya no aparece, y en su lugar aparece una banda a 50 kDa correspondiente al 2D9-antiCD16 y otra a 30 kDa correspondiente a la GFP y la TEV. En este carril ya no vemos tantas bandas porque entre medias se ha realizado el desalting que aumenta el volumen. Finalmente, el líquido vuelve a pasarse por una columna de níquel, el 2D9-antiCD16 ya no queda retenido y sale en el líquido que atraviesa la columna ⑤, no obstante, como se ha explicado anteriormente parte sí que puede quedar retenida por lo que se recoge el segundo pico ⑥. En este caso podemos ver que el segundo pico tiene bastante 2D9-antiCD16 y todavía no aparece GFP, por lo que lo mezclamos con el líquido que ha atravesado la columna para aprovecharlo. En último lugar la GFP que ha quedado retenida en la columna se eluye ⑦.

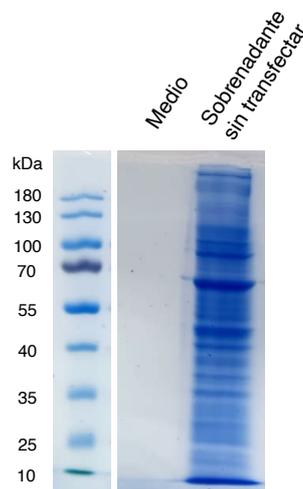


Figura 12. Electroforesis (SDS-PAGE) del medio FreeStyle™ F17 Expression Medium (Gibco™) utilizado para cultivar las HEK 293 6F y del sobrenadante de un cultivo de estas células sin transfectar.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la producción de las 5 proteínas expresadas en este trabajo. En primer lugar podemos fijarnos en que la masa final de proteína obtenida es diferente, en este sentido cabe resaltar que el volumen de cultivo no ha sido siempre el mismo, de forma que si ajustamos la producción con respecto al volumen de cultivo, si que obtenemos un rendimiento similar para las cuatro primeras proteínas. Las dos primeras proteínas se expresaron en 800 ml de cultivo de células HEK 293 6F, pero como se obtuvo una cantidad de proteína mucho mayor a la necesaria para las posteriores pruebas en cultivos *in vitro* se decidió reducir el volumen en las siguientes expresiones. La proteína G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc tiene un rendimiento notablemente inferior a las anteriores, no obstante, el rendimiento de las anteriores es muy elevado en comparación con otras proteínas expresadas previamente por el grupo con el mismo sistema. Como observamos en las pruebas de expresión estas proteínas se expresan tanto como el control FUT8 que es una de las proteínas

con mayor rendimiento. En el caso de G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc, al no haber realizado la prueba de expresión, no podemos afirmar que esta proteína de por sí se exprese con menor rendimiento o que algo haya afectado en algún punto del proceso disminuyendo el rendimiento. No obstante, este rendimiento está en la media del obtenido para la expresión de otras proteínas por el grupo.

Tabla 7. Resultados de la producción de proteínas recombinantes

Proteína	Masa pre-TEV	Masa final	Conc.	Vol. cultivo	Rto. ($\mu\text{g prot/ml cultivo}$)
G2D11-antiCD16	137.2 mg ¹	23.4 mg	7.8 mg/ml	800 ml	29 $\mu\text{g/ml}$
2D9-antiCD16	108.5 mg ¹	27.6 mg	2.9 mg/ml	800 ml	34 $\mu\text{g/ml}$
2D9-Fc	32 mg	15 mg	6.0 mg/ml	400 ml	40 $\mu\text{g/ml}$
antiCD16-Fc	167 mg ¹	15.8 mg	3.9 mg/ml	400 ml	38 $\mu\text{g/ml}$
G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc	18.4 mg	7.25 mg	2.9 mg/ml	400 ml	18 $\mu\text{g/ml}$

¹ Estos valores fueron calculados siguiendo el protocolo por Bradford, un método poco preciso, el resto se calcularon por espectrofotometría que es mucho más preciso.

Pasamos a comentar ahora los valores de concentración obtenidos para las diferentes proteínas. Como se ha explicado las proteínas se concentran en sistemas Centricon hasta que comienza a observarse precipitado. El valor de concentración que puede alcanzarse depende de cada proteína, pero en nuestro caso las 5 proteínas tienen estructuras similares, por lo que resulta lógico que hayamos obtenido valores de concentración del mismo orden de magnitud para todas ellas. Finalmente, se determinó también la masa de proteína en un punto intermedio del proceso de purificación, esto es antes de la digestión con TEV. Según el protocolo esta cuantificación se realiza por Bradford, un método poco preciso, pero que no necesita el coeficiente de extinción molar. En este punto no necesitamos exactitud porque la determinación se realiza para calcular aproximadamente la cantidad de TEV necesaria, pero posteriormente esta determinación servirá para calcular la concentración de las alícuotas que conservamos de la proteína con GFP (sin digerir) para los marcajes por citometría. Por ello, al disponer de los coeficientes de extinción molar de las proteínas sin digerir, se decidió pasar a hacer estas cuantificaciones también por espectrofotometría.

Pruebas de plegamiento del Fc

Como se ha explicado previamente la Fc debe estar correctamente glicosilada y dimerizada para poder ser reconocida por sus receptores e impulsar sus funciones efectoras, por ello las proteínas con Fc deben ser expresadas en sistemas de células de mamífero que permitan la correcta glicosilación y formación de puentes disulfuro entre los monómeros. En cambio los BiKEs están formados por dos scFv conectados, no están glicosilados ni tienen puentes disulfuro por lo que podrían haberse expresado en otros sistemas, como bacterias o levaduras, que resultan más rápidos y económicos.

Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

La electroforesis en condiciones no desnaturalizantes se realizó según lo explicado en el apartado de materiales y métodos para verificar la formación del dímero en el caso de los scFv-Fc. Como podemos observar en la Figura 13 las dos proteínas con Fc que utilizaremos posteriormente en los experimentos *in vitro*, G2D11-Fc y 2D9-Fc, dimerizan correctamente. Es cierto que en el gel en condiciones no desnaturalizantes se observan las bandas duplicadas, es decir, dos bandas a alturas muy similares. Esto puede ser porque en la electroforesis desnaturalizante el SDS dota a la proteína de carga, de forma que las proteínas se desplazan en función de su masa. En las condiciones no desnaturalizantes, al no haber SDS, la proteína se desplaza en función de su carga superficial, pero otros aspectos como su forma también pueden afectar. Es posible que tengamos dos subpoblaciones de la proteína que migran de forma ligeramente diferente. Los posteriores experimentos con cultivos celulares *in vitro* servirán para determinar si este hecho afecta o no a su funcionalidad, aunque si podemos afirmar que las proteínas con Fc forman correctamente el dímero.

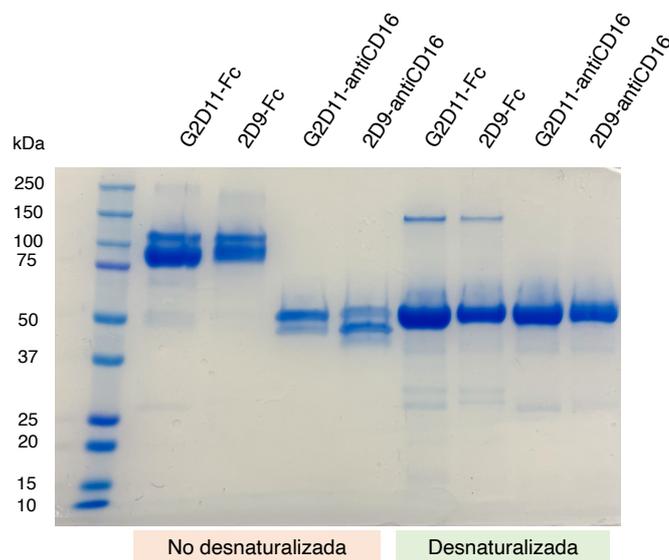


Figura 13. Electroforesis de las proteínas utilizadas en este trabajo en condiciones desnaturalizantes (añadiendo SDS y calentando las muestras hasta 100 °C) y no desnaturalizantes.

Experimento de adhesión

Una característica de los anticuerpos es que pueden adherirse a superficies plásticas, como el fondo de las placas de pocillos, a través de su Fc cuando esta está correctamente plegada, una propiedad en la que nos basamos para preparar los ensayos tipo ELISA. Utilizamos esta característica para verificar el plegamiento de nuestros scFv-Fc. Para ello incubamos 3 pocillos de una placa de 96 con 50 µg de scFv-Fc a 4 °C durante toda la noche, después añadimos 5.000 células Jurkat (no adherentes)/pocillo, incubamos 24 horas a 37°C y lavamos con cuidado. Tomamos fotos y contamos el número de células antes y después de lavar. Como podemos observar en la Figura 14 los scFv-Fc han conseguido adherir las células Jurkat al fondo del pocillo. Por lo que podemos deducir que su Fc se ha pegado al pocillo y, por lo tanto

está bien plegada y además que los scFv son funcionales dado que se unen a su antígeno en la membrana de las células Jurkat.

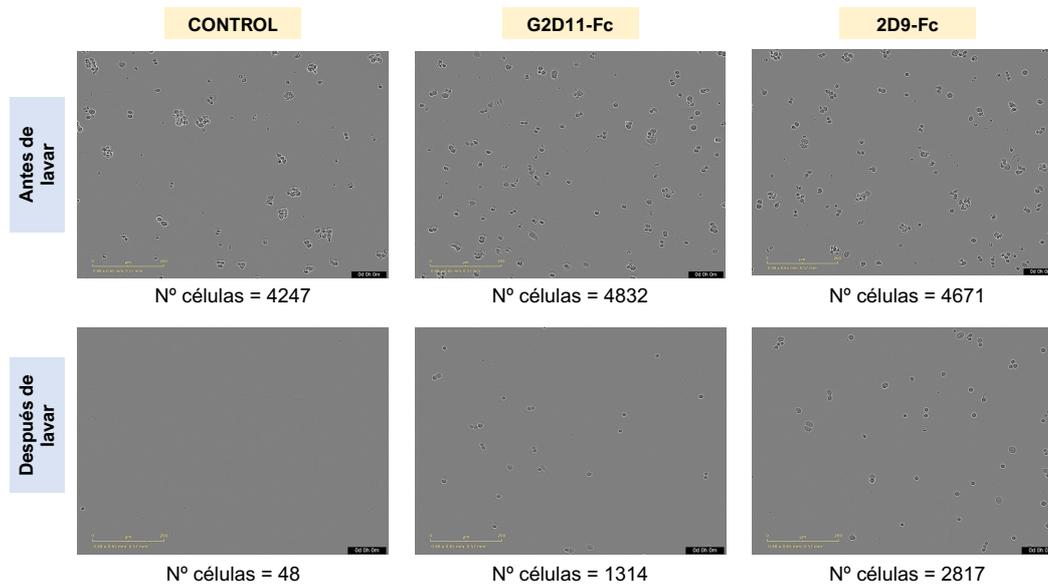


Figura 14. Fotografías tomadas a pocillos de una placa de 96 pre-incubados con los scFv-Fc a los que después se añadieron 5.000 Jurkat/pocillo. Las fotografías se tomaron antes y después de retirar el medio y lavar muy lentamente con PBS para retirar las células que no habían sido retenidas por los scFv-Fc. Se muestra también el número de células en cada pocillo contadas con el sistema de análisis de células en tiempo real Incucyte® SX5 (Sartorius). Los datos corresponden a la media de un experimento realizado por triplicado.

Fenotipado de líneas celulares

Se analizó la expresión de los diferentes epítomos de antígeno Tn reconocidos por G2D11 y 2D9 en las líneas celulares utilizadas en este trabajo y utilizando tanto las versiones scFv-Fc como los BiKEs de los dos anticuerpos. Los marcajes se realizaron a una concentración de 4 μM que está dentro del intervalo de 0.7 a 70 μM recomendado por las casas comerciales de anticuerpos para citometría (81). Como control se utilizaron muestras de las células marcadas con la misma concentración de GFP, puesto que esta proteína podría fijarse a la superficie de las células por interacciones inespecíficas.

El marcaje se calcula como la diferencia entre la mediana de la intensidad de fluorescencia en la muestra control marcada con GFP y la mediana de la muestra marcada con el anticuerpo correspondiente. Los resultados de los marcajes se muestran en la Tabla 8 y un ejemplo de los histogramas obtenidos al analizar los marcajes por citometría de flujo se muestra en la Figura 15. Es importante destacar que G2D11 reconoce dos antígenos Tn consecutivos, mientras que 2D9 reconoce un antígeno Tn o sTn en la secuencia GSTA que se encuentra altamente repetida en la proteína MUC1, por lo que los resultados de los marcajes con G2D11 y 2D9 pueden ser diferentes para una misma línea celular. En principio G2D11 podría ser más promiscuo ya que no depende de la secuencia peptídica a la que está unido el antígeno Tn y, por tanto, generar marcajes más intensos respecto a 2D9 como ocurre en el caso de las células

Jurkat. No obstante, G2D11 necesita reconocer dos antígenos Tn consecutivos en la proteína, y 2D9 solo necesita uno (aunque este debe estar en MUC1), lo que puede hacer que en algunos casos 2D9 encuentre más fácilmente su epítipo, como ocurre en el caso de las células SK-BR-3, PC-3 y LNCaP. Posiblemente esto se debe a que las tres son células epiteliales, por lo que expresan gran cantidad de mucinas, entre ellas MUC1.

	Jurkat Expresan Tn según bibliografía (82)		SK-BR-3 Expresan Tn según bibliografía (83)	
	Δ MIF	Estadística	Δ MIF	Estadística
G2D11-Fc	123.90 \pm 17.0	****	1.12 \pm 2.13	ns
G2D11-antiCD16	109.32 \pm 11.0	****	0	
2D9-Fc	63.84 \pm 4.54	****	11.08 \pm 2.85	****
2D9-antiCD16	6.07 \pm 0.98	****	0	ns

	PC-3 Expresan Tn según bibliografía (84)		LNCaP No sintetiza Tn según bibliografía (85)	
	Δ MIF	Estadística	Δ MIF	Estadística
G2D11-Fc	2.82 \pm 1.18	*	1.77 \pm 1.4	ns
G2D11-antiCD16	0.44 \pm 1.12	ns	0	
2D9-Fc	21.25 \pm 5.08	**	6.12 \pm 3.5	**
2D9-antiCD16	1.09 \pm 1.04	ns	0	

Tabla 8. Desplazamiento de la mediana de la intensidad de fluorescencia (Δ MIF) en distintas líneas celulares. El desplazamiento de la MIF se calculó como la diferencia entre la MIF del control marcado con GFP 4 μ M y la muestra marcada con el correspondiente anticuerpo a 4 μ M. Se presenta la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Se ha calculado si la diferencia entre el control marcado con GFP y la muestra marcada con el anticuerpo es significativa utilizando el test-t de Student (“ns” $p > 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

Si comparamos ahora los marcajes con los scFv-Fc y su correspondiente BiKE podemos observar que los BiKE, excepto en el caso de las células Jurkat, no producen marcaje en líneas celulares donde si marca el scFv-Fc. En caso de que los BiKE no fuesen capaces de unirse a su antígeno correspondiente no serían funcionales, no obstante, esto no parece lógico puesto que el scFv debería poder reconocer a su antígeno independientemente de que el scFv esté unido a un Fc o a otro scFv anti-CD16 como en el caso de los BiKE. Podría ser que los scFv-Fc se estén uniendo a las células a través de sus Fc, aunque esto queda descartado si observamos que en el marcaje de las LNCaP el 2D9-Fc si está marcando pero el G2D11-Fc no, lo que indica que se está uniendo a las células por su región específica de antígeno y no por el Fc. Otra posible explicación puede estar relacionada con la concentración, aunque hemos usado una concentración que está dentro del rango recomendado por las casas comerciales, está en la parte baja del rango, y los anticuerpos comerciales seguramente tendrán mejor afinidad por el antígeno respecto a nuestros anticuerpos. Además, como se ha comentado anteriormente la concentración de las alícuotas de proteína unida a GFP utilizada para los marcajes se determinó por Bradford, que es un método poco preciso. De forma que la concentración real

que estamos utilizando podría ser aún menor. En este sentido será necesario repetir los marcajes utilizando un gradiente de diferentes concentraciones del anticuerpo.

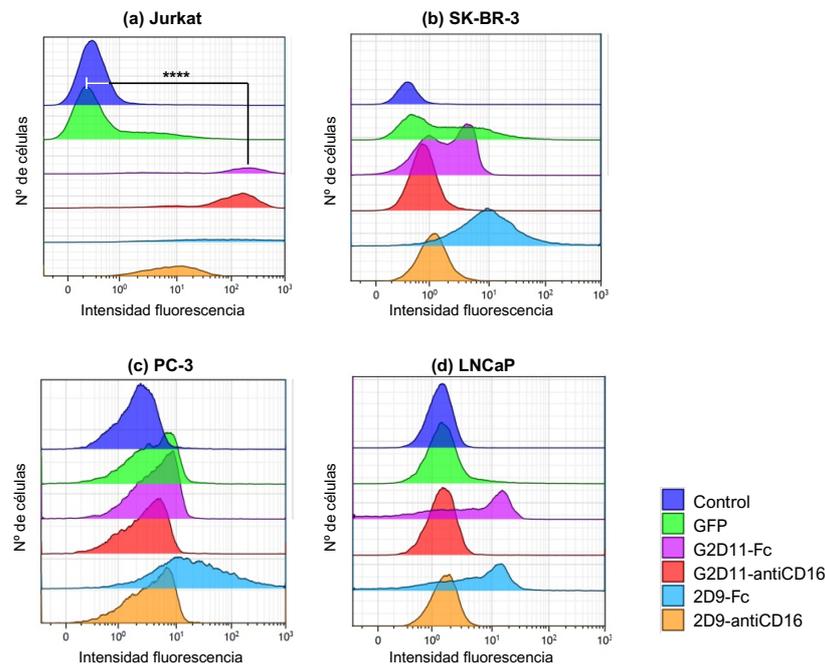


Figura 15. Histogramas de fluorescencia obtenidos al analizar los marcajes de distintas líneas celulares con los anticuerpos unidos a GFP a una concentración de 4 μ M mediante citometría de flujo. Como control se analizaron muestras de células sin marcar y marcadas con GFP 4 μ M. Se muestra un histograma representativo de cada muestra. Los resultados del análisis de 3 experimentos independientes se muestran Tabla 8.

Finalmente, si comparamos el resultado de nuestros marcajes con lo descrito en la bibliografía, podemos concluir que las células Jurkat expresan gran cantidad del antígeno, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía, aunque no se especifica que epítomos en concreto del antígeno Tn se han encontrado en estas células. En nuestro caso el marcaje es más intenso con G2D11 respecto a 2D9. Para las células SK-BR-3 la bibliografía indica que expresan el antígeno Tn, aunque nosotros solo lo hemos detectado con el anticuerpo 2D9. El marcaje de las células PC-3 también coincide con lo reportado en la bibliografía, aunque en nuestro caso el marcaje con el anticuerpo G2D11 es muy leve. Finalmente, las células LNCaP se han identificado como negativas en la bibliografía y en nuestros experimentos hemos detectado un marcaje leve con 2D9. Tal vez todas estas discrepancias se deban nuevamente a la concentración, es posible que si repitiésemos los marcajes utilizando concentraciones más altas, las líneas SK-BR-3 y PC-3 generasen marcajes más intensos, mientras que las LNCaP mantuviesen solamente este leve marcaje.

Pruebas de citotoxicidad inducida por los scFv-Fc y los BiKEs

La unión de los scFv-Fc y los BiKEs a la superficie de la célula podría bloquear algún receptor cuya función sea esencial para la viabilidad celular, por lo que las proteínas por sí mismas podrían tener un efecto citotóxico sin necesidad de activar los mecanismos inmunológicos,

como el CDC o la ADCC. Para verificarlo se incubaron las 4 líneas celulares fenotipadas en el experimento anterior durante 4 días con diferentes concentraciones de las 4 proteínas cuya capacidad citotóxica se va a evaluar en los siguientes experimentos: G2D11-Fc, G2D11-antiCD16, 2D9-Fc y 2D9-antiCD16. En la Figura 16 se presentan los resultados de estos experimentos donde podemos observar que las proteínas por si solas no son capaces de inducir un efecto citotóxico, al menos en las 4 líneas celulares ensayadas. Todas las concentraciones ensayadas mantienen una viabilidad superior al 80% y similar a la del control, el análisis estadístico no encuentra diferencias significativas entre las muestras. Para verificar estos resultados se utilizó un control positivo que consistió en tratar las células con cisplatino 500 μ M, una concentración muy elevada para asegurarnos de que habría muerte celular.

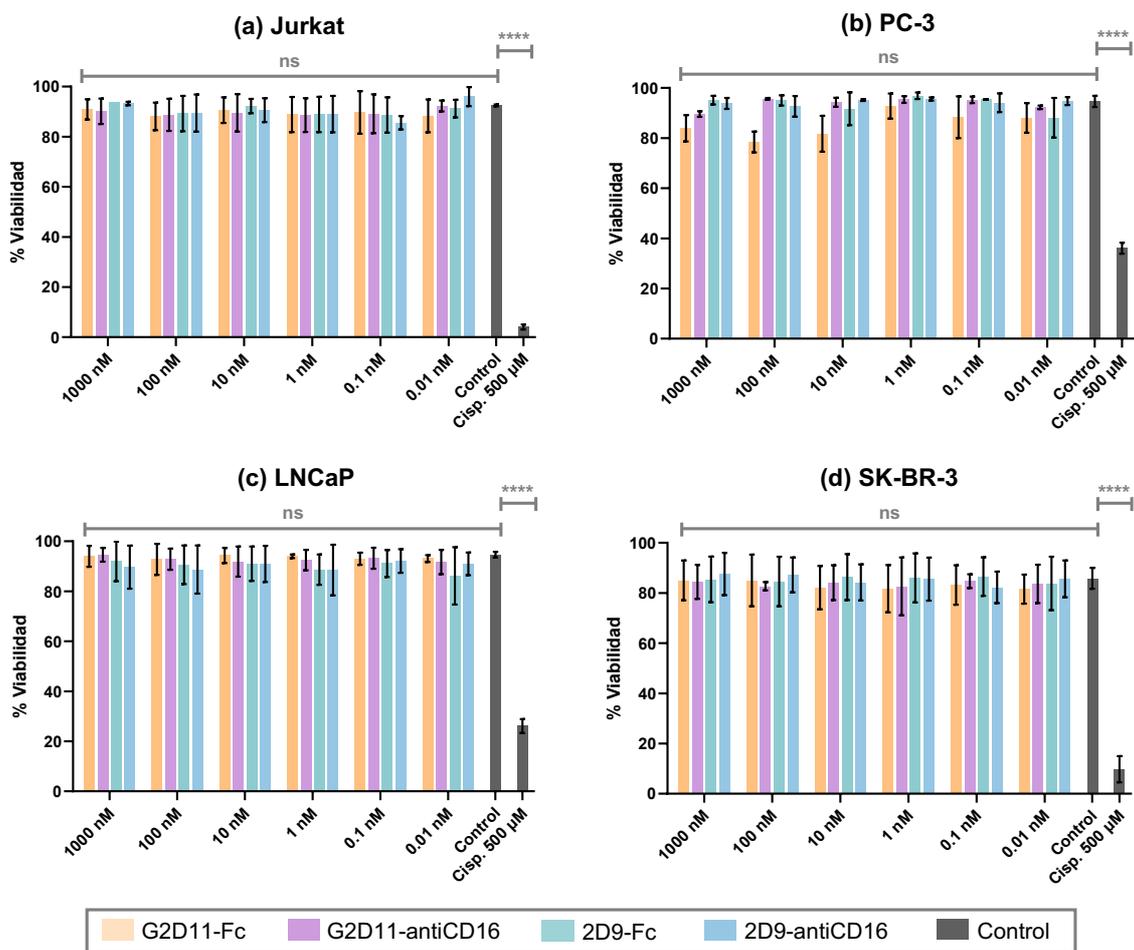


Figura 16. Experimentos de citotoxicidad de los scFv-Fc y los BiKEs incubados a diferentes concentraciones durante 4 días en placas de 96 pocillos con 4.000 células/pocillo. Como control negativo se utilizaron muestras de células si tratar y como control positivo se utilizaron células tratadas con cisplatino 500 μ M. Se representa el porcentaje de viabilidad, determinado por citometría de flujo tras el marcaje con anexina y 7-ADD, como la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. Se ha realizado un test ANOVA para comparar el % de viabilidad de las diferentes concentraciones y el control sin tratar entre sí, y un test-t de Student para comparar el control sin tratar con el control positivo ("ns" $p > 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Pruebas de CDC inducida por los scFv-Fc

Una de las funciones efectoras de los anticuerpos es su capacidad de activar el sistema del complemento para destruir células (CDC). Esta capacidad depende de la fracción Fc por lo que la capacidad de inducir CDC solo fue determinada para las proteínas G2D11-Fc y 2D9-Fc. La Fc de estas proteínas procede de IgG1 y por tanto es capaz de activar el complemento (44). Para realizar este experimento las células se incubaron con diferentes concentraciones de los scFv-Fc durante 4 horas en presencia y ausencia de 10% de suero humano procedente de donantes sanos como fuente de complemento, según se explica en materiales y métodos.

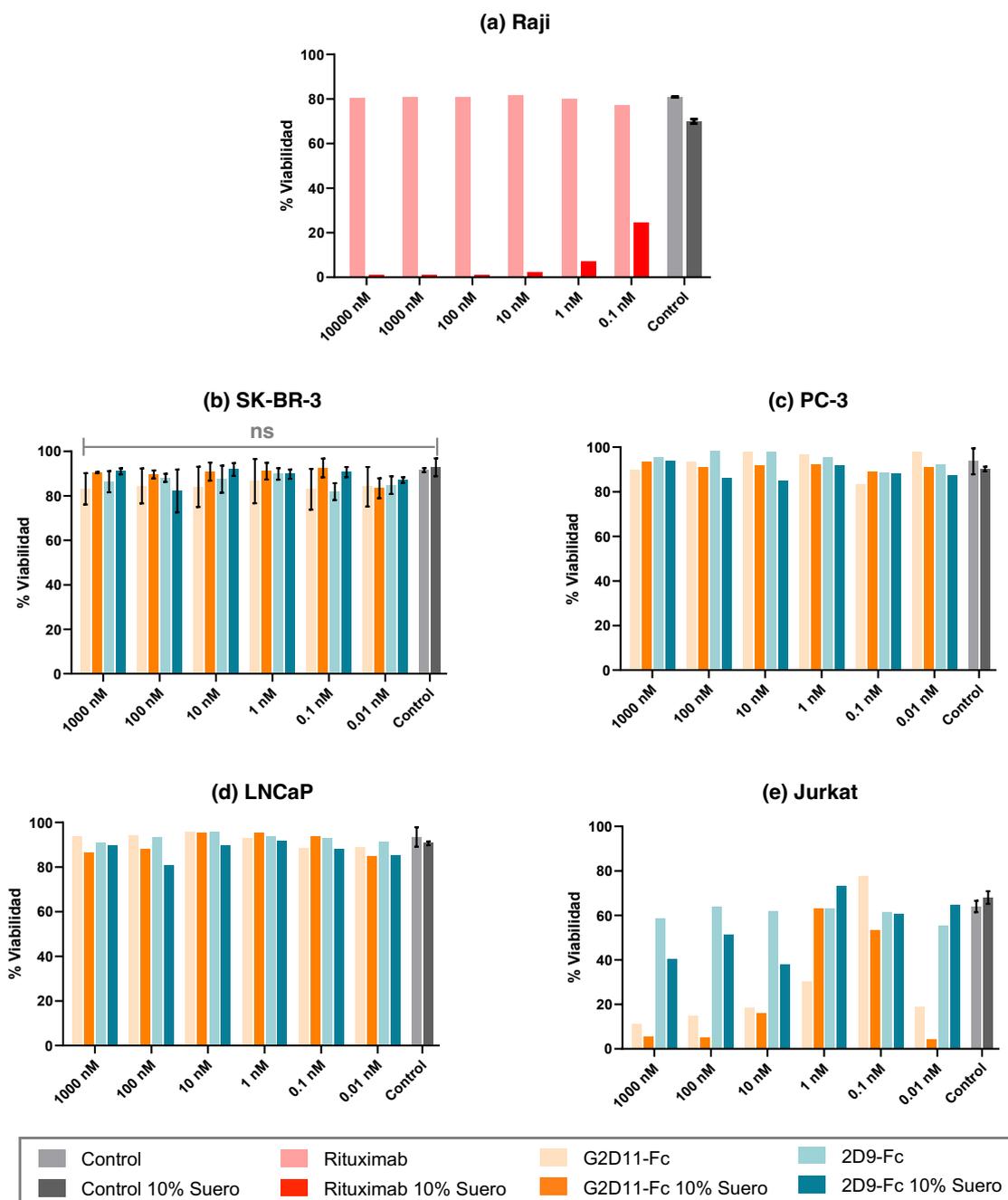


Figura 17. (b, c, d, e) Experimentos de CDC inducida por G2D11-Fc y 2D9-Fc incubados a diferentes concentraciones durante 4 horas en cultivos in vitro en presencia y ausencia de 10% de suero de

donantes sanos. **(a)** Como control positivo se ha utilizado Rituximab y la línea celular Raji que expresa CD20, el antígeno de Rituximab. Se representa el porcentaje de viabilidad, determinado por citometría de flujo tras el marcaje con anexina y 7-ADD, de un experimento excepto en el caso de las células SK-BR-3 **(b)** que se representa la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se ha realizado un test ANOVA para comparar el porcentaje de viabilidad de las diferentes concentraciones y el control sin anticuerpo entre sí (“ns” $p > 0.01$).

En la Figura 17 presenta los resultados obtenidos en este experimento donde podemos observar que en las células SK-BR-3, LNCaP y PC-3 la viabilidad se mantiene alta en todas las muestras, por lo que podríamos concluir que los scFv-Fc no han sido capaces de inducir CDC. Por otro lado, el caso de las células Jurkat (Figura 17 e) necesita un análisis más detallado. En primer lugar se observa que en las muestras con 2D9-Fc (verde claro) la viabilidad se mantiene más o menos constante y similar al control, aunque la viabilidad del control no es demasiado alta (aproximadamente 70%). Sin embargo, al añadir el suero (verde oscuro), la viabilidad en las tres muestras con el 2D9-Fc más concentrado disminuye, lo que podría indicar que ha activado el complemento. En el caso de G2D11-Fc (naranja claro), llama la atención que salvo en el pocillo menos concentrado, en el resto la viabilidad va disminuyendo conforme aumenta la concentración. Esto podría significar que G2D11 podría tener un efecto citotóxico a tiempos cortos, en este caso la incubación fue de 4 horas, en la línea celular Jurkat como se discutirá más adelante. Un efecto similar se observa en los resultados de las pruebas de inducción de ADCC (Figura 21 c) que se presentan más adelante. Finalmente, al añadir suero (naranja oscuro) la viabilidad no disminuye respecto a la muestra sin suero y misma concentración de G2D11-Fc.

En este experimento se utilizó un control positivo que consistió en incubar las células Raji con Rituximab (Figura 17 a), cuyo antígeno es CD20 expresado por estas células, donde se observó un claro efecto CDC al añadir el suero confirmando que el sistema utilizado es adecuado para analizar CDC. A pesar de que el control positivo fuese capaz de inducir CDC, esto no valida completamente el experimento. Por un lado, Rituximab es un anticuerpo comercial cuya Fc ha sido modificada para activar más eficazmente tanto la ADCC como la CDC, y por otro lado las células Raji proceden de un tumor hematológico, mientras que las células SK-BR-3, LNCaP y PC-3 proceden de tumores sólidos que pueden ser más resistentes tanto a la ADCC como a la CDC. De hecho, las células Jurkat en las que al menos parece que 2D9-Fc ha inducido algo de CDC también proceden de un tumor hematológico. Por ello, planteamos un segundo control positivo incubando las cuatro líneas celulares con diferentes concentraciones de otros dos anticuerpos: Trastuzumab (anti-HER2) y Cetuximab (anti-EGFR) que se usan en el tratamiento de tumores sólidos. Estos anticuerpos son del isotipo IgG1, igual que Rituximab, y que nuestra región Fc, pero no están modificados, aun así deberían de ser capaces de activar tanto ADCC como CDC. No obstante, este control positivo no funcionó para ninguna de las líneas celulares, incluso en las células LNCaP que expresan gran cantidad de EGFR (86) (Figura 18). Esto significa que no podemos extraer ninguna conclusión en cuanto a si G2D11-Fc y 2D9-Fc son capaces o no de inducir CDC, porque puede que si lo sean pero el experimento no esté bien diseñado y por eso no lo observamos o bien las células de tumores

sólidos presentan más resistencia a la CDC. Por ello este experimento debe ser repetido modificando la concentración de los anticuerpos, la concentración de suero y el tiempo de incubación.

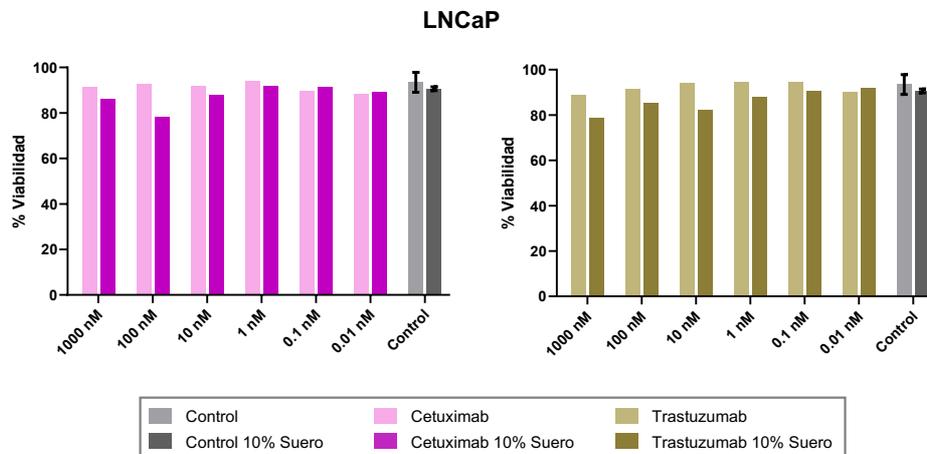


Figura 18. Experimentos de CDC inducida por Cetuximab y Trastuzumab incubados a diferentes concentraciones durante 4 horas en cultivo in vitro de células LNCaP. Se representa el porcentaje de viabilidad, determinado por citometría de flujo tras el marcaje con anexina y 7-ADD, de un experimento.

Pruebas de unión de los scFv-Fc y BiKEs a células NK

El objetivo de este experimento fue determinar la capacidad de la Fc y de los antiCD16 producidos en este trabajo para unirse a las células NK humanas. En primer lugar se aislaron PBMCs a partir de un leukopak de donante sano y después se separaron las células CD56⁺ utilizando el sistema MACS® (Miltenyi Biotec) de separación inmunomagnética como se explica en materiales y métodos. A continuación las células NK se fenotiparon por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD3, anti-CD56 y anti-CD16, para identificar el porcentaje de células NK (CD3⁻ CD56⁺) tras la separación y la expresión de CD16, ya que es el receptor de la Fc y la diana del antiCD16 del BiKE. Como puede observarse en la Figura 19 aproximadamente el 81% de las células CD3⁻ CD56⁺ expresan además CD16.

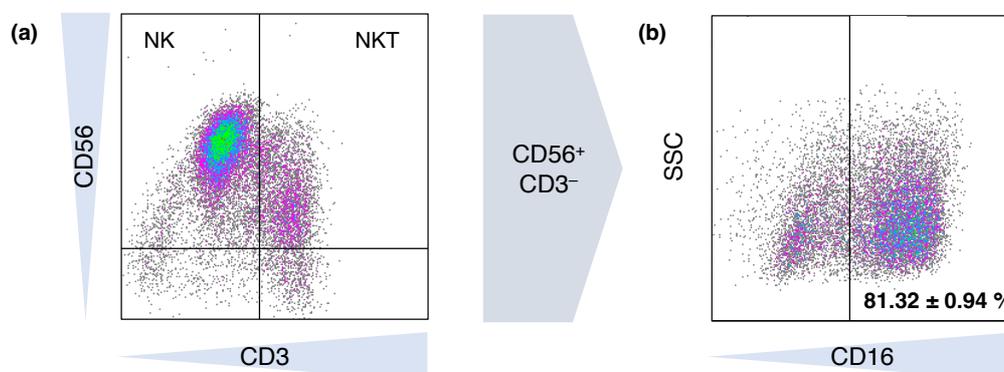


Figura 19. (a) Diagrama de puntos obtenido por citometría de flujo al representar la intensidad de fluorescencia correspondiente al marcaje con anticuerpo anti-CD56 en función de la intensidad correspondiente al anticuerpo anti-CD3 de una muestra de células NKs recién purificadas a partir de

PBMCs de un donante sano. **(b)** Diagrama de puntos obtenido por citometría de flujo al representar el conjunto de células $CD56^+CD3^-$ de la población anterior en función de la intensidad de fluorescencia correspondiente al marcaje con un anticuerpo anti-CD16 y la luz dispersada por la célula (SSC: side scatter). Se representan los diagramas de puntos de una muestra representativa y el porcentaje de células NK $CD16^+$ se presenta como la media \pm desviación estándar de realizar el marcaje de la misma muestra por triplicado.

Por otro lado, las células NK se marcaron con las cuatro proteínas unidas a GFP a una concentración de $4 \mu\text{M}$ y posteriormente se analizaron por citometría de flujo obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 20. En todos los casos el marcaje es significativo, por lo que podemos concluir que nuestras proteínas se unen correctamente a su receptor en la superficie de las células NK. No obstante, esto no demuestra que sean eficaces a la hora de activar el mecanismo de ADCC contra el tumor.

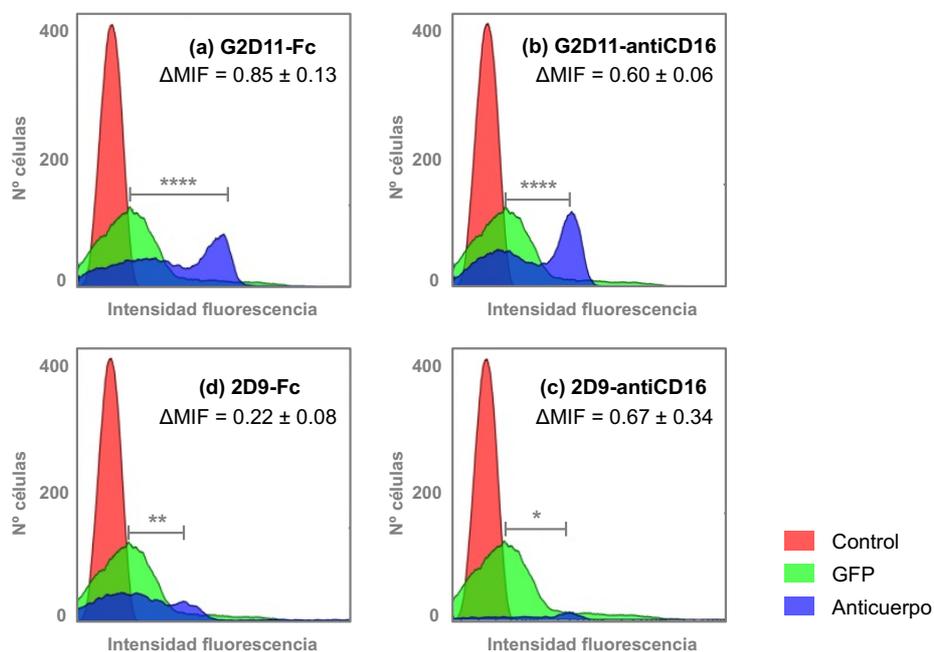


Figura 20. Histogramas obtenidos por citometría de flujo al representar el número de células en función de la intensidad de fluorescencia en el marcaje de células NK con las proteínas unidas a GFP a una concentración de $4 \mu\text{M}$. Como control se han utilizado muestras de las mismas células sin marcar y marcadas solamente con GFP $4 \mu\text{M}$. Los histogramas presentan un ejemplo representativo de cada proteína. El desplazamiento de la mediana de intensidad de fluorescencia (ΔMIF) se representa como la media \pm desviación estándar de realizar el marcaje de la misma muestra por triplicado. Se ha realizado un test-t de Student para comparar la MIF entre las muestras marcadas con el anticuerpo y el control con GFP (“ns” $p > 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

La unión de las cuatro proteínas no es igual de significativa ni genera el mismo desplazamiento de la MIF. Como se explicó en la introducción, cabía esperar diferencias entre la unión del scFv-Fc y del BiKE a la célula NK. Los BiKE deberían marcar con más intensidad puesto que se unen a la NK a través de un anticuerpo antiCD16 y los anticuerpos tienen alta afinidad, mientras que el Fc de los scFv-Fc es reconocido por CD16 que es un receptor de baja afinidad por la Fc (65). Además, estas NK se utilizaron recién aisladas de sangre periférica por lo que tendrán sus receptores de Fc ocupados por otros anticuerpos de la sangre del donante, lo que

dificultaría la unión del scFv-Fc. No obstante, lo que observamos es que en el caso de G2D11-Fc el marcaje es más intenso respecto a los BiKEs, y en el caso de 2D9-Fc es más leve. Esto puede ser consecuencia de nuevo de la concentración, como se ha explicado previamente las alícuotas de proteínas-GFP utilizadas en los marcajes se cuantificaron por Bradford, por lo que la concentración real puede ser bastante diferente del 4 μ M teóricamente utilizado, y los diferentes marcajes no pueden ser comparados entre sí.

Otro aspecto destacable de los histogramas de la Figura 20 es la presencia de dos poblaciones de células NK en el marcaje (dos picos en el histograma azul), esto se ve especialmente claro en el marcaje con G2D11-antiCD16 (Figura 20 b). Esto se debe a que no todas las células marcadas y analizadas son células NK que expresan CD16, como vemos en el análisis de la Figura 19 hay una cantidad de relevante de células NKT y otras poblaciones. Algunas subpoblaciones de células NKT no expresan CD16, por lo que no se van a marcar generando este segundo pico en el histograma a la altura del control.

Pruebas de ADCC inducida por los scFv-Fc y BiKEs

En el experimento anterior hemos demostrado que las proteínas son capaces de unirse a las células NK, lo que indica un plegamiento adecuado y que no hay impedimentos estéricos. Para comprobar si esta unión es suficiente para activar a las células NK contra el tumor co-incubamos *in vitro* líneas tumorales con diferentes concentraciones de las proteínas y en presencia o ausencia de células NK. Las células NK se utilizaron en una proporción de 5 NK por cada célula tumoral. Como se explicó en materiales y métodos, el protocolo original implica un proceso de expansión a activación de los PBMCs que dura 15 días. No obstante, debido a que no seguimos bien el protocolo esta expansión no funcionó adecuadamente, y al no disponer de tiempo suficiente para repetirla se decidió realizar el experimento con células NK purificadas directamente a partir de los PBMCs de un donante sano.

Las células NK se analizaron para determinar la expresión de CD16 igual que en el experimento anterior, en este caso el 71,79% de las células tras la separación inmunomagnética son CD3⁻ CD56⁺ y de ellas el 89,46% son CD16⁺, por lo que podrían ser activadas por las proteínas. Además, en este caso las células NK se marcaron con una sonda fluorescente para poder diferenciarlas de las células tumorales posteriormente en el análisis por citometría.

Al no haber realizado la expansión y activación de las células NK supusimos que estas serían menos activas y decidimos incubar el experimento durante 12 horas, en lugar de las 4 horas habituales. Obtuvimos los resultados presentados en la Figura 21 donde se puede observar que para las tres líneas celulares la viabilidad del control sin anticuerpos pero con células NK es muy baja. En estos experimentos es esperable que la viabilidad de este control disminuya debido a que, como se explicó en la introducción, las células NK disponen de otros receptores que no dependen de anticuerpos para identificar y atacar a las células tumorales. No obstante, las células NK recién purificadas resultaron ser muy activas y la viabilidad de este

control es demasiado baja. A pesar de ello, podemos extraer algunas conclusiones de estos resultados.

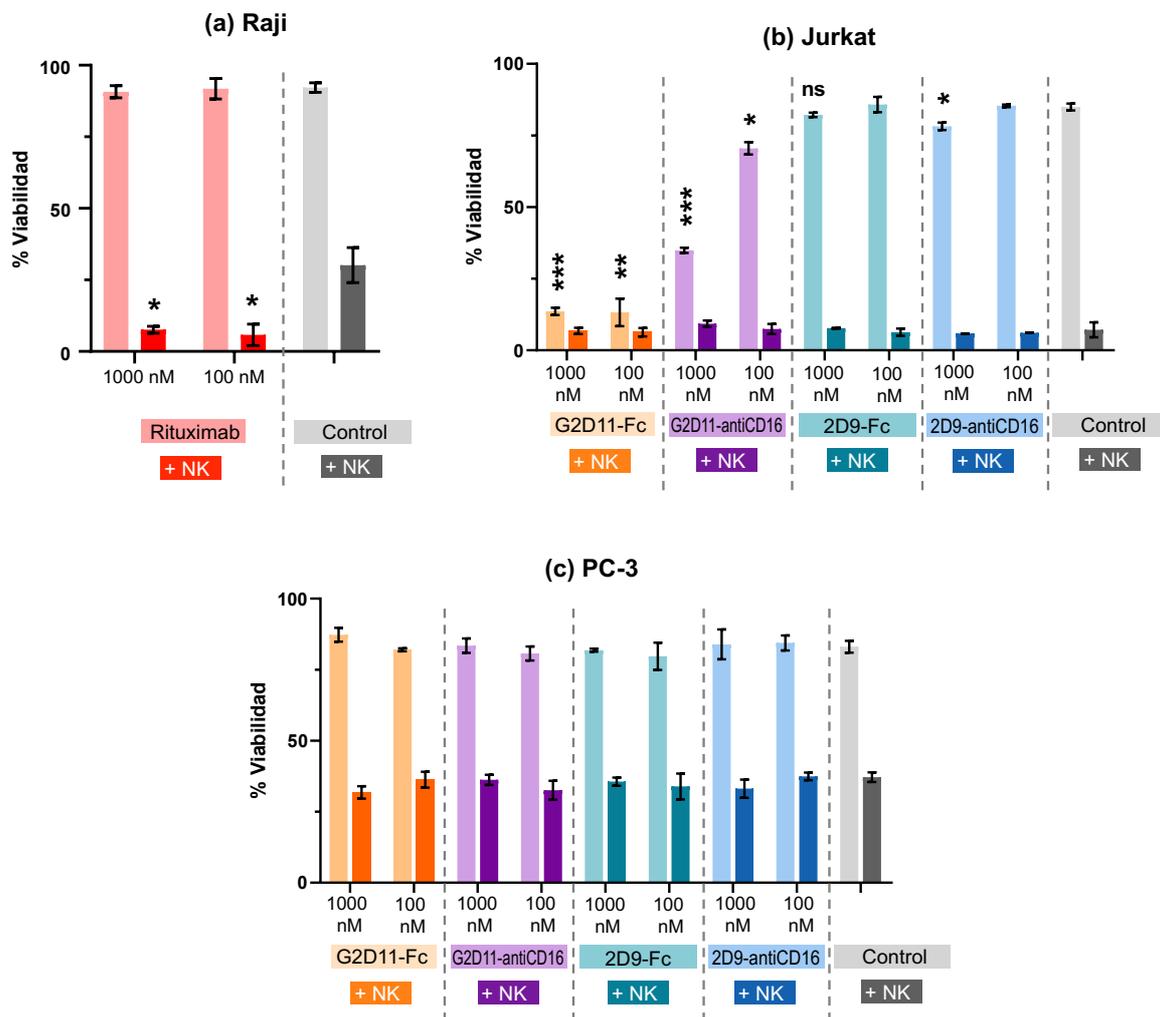


Figura 21. (b, c) Experimentos de ADCC inducida por los scFv-Fc y BiKE incubados a dos concentraciones diferentes (1000 y 100 nM) durante 12 horas en presencia o ausencia de células NK recién purificadas a partir de PBMCs de donante sano. Se utilizó un ratio NK:diana de 5:1. Como control negativo se incubaron las células sin anticuerpos. **(a)** Como control positivo se ha utilizado Rituximab y la línea celular Raji que expresa CD20, el antígeno de Rituximab. Se representa el porcentaje de viabilidad, determinado por citometría de flujo tras el marcaje con anexina y 7-ADD, como la media \pm desviación estándar de un experimento realizado por duplicado. Se ha utilizado el test-t de Student para comparar algunos puntos con su control negativo correspondiente (“ns” $p > 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

En primer lugar, en el control positivo de las células Raji y Rituximab (Figura 21 a) la viabilidad de su control con NK (gris oscuro) no ha llegado al 0%, y podemos ver como al añadir el anticuerpo Rituximab (rojo oscuro) la viabilidad todavía disminuye más, siendo este cambio significativo como se indica en el gráfico. No obstante, este control positivo solo valida en parte el experimento, puesto que tiene algunas limitaciones como se ha comentado previamente en las pruebas de inducción de CDC. En el caso de las células PC-3 (Figura 21 c), la viabilidad del control con NK (gris oscuro) es igual a la viabilidad de las muestras con los

scFv-Fc y BiKE (colores oscuros), no obstante, en ausencia de un control positivo válido para las células de tumores sólidos, no podemos afirmar que estas proteínas son incapaces de inducir ADCC.

Finalmente, en el caso de las células Jurkat (Figura 21 b) el porcentaje de viabilidad del control con NK (gris oscuro) es muy bajo, queda cerca del 0%, por lo que no queda margen para que las proteínas reduzcan todavía más la viabilidad y no podemos sacar ninguna conclusión sobre su funcionalidad. No obstante, hay otra observación interesante en este gráfico. Como ocurría en las pruebas de inducción de CDC (Figura 17 e), al incubar G2D11 solo (naranja y morado claro) junto con las células Jurkat durante tiempos cortos, 12 horas en este caso, se produce una reducción de la viabilidad muy significativa. Aunque tanto para las pruebas de CDC como de ADCC solo se realizó un experimento sin réplicas, tomando los datos en conjunto tenemos dos experimentos independientes en los que la incubación de células Jurkat con G2D11 a tiempos cortos tiene un efecto citotóxico. Está claro que son necesarios más experimentos para verificar esta observación, ya que puede deberse a cualquier otro error experimental que no hemos conseguido identificar. En caso de que se verifique se debería averiguar porque la citotoxicidad observada en estos dos experimentos a corto plazo (4 y 12 horas) no se observa en los experimentos a largo plazo (4 días, Figura 16 a).

Discusión

En este trabajo se han producido cinco proteínas, dos de las cuales, antiCD16-Fc y G2D11(H32A-H35A-S52A)-Fc, se produjeron como controles pero no se llegaron a utilizar. Las tres restantes, G2D11-antiCD16, 2D9-Fc y 2D9-antiCD16, se han utilizado posteriormente junto con G2D11-Fc, previamente sintetizado en el grupo, en pruebas *in vitro* para verificar su funcionalidad. Cabe destacar que conseguimos expresar las cinco proteínas con un rendimiento muy bueno y con un grado de pureza adecuado para su uso en ensayos *in vitro*. Tras la purificación no se observan otras bandas significativas contaminantes en los geles de electroforesis. A pesar de que la producción de proteínas recombinantes fue la parte que más tiempo de laboratorio supuso, no genera datos susceptibles de discusión.

El siguiente paso consistió en verificar el correcto plegamiento de las proteínas, puesto que es necesario para el desarrollo de su función. En este sentido realizamos una electroforesis en condiciones no desnaturizantes para demostrar que los scFv-Fc dimerizan, debido a la presencia de la región Fc de IgG1 humana, y que los BiKEs no lo hacen como cabía esperar. A pesar de que las bandas en el gel no desnaturizante están a la altura correcta, aparecen duplicadas y esto nos hace sospechar que puede haber dos subpoblaciones de la proteína que migran de forma diferente. Podría ser bien por que adoptan configuraciones tridimensionales ligeramente diferentes o porque hay una población glicosilada y otra no, lo que no es muy probable dado que se ha usado en sistema de expresión en células de mamífero. En caso de que la razón fuese esta última tendríamos un problema para la funcionalidad de la proteína, puesto que para que el Fc sea reconocido por su receptor debe estar correctamente glicosilado y dimerizado. esperar. Por otro lado, el experimento de adhesión nos permitió demostrar que la región Fc de las proteínas está correctamente plegada y los marcajes de las células NK, a falta de un control positivo, sugieren que el Fc está glicosilado puesto que es reconocido por su receptor.

Se marcaron células NK aisladas de donantes sanos para verificar si los Fc y los antiCD16 expresados en este trabajo son capaces de unirse a estas células, lo que resulta esencial para su funcionamiento. Las células NK se marcaron con las cuatro proteínas lo cual demuestra que son capaces de unirse, pero la intensidad del marcaje no fue la esperada. En teoría los antiCD16 deberían marcar más las NK puesto que los anticuerpos tienen alta afinidad y CD16 es un receptor de baja afinidad por la Fc (28,65,71). Estas discrepancias podrían achacarse de nuevo a que el método utilizado para calcular la concentración de las proteínas con GFP no es preciso y por tanto la concentración real utilizada en los marcajes no es adecuada. En cualquier caso estos experimentos demuestran que el Fc de las proteínas que hemos expresado está glicosilado puesto que ha sido reconocido por los receptores de las células NK (87), no obstante, hubiéramos necesitado como control positivo un anticuerpo que superamos que se une conjugado con GFP, pero no disponíamos de él.

Por otro lado, se han utilizado alícuotas de las proteínas recogidas antes de eliminar la GFP en el proceso de purificación para marcar las líneas celulares con dos objetivos. El primer objetivo es verificar que los anticuerpos reconocen al antígeno Tn puesto que el marcaje observado en nuestros experimentos coincide con la bibliografía. En el caso de las células Jurkat observamos un marcaje intenso de acuerdo con lo que indica la bibliografía (82), para las células SK-BR-3 y PC-3 podemos considerar que el marcaje es positivo aunque tenue cuando la bibliografía indica que si expresan el antígeno (83,84), y para las células LNCaP se observa también un marcaje tenue pero la bibliografía indica que no sintetizan antígeno Tn (85). Probablemente los resultados hubieran sido más precisos si hubiéramos utilizado una concentración de anticuerpo más alta para el marcaje. Aunque la concentración está dentro del rango recomendado por las casas comerciales, al no tratarse de un anticuerpo comercial que habitualmente tienen más afinidad, y haber cuantificado la concentración con un método poco preciso, es posible que la concentración real utilizada para el marcaje sea demasiado baja. Esperamos que al titrar concentraciones crecientes de los ScFv obtengamos una donde el marcaje de las células SK-BR-3 y PC-3 sea más intenso, y el de las células LNCaP se mantenga tenue como indica la bibliografía (83–85). No obstante, es importante destacar que los anticuerpos 2D9 y G2D11 han sido probados por otros investigadores y su especificidad está demostrada en la bibliografía (58,70).

El segundo objetivo puede entenderse como el primero leído a la inversa. Estos marcajes nos sirven para fenotipar las líneas celulares que utilizaremos en los experimentos y poder discutir así los resultados de estos. Los anticuerpos G2D11 y 2D9 reconocen distintos epítomos del antígeno Tn. En primer lugar G2D11 reconoce dos antígenos Tn consecutivos sin importar a que proteína estén unidos(58), esta promiscuidad se piensa que podría solucionar los problemas del antígeno Tn como diana de inmunoterapia. En realidad el antígeno Tn es una estructura demasiado sencilla para ser reconocida por un anticuerpo o un TCR, por lo que estos al final acaban reconociendo algo más que su estructura, como por ejemplo la proteína a la que se unen (72). Esto hace que aunque el antígeno Tn esté presente en el tumor, solo un porcentaje de este pueda ser reconocido por el anticuerpo. G2D11 al no depender de la secuencia peptídica a la que está unido el antígeno Tn podría verse menos afectado. Por otro lado el anticuerpo 2D9 reconoce al antígeno Tn unido a la secuencia GSTA que se encuentra altamente repetida en MUC1 (70), como MUC1 es una de las glicoproteínas más abundantes en el tejido epitelial, se piensa que 2D9 podría ser muy eficaz para el tratamiento de los carcinomas (53).

El objetivo del trabajo era comprobar si las scFv-Fc y los BiKEs producidos son capaces de activar a las células NK contra el tumor, pero podría ser que la propia proteína por sí misma resultase tóxica para el tumor. Para evaluar este efecto se realizaron ensayos de citotoxicidad incubando distintas concentraciones de las proteínas junto con las células durante 4 días. Estos ensayos demostraron que las proteínas per se no tienen capacidad citotóxica, al menos a largo plazo, porque posteriormente en los controles de otros experimentos hemos observado que al incubar G2D11, ya sea G2D11-Fc o G2D11-antiCD16, durante tiempos cortos

(4 o 12 horas) la viabilidad se reduce drásticamente, hasta alrededor del 10-20% de viabilidad. Esta observación podría deberse a algún error durante el desarrollo del experimento que no hayamos sido capaces de identificar, por lo que en este sentido son necesarias más pruebas para validar esta observación.

Finalmente realizamos experimentos funcionales con las proteínas. En primer lugar se realizaron pruebas para verificar si G2D11-Fc y 2D9-Fc son capaces de activar el sistema del complemento (CDC) contra células tumorales, una función que los anticuerpos normales de isotipo IgM o IgG pueden hacer a través de su Fc (44). En nuestro caso no observamos esta activación del complemento por parte de G2D11-Fc y 2D9-Fc, no obstante, esto no nos permite afirmar que sus Fc no son funcionales. Aunque utilizamos las células Raji y el anticuerpo monoclonal Rituximab como control positivo, estas células son de tumor hematológico que es más sensible y el anticuerpo Rituximab tiene su Fc modificada para ejercer más eficazmente las funciones efectoras, por lo que este control no valida completamente que el diseño de nuestro experimento fuera correcto. Por ello, preparamos un segundo control positivo utilizando (entre otros) las células LNCaP y el anticuerpo Cetuximab, al igual G2D11-Fc y 2D9-Fc, este control positivo no consiguió inducir CDC a pesar de que las células LNCaP expresan el antígeno de Cetuximab (86). Esto sugiere que quizá las células de tumor sólido son más resistentes a CDC como se ha indicado previamente en trabajos donde se demuestra que algunos tumores desarrollan estrategias de evasión del complemento. De hecho se ha descrito resistencia a CDC mediada por Trastuzumab y Cetuximab en determinadas líneas de tumores sólidos, incluyendo cáncer de próstata (88,89). No obstante, habrá que repetir los experimentos modificando varios factores como concentraciones de scFv-Fc y suero y tiempos de incubación antes de poder concluir nada más a este respecto.

Finalmente, solo pudimos realizar una prueba de inducción de ADCC y además sin seguir el protocolo original. El tiempo de incubación fue demasiado largo por lo que la viabilidad de los controles ya era de partida demasiado baja, tratar de identificar a partir de estos datos si al añadir el scFv-Fc o el BiKE la viabilidad se ve afectada es poco riguroso. A pesar de ello en el control positivo, con células Raji y Rituximab, al añadir el anticuerpo la viabilidad disminuye respecto al control con células NK, no obstante ya se ha discutido que este no es un control totalmente válido. En el caso de las Jurkat y las PC-3, las otras células con las que realizamos este experimento, no observamos diferencias entre el control con NK y las muestras tratadas con los scFv-Fc ni con los BiKE. Sin embargo, nuevamente, habrá que optimizar factores como el ratio de NK o los tiempos antes de poder concluir algo más, dada la gran actividad antitumoral presentada por las células NK en ausencia de scFv-Fc o BiKEs en nuestro experimento.

En general, para demostrar la funcionalidad de los BiKE producidos en este trabajo y comparar su actividad con la de los anticuerpos convencionales o en su caso sus scFv-Fc, lo cual era el objetivo de este trabajo, necesitamos disponer de los controles adecuados y repetir los

marcajes con las concentraciones precisas. Posteriormente podríamos utilizar modelos de microambiente tumoral *in vitro* o en animales de experimentación para verificar la hipótesis de que los BiKE serían capaces de contrarrestar el ambiente inmunosupresor del microambiente tumoral y activar a las células NK contra el tumor, lo cual se ha observado que no es posible con anticuerpos convencionales en la mayoría de los tumores sólidos.

En cualquier caso hemos conseguido expresar las proteínas y hemos demostrado que los scFv-Fc están correctamente plegados, dimerizados y (a falta del control positivo) glicosilados por lo que podrían ser funcionales. Los BiKE no tienen estos requerimientos y podemos asumir que están correctamente plegados, puesto que están formados por dos scFv que son proteínas pequeñas que se expresan habitualmente en muchos laboratorios sin obtener problemas de plegamiento, por lo que también deberían funcionar.

Conclusiones

- Las cinco proteínas se han expresado en células HEK 293 6F con rendimientos muy buenos y un grado de pureza adecuado para su uso en experimentos *in vitro*.
The five proteins have been expressed in HEK 293 6F cells with very good yields and a degree of purity suitable for use in *in vitro* experiments.
- Los datos de la electroforesis en condiciones no desnaturizantes, los experimentos de adhesión y el marcaje de células NK, este último a falta de un control positivo, permiten afirmar que los scFv-Fc producidos están correctamente plegados, dimerizados y glicosilados, lo que resulta esencial para su funcionalidad.
The data from the electrophoresis under non-denaturing conditions, the adhesion experiment and the labeling of NK cells, this in absence of a positive control, allow us to affirm that the scFv-Fc produced are correctly folded, dimerized and glycosylated, which is necessary for its function.
- Los resultados del marcaje de células NK con las proteínas han demostrado que los BiKEs producidos se unen correctamente a CD16 en la membrana de la célula NK, lo que es necesario para su funcionamiento.
The results of labeling NK cells with the proteins have shown that the BiKEs produced can bind to CD16 on the NK cell membrane, which is necessary for its function.
- El marcaje de líneas celulares con 2D9 y G2D11 de las distintas proteínas expresadas, a pesar de ser tenue, coincide con el fenotipo de la bibliografía por lo que reconocen el antígeno Tn como era de esperar.
The labeling of cell lines with 2D9 and G2D11 of the different expressed proteins, despite being tenuous, coincides with the phenotype of the bibliography, so they recognize Tn antigen as expected.
- Las proteínas expresadas por si solas no son capaces de inducir citotoxicidad sobre cultivos *in vitro* de células tumorales a largo plazo. No obstante, son necesarios más experimentos para verificar la citotoxicidad de G2D11 sobre células Jurkat a corto plazo.
The expressed proteins by themselves are not capable of inducing cytotoxicity on *in vitro* cultures of tumor cells in long term. However, more experiments are needed to verify the cytotoxicity of G2D11 on Jurkat cells in short term.
- La funcionalidad de los scFv-Fc y BiKEs producidos para activar el sistema del complemento (CDC) y a las células NK (ADCC) contra el tumor en cultivos *in vitro* no ha podido ser demostrada ante la falta de los controles positivos adecuados para validar el procedimiento experimental.
The capacity of the scFv-Fc and BiKEs produced to activate the complement system (CDC) and NK cells (ADCC) against the tumor in *in vitro* cultures couldn't be demonstrated due to the lack of an appropriate positive control to validate the experimental procedure.

Anexo I. Composición de los tampones.

Tampón A

25 mM TRIS pH 7.5

500 mM NaCl

10 mM Imidazol

Tampón B

25 mM TRIS pH 7.5

500 mM NaCl

400 mM Imidazol

PBS

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

pH 7.4

Bibliografía

1. Cáncer [Internet]. [cited 2022 Dec 28]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg S. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 11th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D. Molecular Biology of the Cell. 6th ed. New York: Garland Science; 2015.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
5. Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, True LD, Nelson WG, Epstein JI, et al. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. Nat Rev Urol. 2021;18(2):79–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33328650/>
6. Anderson RL, Balasas T, Callaghan J, Coombes RC, Evans J, Hall JA, et al. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. Nature Reviews Clinical Oncology. 2018;16(3):185–204. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41571-018-0134-8>
7. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;287(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15194558/>
8. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. Cell. 2010;141(1):39–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.03.014>
9. Grivnennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell. 2010;140(6):883–99. Available form: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303878/>
10. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. Annu Rev Immunol. 2011;29:235–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219185/>
11. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Cancer Cell. 2012;21(3):309–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.02.022>
12. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. Nat Rev Clin Oncol. 2021;18(12):792. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34489603/>
13. Lei X, Lei Y, Li JK, Du WX, Li RG, Yang J, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. Cancer Lett. 2020;470:126–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31730903/>

14. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J, Owen JA. KUBY Inmunología. 8th ed. New York: Macmillan education; 2019.
15. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11323675/>
16. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18026089/>
17. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni1102-991>
18. van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, van Hall T, Melief CJM. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer*. 2016 Apr 11;16(4):219–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26965076/>
19. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol*. 2016;37(12):855. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27793569/>
20. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2756–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30270458/>
21. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29319160/>
22. Kolaczowska E, Kuberski P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23435331/>
23. Behrens LM, van Egmond M, van den Berg TK. Neutrophils as immune effector cells in antibody therapy in cancer. *Immunol Rev*. 2023;314(1):280–301. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.13159>
24. Giese MA, Hind LE, Huttenlocher A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*. 2019;133(20):2159–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30898857/>
25. Zhou J, Nefedova Y, Lei A, Gaboritovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol*. 2018;35:19–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29254756/>
26. Taborda NA, Hernández JC, Montoya CJ, Rugeles MT. Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología*. 2014;33(1):11–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2013.11.002>

27. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol.* 2019;105(6):1319–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31107565/>
28. Demaria O, Gauthier L, Debroas G, Vivier E. Natural killer cell engagers in cancer immunotherapy: Next generation of immuno-oncology treatments. *Eur J Immunol.* 2021;51(8):1934–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34145579/>
29. Liu X, Li L, Si F, Huang L, Zhao Y, Zhang C, et al. NK and NKT cells have distinct properties and functions in cancer. *Oncogene* 2021;40(27):4521–37. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41388-021-01880-9>
30. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17008531/>
31. ElTanbouly MA, Noelle RJ. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell’s journey. *Nature Reviews Immunology* 2020;21(4):257–67. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-00454-2>
32. Kurachi M. CD8+ T cell exhaustion. *Semin Immunopathol.* 2019;41(3):327–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30989321/>
33. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 2020;20(11):651–68. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0306-5>
34. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):295–307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848755/>
35. Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, et al. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:669474. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34012451/>
36. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14525967/>
37. Glasner A, Plitas G. Tumor resident regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2021;52:101476. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33906820/>
38. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2011;71(4):1263–71. Available from: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907>

39. Mazzarella PG, Bianco A, Catena E, De Palme R, Abbate GF. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy*. 2000;55 Suppl 61:6–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10919498/>
40. Deng J, Yin H. Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells in cancer immunotherapy; where it comes from, where it will go? *Eur J Pharmacol*. 2022;919. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35131312/>
41. Fridman WH, Petitprez F, Meylan M, Chen TWW, Sun CM, Roumenina LT, et al. B cells and cancer: To B or not to B? *Journal of Experimental Medicine*. 2021;218(1). Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20200851>
42. Chapter 8 - Monoclonal antibody targets and mechanisms of action. Strohl W, Strohl L. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing Series in Biomedicine. 2012;163–595. Available from: <https://doi.org/10.1533/9781908818096.163>
43. Kamen L, Myneni S, Langsdorf C, Kho E, Ordonia B, Thakurta T, et al. A novel method for determining antibody-dependent cellular phagocytosis. *J Immunol Methods*. 2019;468:55–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30880262/>
44. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci*. 2009;100(9):1566–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19538497/>
45. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev*. 2015;268(1):25–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26497511/>
46. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1014–22. Available from: <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
47. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*. 2004;10(1):48–54. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm976>
48. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol*. 1997;15(1):749–95. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749>
49. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, et al. Tumor-mediated liver X receptor- α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med*. 2010;16(1):98–105. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.2074>
50. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9(10):1269–74. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm934>

51. Corfield AP, Berry M. Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(7):351–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.04.004>
52. Fu C, Zhao H, Wang Y, Cai H, Xiao Y, Zeng Y, et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA.* 2016;88(6):275–86. Available from: <https://doi.org/10.1111/tan.12900>
53. Rømer TB, Aasted MKM, Dabelsteen S, Groen A, Schnabel J, Tan E, et al. Mapping of truncated O-glycans in cancers of epithelial and non-epithelial origin. *Br J Cancer.* 2021;125(9):1239–1250. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01530-7>
54. Sun X, Ju T, Cummings RD. Differential expression of Cosmc, T-synthase and mucins in Tn-positive colorectal cancers. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4708-8>
55. Hofmann BT, Schlüter L, Lange P, Mercanoglu B, Ewald F, Fölster A, et al. COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2015;14(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0386-1>
56. Festari MF, Da Costa V, Rodríguez-Zraquia SA, Costa M, Landeira M, Lores P, et al. The tumor-associated Tn antigen fosters lung metastasis and recruitment of regulatory T cells in triple negative breast cancer. *Glycobiology.* 2022;32(5):366–79. Available from: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab123>
57. Saeland E, Van Vliet SJ, Bäckström M, Van Den Berg VCM, Geijtenbeek TBH, Meijer GA, et al. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2007;56(8):1225–36. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-006-0274-z>
58. Persson N, Stuhr-Hansen N, Risinger C, Mereiter S, Polónia A, Polom K, et al. Epitope mapping of a new anti-Tn antibody detecting gastric cancer cells. *Glycobiology.* 2017;27(7):635–45. Available from: <http://doi.org/10.1093/glycob/cwx033>
59. ¿Qué es la inmunoterapia? | Cancer Research Institute [Internet]. [cited 2023 May 2]. Available from: <https://www.cancerresearch.org/es/la-inmunoterapia-en-profundidad>
60. Emily Whitehead - Cancer Research Institute [Internet]. [cited 2023 May 2]. Available from: <https://www.cancerresearch.org/stories/patients/emily-whitehead>
61. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.* 2017;3(10):250–61. Available from: <https://jcmtjournal.com/article/view/2275>
62. Wang Q, Chen Y, Park J, Liu X, Hu Y, Wang T, et al. Design and production of bispecific antibodies. *Antibodies.* 2019;8(3). Available from: <https://doi.org/10.3390/antib8030043>
63. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clin Dev Immunol.* 2012; 980250. Available from: <http://doi.org/10.1155/2012/980250>

64. Wirt T, Roskopf S, Rösner T, Eichholz KM, Kahrs A, Lutz S, et al. An Fc Double-Engineered CD20 Antibody with Enhanced Ability to Trigger Complement-Dependent Cytotoxicity and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2017;44(5):292. Available from: <https://doi.org/10.1159/000479978>
65. Felices M, Lenvik TR, Davis ZB, Miller JS, Vallera DA. Generation of BiKEs and TriKEs to improve NK cell-mediated targeting of tumor cells. *Methods in Molecular Biology*. 2016;1441:333–46. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3684-7_28
66. Nikkhai SK, Li G, Eleya S, Yang G, Vandavasi VG, Hatefi A. Bispecific killer cell engager with high affinity and specificity toward CD16a on NK cells for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2023;13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36685519/>
67. Gleason MK, Ross JA, Warlick ED, Lund TC, Verneris MR, Wiernik A, et al. CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood*. 2014;123(19):3016. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-533398>
68. Study Record | Beta ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 May 2]. Available from: <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT05099549>
69. Blincyto | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 May 2]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/blincyto>
70. Tarp MA, Sørensen AL, Mandel U, Paulsen H, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, et al. Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology*. 2007;17(2):197–209. Available from: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl061>
71. Reusch U, Burkhardt C, Fucek I, Le Gall F, Le Gall M, Hoffmann K, et al. A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells. *MAbs*. 2014;6(3):727–38. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mabs.28591>
72. Berois N, Pittini A, Osinaga E. Targeting Tumor Glycans for Cancer Therapy: Successes, Limitations, and Perspectives. *Cancers*. 2022;14(3):645. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/3/645/htm>
73. Fujita-Yamaguchi Y, Morita N, Yajima Y, Asanuma H, Nakada H. Inhibition of cancer cell growth by anti-Tn monoclonal antibody MLS128. *Biosci Trends*. 2009;3(1):32–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20103942/>
74. Gutierrez R, Shah PD, Hamid O, Garfall AL, Posey A, Bishop MR, et al. Phase I experience with first in class TnMUC1 targeted chimeric antigen receptor T-cells in patients with advanced TnMUC1 positive solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):e14513–e14513. Available from: https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e14513

75. Aricescu AR, Lu W, Jones EY. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica Section D*. 2006;62(Pt 10):1243–50. Available from: <https://doi.org/10.1107/S0907444906029799>
76. Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, Giudici M, Chotteau V, Field R, et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Sci Rep*. 2020;10(1):18996. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8>
77. Backliwal G, Hildinger M, Kuettel I, Delegrange F, Hacker DL, Wurm FM. Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101(1):182–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/bit.21882>
78. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Methods Mol Biol*. 1999;112:531-52. Available from: <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>
79. Núñez D, Domingo MP, Sánchez-Martínez D, Cebolla V, Chiou A, Velázquez-Campoy A, et al. Recombinant production of human ICAM-1 chimeras by single step on column refolding and purification. *Process Biochemistry*. 2013;48(4):708–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.006>
80. Sánchez-Martínez D, Azaceta G, Muntasell A, Aguiló N, Núñez D, Gálvez EM, et al. Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology*. 2015;4(3):1–13. Available from: <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.991613>
81. Direct flow cytometry (FACS) protocol | Abcam [Internet]. [cited 2023 Jun 1]. Available from: <https://www.abcam.com/protocols/direct-flow-cytometry-protocol>
82. Nakada H, Inoue M, Tanaka N, Numata Y, Kitagawa H, Fukui S, et al. Expression of the Tn antigen on T-lymphoid cell line Jurkat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179(2):762–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1716888/>
83. Springer GF. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med*. 1997;75(8):594–602. Available from: <http://doi.org/10.1007/s001090050144>
84. Medeiros A, Berois N, Incerti M, Bay S, Franco Fraguas L, Osinaga E. A Tn antigen binding lectin from *Myrsine coriacea* displays toxicity in human cancer cell lines. *J Nat Med*. 2013;67(2):247–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0671-x>
85. Drabik A, Ciołczyk-Wierzbička D, Dulińska-Litewka J, Bodzoń-Kuśakowska A, Suder P, Silberring J, et al. A comparative study of glycoproteomes in androgen-sensitive and -independent prostate cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2014;386(1):189. Available from: <https://doi.org/10.0.3.239/S11010-013-1857-6>
86. Jathal MK, Steele TM, Siddiqui S, Mooso BA, D’Abronzio LS, Drake CM, et al. Dacomitinib, but not lapatinib, suppressed progression in castration-resistant prostate cancer models by

- preventing HER2 increase. *Br J Cancer*. 2019;121(3):237. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0496-4>
87. Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16469–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11297532/>
88. Tsao LC, Crosby EJ, Trotter TN, Wei J, Wang T, Yang X, et al. Trastuzumab/pertuzumab combination therapy stimulates antitumor responses through complement-dependent cytotoxicity and phagocytosis. *JCI Insight*. 2022;7(6). Available from: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.155636>
89. Bellone S, Roque D, Cocco E, Gasparri S, Bortolomai I, Buza N, et al. Downregulation of membrane complement inhibitors CD55 and CD59 by siRNA sensitises uterine serous carcinoma overexpressing Her2/neu to complement and antibody-dependent cell cytotoxicity in vitro: implications for trastuzumab-based immunotherapy. *Br J Cancer*. 2012;106(9):1543–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22531721/>