

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

_____ Artículos _____
Originales

**Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs) y sus
Aplicaciones en la Construcción de Inmunotoxinas
para la Terapia Experimental del Cáncer***

TOMÁS GIRBÉS JUAN

*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Facultad
de Ciencias, Universidad de Valladolid, 47005 Valladolid.*

RESUMEN

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) son inhibidores de la síntesis de proteínas que inactivan a los ribosomas de manera irreversible. Las más conocidas son las RIPs vegetales de las cuales ricina es la más estudiada. El mecanismo de acción consiste en la depuración del ARNr mayor de los ribosomas (28 S ARNr en el caso de los mamíferos). Las RIPs aceptan también otros sustratos tales como ADN, ARN genómico viral y algunos polinucleótidos sintéticos que resultan multidepurados. Diversas RIPs presentan actividad antiviral contra virus vegetales y animales y actividad topológica sobre el ADN. En nuestro laboratorio hemos descubierto un nuevo tipo de RIP que hemos denominado RIP de tipo 2 no tóxica. Entre estas RIPs cabe destacar nigrina b y nigrina b básica de *Sambucus nigra* y ebulina de *Sambucus ebulus*. Estas RIPs son entre 1.000 y 10.000 veces menos tóxicas para células cultivadas y ratones que la ricina. La aplicación más notable de las RIPs es la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia experimental en particular la del cáncer humano. En nuestro laboratorio hemos preparado conjugados activos contra las células de cáncer de colon e inmunotoxinas activas contra células CD105+ características de la neovascularización tumoral.

* Discurso leído en su Toma de Posesión como Académico Correspondiente el 25 de noviembre de 1999.

Palabras clave: Proteínas inactivadoras de ribosomas.- RIPs.- Síntesis de proteínas.- Inmunotoxinas.- Cáncer.

SUMMARY

Ribosome-Inactivating proteins (RIPs) and their application in the construction of immunotoxins for the experimental therapy of cancer.

The ribosome –inactivating proteins (RIPs) are protein synthesis inhibitors that trigger the irreversible inactivation of ribosomes. The most known RIPs are those from plants being ricin the most studied one. The molecular mechanism of action of RIPs is the depurination of the largest rRNA (28 S rRNA in mammalian). RIPs act also on other substrates like DNA, viral genomic RNA and some synthetic polynucleotides which become multidepurinated. Some RIPs display antiviral activity on plant and animal viruses and also have a topological activity on double stranded DNA. We have found a novel kind of RIP that we named non-toxic type 2 RIP. Among these RIPs are nigrin and basic nigrin b from *Sambucus nigra* and ebulin from *Sambucus ebulus*. The new RIPs are between 1.000 and 10.000 times less toxic for cultured human cells and mice than ricin. The most noteworthy application of RIPs is the construction of conjugates and immunotoxins for the experimental therapy of human cancer. We have prepared conjugates active on colon cancer cells and immunotoxins active on CD105+ cells which are characteristic of the tumoral neovasculature.

Key words: Ribosome-inactivating proteins.- RIPs.- Protein synthesis.- Immunotoxins.- Cancer.

Excmo. Sr. Director de la Real Academia de Farmacia, Excmas. Sras. Académicas, Excmos. Sres. Académicos, señoras y señores, es para mi un gran honor ser admitido en la Real Academia de Farmacia y poder dirigirme hoy a todos ustedes. Quiero agradecer en primer lugar al Profesor D. Manuel Ruiz Amil Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y amigo, el haberme propuesto a esta institución como académico correspondiente y en segundo lugar el haber presentado mi curriculum de la manera tan generosa con que lo ha hecho. Agradezco asimismo a los Profs. D. Antonio Portolés Alonso y D. Juan Tamargo Menéndez el haber apoyado la propuesta del Prof. Ruiz Amil. Tengan la seguridad de que haré lo posible para no defraudarles y espero ser digno del honor que se me hace.

No estaría quizás hoy aquí si el malogrado Dr. David Vázquez no me hubiese orientado hace ya 25 años hacia el estudio de la biosíntesis de proteínas, tema este sobre el que continúo estudiando. Por lo tanto agradezco también al Dr. David Vázquez, cuya talla científica no voy a descubrir hoy aquí, la oportunidad única e inestimable que me brindó hace ya tanto tiempo. Agradezco también al Dr. D. Juan Modolell Mainóu su dirección en mi etapa formativa y su rigor científico que me han influido positivamente durante todos estos años. Mi agradecimiento se extiende también al Prof. D. Roberto Parrilla Sánchez, con cuyo trato adquirí una visión de conjunto de los procesos fisiológicos, que me ha ayudado a comprender gran cantidad de fenómenos de los seres vivos. Durante los años de mi carrera académica he contado con la inestimable ayuda de colegas y amigos sin cuyo trato enriquecedor muchas veces hubiese renunciado a la dura labor que supone la dedicación a la docencia y a la investigación, como todos ustedes saben bien, y en particular en las Universidades de provincias.

Mi actividad investigadora ha versado sobre diversos temas más o menos relacionados con la biosíntesis de proteínas. Hoy quiero presentarles de manera forzosamente sucinta la actividad que me ha ocupado los últimos 10 años, esto es, la investigación sobre las proteínas inactivadoras de ribosomas de origen vegetal, proteínas que como veremos están influyendo de modo decisivo en la terapia experimental de diversas enfermedades en particular del cáncer.

En 1978 el defensor de los derechos humanos Georgi Markov fue asesinado en las calles de Londres mediante un pinchazo en la pierna con la punta de un paraguas. Markov murió a los pocos días entre agudos dolores sin que se pudiese hacer nada por salvar su vida (1). Una profunda investigación reveló que la punta del paraguas contenía una minúscula cantidad de ricina, una poderosa toxina proteica aislada de las semillas del ricino (*Ricinus communis*) por Stillmark en 1889 (2). Pero no fue hasta la década de los setenta de nuestro siglo, exactamente en 1975, en el laboratorio del Dr. David Vázquez, cuando se descubrió que su acción sobre la biosíntesis de proteínas se ejercía de manera catalítica e irreversible (3). La ricina es hoy en día cabeza de serie de una familia de proteínas que comparten con la ricina el mismo efecto sobre la síntesis de

proteínas, esto es la inactivación irreversible de los ribosomas, de ahí que se conozcan como proteínas inactivadoras de ribosomas o RIPs, del inglés ribosome-inactivating proteins. Ruego me disculpen que por comodidad y fluidez expositiva utilice este término de RIP. Este campo puede considerarse en parte como desarrollo de la actividad pionera del Dr. David Vázquez y sus colaboradores sobre el modo de acción de los antibióticos y otros inhibidores de la síntesis protéica (4).

He dividido la exposición que voy a realizar en dos partes, en la primera dedicada a las RIPs abordaré los aspectos más notables de las RIPs de origen vegetal como son su distribución y clasificación, su estructura, su modo de acción molecular y celular, sus efectos antivirales y su posible papel biológico, y terminaré esta primera parte con las RIPs del género *Sambucus*.

En la segunda parte abordaré las aplicaciones de las RIPs a la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia experimental del cáncer, la angiogénesis asociada a tumores, la inmunotoxiterapia contra la neovascularización tumoral y terminaré con la consideración de algunos problemas clínicos que plantea la utilización in vivo de las inmunotoxinas en la terapia experimental del cáncer.

Veamos en primer lugar la distribución y clasificación de las RIPs vegetales. Hasta la fecha se han aislado 79 RIPs de origen vegetal, de las cuales, aproximadamente un tercio han sido descubiertas en nuestro laboratorio o en colaboración con investigadores extranjeros. Las familias Caryophyllaceae, Phytolacaceae, Euphorbiaceae, Cucurbitaceae y especialmente Sambucaceae son las más estudiadas y en las que se han encontrado mayor número de especies con RIPs. Entre estas RIPs cabe destacar además de la ricina, las saporinas, las PAP, la tricosantina o sustancia GLQ223, nigrina y ebulina por sus aplicaciones en la terapia humana como veremos después (4-6).

En la actualidad se clasifica a las RIPs esencialmente en dos categorías: RIPs de tipo 1 y RIPs de tipo 2 (4-6). Las RIPs de tipo 1 están formadas por una sola cadena polipeptídica que es la que presenta la actividad inhibidora de síntesis de proteínas. Las RIPs de tipo 2 están formadas por dos cadenas polipeptídicas heterólogas, una cadena inhibidora de síntesis de proteínas equivalente a las RIPs de tipo 1 que se

denomina cadena A y una cadena con propiedades de lectina, esto es proteína que liga azúcares, que se denomina cadena B. Las RIPS de tipo 2 pueden ser tóxicas como la ricina, abrina y proteínas relacionadas (5,6), debido a que poseen un dominio protéico que les permite atravesar las membranas celulares al reconocer y unirse a receptores de membrana plasmática y entrar en el citosol donde inhiben la síntesis de las proteínas. Las RIPS de tipo 2 pueden ser también no tóxicas para células humanas cultivadas y para ratones en relación con la ricina. Solo a concentraciones de entre 1.000 y 10.000 veces superiores a la ricina presentan toxicidad en ratones. Las RIPS de tipo 1 son menos tóxicas para las mismas células y animales de ensayo que las de tipo 2 tóxicas, excepción hecha de los macrófagos (5,6).

Las RIPS no tóxicas de dos cadenas han sido descubiertas en nuestro laboratorio (5-9). Como veremos después estas RIPS no tóxicas pueden ser de una gran utilidad potencial para la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia humana.

Veamos ahora la estructura de las RIPS. Las RIPS monocatenarias o de tipo 1 son polipéptidos de masa relativa entre 25.000 y 32.000. Todas las RIPS de tipo 1 conocidas poseen un carácter fuertemente básico con puntos isoeléctricos en el entorno de 9. Ello indica la predominancia de aminoácidos básicos; de hecho, el análisis del contenido en aminoácidos así lo indica. Muchas de ellas están glicosiladas lo que les confiere un fuerte carácter antigénico (5,6).

Las RIPS bicatenarias o de tipo 2 poseen masas relativas entre 56.000 y 68.000 con subunidades de masas relativas entre 26.000 y 33.000 (cadena A) y 28.000 y 38.000 (cadena B). En muchos casos están también glicosiladas. Las cadenas A de las RIPS de tipo 2 poseen homología secuencial con las RIPS monocatenarias, mientras que las cadenas B la poseen con las lectinas de la misma familia vegetal (5,6).

Los estudios de estructura por difracción de rayos X han permitido revelar la estructura espacial fina de algunas de estas proteínas. El ejemplo más notable es la ricina, en cuya estructura se han podido definir los sitios de unión de la cadena B con restos de galactosa, las cadenas de polisacárido unidas covalentemente en la cadena B y el centro

activo responsable de la actividad enzimática localizado en la cadena A (5).

Veamos ahora el modo de acción molecular de las RIPs. A finales de 1987 Endo descubrió que la ricina presentaba una actividad enzimática como N-glicosidasa del ácido ribonucleico ribosómico o ARN 28 S. Posteriormente se ha demostrado esta actividad como característica de las RIPs. La actuación enzimática de las RIPs tanto de una como de dos cadenas provoca la hidrólisis del enlace N-glucosídico entre la adenina y la ribosa del nucleósido A-4324 del 28 S ácido ribonucleico de los ribosomas de mamífero. El resultado de esta acción enzimática es que el ribosoma apurínico resultante es inactivo en síntesis de proteínas (10).

La adenina liberada se encuentra localizada en un bucle del ARN ribosómico altamente conservado que se presenta en ribosomas de mamíferos, hongos, plantas y bacterias (6), y que participa en la interacción con el ribosoma del factor de elongación 2 que es responsable de la translocación en organismos superiores y del factor de elongación G responsable de la translocación en bacterias. Precisamente, mis primeros trabajos de investigación realizados con el Dr. Juan Modolell en el laboratorio del Dr. David Vázquez hace más de 20 años, demostraron que la energía liberada en la hidrólisis de GTP en esta interacción se utiliza en favorecer la liberación rápida del factor de elongación de la superficie ribosómica una vez concluida la etapa de elongación (11-13).

Los análisis estructurales realizados en los últimos años indican que varias RIPs poseen homología secuencial de amino ácidos con el enzima topoisomerasa II del ADN de *Drosophila* (14). El estudio posterior indicó que dichas RIPs presentan actividad topológica sobre el ADN, lo que provoca cambios en la estructura del ADN superenrollado pero no en el ADN lineal. Primero provoca la relajación de la forma superenrollada y después provoca cortes en las dos cadenas de ADN lo que conlleva la aparición de la forma lineal. Se ha sugerido que esta actividad enzimática de las RIPs podría ser la base, o al menos una de ellas, de los efectos anti-VIH-1 de las RIPs (15).

En los últimos años se ha podido comprobar que la actividad N-glicosidasa característica de las RIPs puede ejercerse también sobre el ADN y el ARN ribonucleico no ribosómico. Así Stirpe y cols. han

descrito que varias RIPS descubiertas en colaboración con nuestro laboratorio, en particular las saporinas presentes en *Saponaria officinalis* (16), pueden depurar polinucleótidos sintéticos, ácido ribonucleico genómico viral y ácido desoxirribonucleico de esperma de salmón (17).

Esto nos introduce en el apartado sobre los efectos antivirales de las RIPS. Las RIPS poseen propiedades antivirales tanto sobre virus vegetales como animales. Abrina, diantinas, PAP, ricina y saporinas ejercen efectos inhibidores claros sobre los virus TMV y PVX. De hecho una RIP clásica como la PAP se describió primero como proteína antiviral (pokeweed antiviral protein) (18). Las RIPS poseen efectos inhibidores también contra los virus animales por ejemplo, PAP, tricosantina, gelonina y diantinas inhiben a los virus del SIDA y del herpes simplex en experimentos con células aisladas (5,6).

Recientemente hemos descrito que la infección de hojas de remolacha (*Beta vulgaris*) con virus vegetales induce la expresión de dos RIPS monocatenarias relacionadas entre sí a las que hemos denominado beetinas 27 y 29 (19). Nosotros hemos conseguido el mismo efecto de inducción de ambas beetinas por los virus vegetales, en plantas control crecidas en el laboratorio bajo condiciones controladas, mediante la administración de mediadores químicos de la acción molecular del virus a nivel intracelular como son el ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno (19).

La elevación de la concentración intracelular de ambas sustancias promueve la denominada respuesta sistémica adquirida en la que cabe destacar la síntesis de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR proteins) muchas de ellas quitinasas y glucanasas que son activas frente a los hongos fitopatogénicos y determinadas proteínas de carácter antiviral entre ellas las beetinas. Resultados recientes (pendientes de publicación) indican que la inducción de las beetinas en plantas en condiciones controladas previene de la infección viral. Esto apoya la hipótesis de que el papel biológico de estas RIPS podría estar relacionado con la defensa de la planta frente a la agresión de determinados virus vegetales.

A pesar del enorme interés de estos efectos de las RIPS, no se conoce aún el mecanismo molecular mediante el cual las RIPS ejercen su

efecto antiviral. Se ha descrito un efecto inhibitor sobre los ribosomas de las células infectadas por virus lo que provocaría una especie de suicidio de las células infectadas, un efecto depurinante e inactivador directo sobre virus, un efecto inhibitor independiente de la actividad N-glicosidasa, una actividad topoisomerasa o como en el caso del virus del SIDA, una inhibición de la actividad integrasa del virus como ha sido demostrado recientemente por el grupo de la Prof. S. Lee-Huang (15).

En relación con el posible papel desempeñado por las RIPs en la defensa de las plantas frente a las infecciones fúngicas y víricas, quiero destacar que investigaciones recientes de nuestro grupo en colaboración con el de la Prof. Karen MacDonald de la Universidad de Davis, California, han permitido descubrir tres quitinasas monocatenarias de *T. kirilowii* con actividad RIP (20) y con homología secuencial con la tricosantina, una RIP que posee actividad antiviral in vivo contra el virus del SIDA (5,6). En el caso de estas tres proteínas podríamos estar ante unos agentes polivalentes de defensa antifúngica y antiviral.

Respecto al modo de acción celular de las RIPs, mientras que las RIPs de tipo 1 o de una cadena son muy poco tóxicas para las células cultivadas y para los animales de experimentación, ya que no pueden entrar en el citoplasma por si mismas, las RIPs de tipo 2 como ricina, abrina, volkensina, modecina y viscumina son extremadamente tóxicas para las células intactas debido a la presencia de la cadena B translocadora que es capaz de fijarse a receptores de membrana plasmática y promover la internalización del complejo toxina-receptor. Posteriormente la ricina es transportada al aparato de Golgi y de allí es transferida al retículo endoplásmico rugoso en donde se disocia permitiendo la entrada en el citosol de la cadena A, que como hemos comentado es la especie enzimáticamente activa y allí inactiva a los ribosomas (5,6).

Este tipo de transporte se conoce como transporte retrógrado porque va desde los endosomas hasta el retículo endoplásmico rugoso, vía esta contraria a la vía normal de secreción de proteínas, y por ello el nombre de transporte retrógrado.

Una de las familias más notables en lo que a RIPs se refiere es la Sambucaceae. En 1992 descubrimos en mi laboratorio un grupo de

RIPs de dos cadenas del tipo de la ricina que poseen la notable propiedad de tener una actividad tóxica sobre células humanas cultivadas así como sobre ratones de unas 1.000 a 10.000 veces menor que la ricina, abrina y las otras RIPs altamente tóxicas (6).

De la corteza de *Sambucus nigra* hemos aislado dos RIPs de tipo 2, nigrina b de estructura AB y masa relativa 58.000 (9) y nigrina b básica de estructura AB y masa relativa 64.000 (21). La corteza contiene además otra RIP muy poco activa denominada SNA I descubierta en 1984 por Brokaert y cols (6).

De las hojas hemos aislado también una RIP denominada nigrina l de estructura AB y masa relativa 63.000 (pendiente de publicación). Los frutos de *Sambucus nigra* contienen también una RIP equivalente a nigrina b denominada nigrina f (22) y lo que es muy notable, RIPs de tipo I monocatenarias que hemos denominado nigrinas de masa relativa 24.000 (23). Las nigrinas ácidas de *Sambucus* fijan polisacáridos con galactosa terminal lo que facilita su aislamiento por cromatografía de afinidad. Así la corteza de *Sambucus nigra* posee proteínas que se fijan a una matriz cromatográfica que contiene restos de galactosa, y por lo tanto pueden ser eluidas de la columna por la adición de galactosa. Estas proteínas pueden ser separadas por cromatografía de exclusión molecular lo que permite detectar la nigrina b. Fue el desarrollo de esta técnica lo que nos permitió descubrir esta notable proteína que había pasado desapercibida anteriormente (9). El análisis electroforético de estos tres picos proteicos nos permite apreciar que se trata de proteínas homogéneas de masas relativas 140, 58 y 30. SNA I y nigrina son RIPs, SNA II es una lectina monomérica (9).

Cuando investigamos la actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas de la nigrina b utilizando sistemas acelulares tales como los extractos de lisados de reticulocito de conejo, de hígado y de cerebro de rata, encontramos que la concentración de proteína que inhibe un 50 % es de 10 ng/ml, esto es de rango subnanomolar, y por lo tanto ligeramente más activa que la ricina en los mismos sistemas. En contraste nigrina b no afecta a los ribosomas de plantas tales como trigo, *Vicia sativa* y *Cucumis sativus* (9).

La sorpresa vino cuando estudiamos la síntesis de proteínas en células humanas cultivadas, pues mientras que la ricina inhibe a 1 ng/ml, la nigrina no hace absolutamente nada a esta concentración. Es más, mientras que la dosis letal 50 % in vivo de la ricina es de 2,6 microgramos/Kg, la de la nigrina es 12 mg/kg en ratones (9).

Respecto al mecanismo molecular de inhibición de la nigrina b es el mismo que el de la ricina, esto es la inactivación por depuración del ARN ribosómico que después de su tratamiento con anilina en medio ácido libera un fragmento de ARN que se denomina fragmento de Endo y que es diagnóstico de la acción de las RIPs (9).

El ARN ribosómico no es el único sustrato de las RIPs. Utilizando las nigrinas b y b básica hemos podido observar que ambas RIPs pueden atacar tanto a ribosomas de reticulocito de conejo, generando los fragmentos de Endo con anilina ácida, como al ARN genómico del virus del mosaico del tabaco, que al tratarse con anilina ácida se degrada totalmente, lo que es síntoma de una multidepuración extensa. Una de las nigrinas, la nigrina b básica, posee actividad topológica sobre el ADN promoviendo la transición del ADN superenrollado a las formas relajada y lineal (9,21).

Sambucus ebulus es una especie muy parecida a *Sambucus nigra* de la que hemos aislado también diversas RIPs tanto de hojas, de frutos como de rizomas. La proteína más estudiada ha sido la ebulina (8), un dímero AB de masa relativa 56.000 cuya estructura molecular ha sido determinada conjugando la secuencia del gen que la codifica con los estudios de difracción de rayos X, trabajo este que se está realizando en colaboración con el Prof. Jon Robertus de la Universidad de Texas en Austin (pendiente de publicación). Como podemos ver la estructura de la ebulina, aunque es distinta, se parece bastante a la de la ricina.

Para elucidar la causa de la falta de toxicidad de la nigrina en relación con la ricina, iniciamos unos estudios de toxicidad comparada en colaboración con el Prof. Fiorenzo Stirpe de la Universidad de Bolonia y pudimos determinar que prácticamente toda la nigrina b que se une a receptores de la membrana plasmática entra en la célula, es degradada y sus restos expelidos después al espacio extracelular. Únicamente a muy altas concentraciones, algunas moléculas presentes en los endosomas

translocan espontáneamente al citosol y pueden entonces inhibir la síntesis de proteínas (24).

Dado que, como también hemos demostrado recientemente la mayor parte de ricina captada por la célula es degradada como la nigrina, y que una pequeña fracción de ricina sufre transporte retrógrado responsable de la alta toxicidad como ya hemos comentado (24), proponemos la existencia de al menos dos tipos de receptores de membrana plasmática para la ricina. Uno sería el responsable del transporte mayoritario e improductivo, como le sucede a la nigrina b, mientras que el otro sería responsable de que una pequeña parte de ricina se internalice por la vía de transporte retrógrado al aparato de Golgi y posteriormente al retículo endoplásmico rugoso, y de allí al citosol en donde provocaría la inhibición de la síntesis de proteínas. La existencia de ambos tipos de receptores para la ricina está en estudio en mi laboratorio en la actualidad.

En la segunda parte de esta exposición quiero abordar la utilización de RIPS en la construcción de inmunotoxinas y conjugados de utilidad en la terapia experimental del cáncer.

Una inmunotoxina es una especie molecular producida artificialmente a partir de un anticuerpo y una toxina, en particular una proteína inactivadora de ribosomas. El anticuerpo está dirigido contra un antígeno presente en la superficie de la célula blanco y por ello las inmunotoxinas se convierten en los “proyectiles mágicos de Ehrlich”, al identificar y matar a dichas células blanco (5,6,25).

Las primeras inmunotoxinas construidas utilizaban como toxina la ricina entera, pero la elevada toxicidad inespecífica de esta poderosa toxina desaconsejó su uso en terapia. El establecimiento de las inmunotoxinas como herramientas terapéuticas vino con las denominadas inmunotoxinas de primera generación, consistentes en la cadena A de la ricina procedente de la disociación de ricina en medio reductor unida por puentes disulfuro a un anticuerpo monoclonal dirigido a la célula blanco. Sin embargo, la presencia de pequeñísimas cantidades de cadena B contaminante permitía la reconstitución de la molécula de ricina y confería a las preparaciones de inmunotoxina una toxicidad inespecífica intolerable para una terapia eficaz y segura (5,6).

Una solución vino con la utilización de RIPs monocatenarias, por ejemplo del tipo de las saporinas y con la generación de cadena A de ricina por ingeniería genética. Sin embargo las inmunotoxinas formadas con RIPs de tipo 1 son inestables y a menudo resultan muy tóxicas, como en el caso de las inmunotoxinas construidas con saporina.

Las patologías que pueden tratarse con inmunotoxinas son todas aquellas basadas en la existencia de células enfermas que presenten moléculas distintivas específicas en su superficie celular y que estén ausentes o a menor concentración en la superficie celular de las células sanas. En la bibliografía actual se describen tratamientos con inmunotoxinas construidas con RIPs de tipo 1 como saporina contra la enfermedad de Hodgking, momordina contra el mieloma múltiple y PAP contra el SIDA. Sin embargo la RIP más utilizada ha sido y es la cadena A de la ricina contra el SIDA, los cánceres de colon y de mama, en la enfermedad de rechazo del injerto frente al huésped, en la leucemia linfoblástica y en la vitreorretinopatía proliferante, por citar algunos ejemplos notables (5).

En el caso del SIDA, las inmunotoxinas formadas con RIP de tipo 1 y anticuerpos monoclonales anti-gp120 o anti-gp41 se añaden al posible valor terapéutico que poseen las RIPs aisladas. Ello abre unas perspectivas excelentes para la terapia experimental del SIDA habida cuenta del fracaso que se ha empezado a apreciar en las terapias con agentes antiretrovirales. Se sabe ya que la aparición de resistencia in vivo contra uno de los inhibidores de la proteasa provoca resistencia cruzada a otros fármacos inhibidores también de la proteasa. Además, datos recientes indican que la supresión de la terapia permite la reaparición del virus procedente de santuarios celulares que no bien conocidos en la actualidad. En estos casos, quizás una terapia con inmunotoxinas dirigidas a estas células podría eliminar definitivamente el reservorio y por tanto la infección latente.

Las inmunotoxinas de segunda generación utilizan ricina intacta. Se trata con este enfoque de eliminar por vía química la toxicidad inespecífica de la ricina debida a la presencia de los sitios de unión a receptores potenciales de traslocación, que como recordaremos son los responsables del transporte anterógrado causante de la translocación en el

retículo endoplasmático de la cadena A y por lo tanto responsables de la extraordinaria toxicidad de la ricina (26).

Para ello se procede a fijar una cadena de polisacárido activada químicamente a la ricina. La reacción covalente de este polisacárido con los sitios de fijación de azúcar de la ricina produce una especie de ricina que se denomina ricina bloqueada que presenta mucho menos toxicidad inespecífica que la ricina nativa. Sin embargo este tratamiento conlleva una notable pérdida de actividad enzimática de la ricina concomitante con la manipulación química de la toxina y de los procesos de purificación ulteriores. A pesar de ello, una de estas inmunotoxinas con ricina bloqueada se encuentra ya en el mercado con el nombre de oncolisina y ha demostrado una notable efectividad en ciertos tipos de linfoma.

La mayor parte de las inmunotoxinas utilizadas hasta el momento han sido construidas contra las células enfermas y en el caso del cáncer contra las células tumorales. El interior de un tumor de cierto tamaño posee presión positiva respecto al entorno lo que dificulta notablemente la accesibilidad de las células tumorales a los agentes anticancerosos. Ello obliga a utilizar concentraciones elevadas de fármaco para alcanzar concentraciones intratumorales de fármaco efectivas.

Por todo ello, en los últimos años se ha desarrollado un concepto de lucha antitumoral experimental distinto, basado en el bloqueo de la vasculatura tumoral con agentes antiangiogénicos. La estrategia se basa en que cuando un tumor "in situ" crece a partir de cierto tamaño se produce un desarrollo de capilares para nutrir a la masa tumoral. Las propias células tumorales promueven el desarrollo de la red capilar a través de la estimulación del desarrollo de vasos capilares conocido como angiogénesis y del bloqueo de los inhibidores endógenos de angiogénesis. El resultado es que al aumentar la masa tumoral se desarrolla una red capilar denominada neovasculatura tumoral que nutre al tumor de manera independiente de la red vascular del tejido sano (27).

Pues bien la terapia antiangiogénica tiene como objetivo impedir que se desarrolle la neovasculatura tumoral para, de esta manera, eliminar el suministro de los nutrientes y el oxígeno que llegan al tumor a través de la neovasculatura tumoral y eliminar la masa tumoral sin

necesidad de atacar directamente a las células tumorales. Se ha determinado que la muerte de una célula endotelial de la neovasculatura induce la muerte de entre 100 y 250 células cancerosas.

Un nuevo enfoque que puede resultar complementario con la terapia antiangiogénica que hemos descrito consiste no en impedir que crezca la red capilar del tumor lo cual es un proceso lento, sino en destruir rápidamente la red ya formada en los tumores establecidos. Ello puede conseguirse con inmunotoxinas dirigidas específicamente contra la neovasculatura tumoral que destruyan dicha red vascular.

Nosotros hemos abordado este nuevo enfoque con las que denominamos inmunotoxinas de tercera generación. Estas inmunotoxinas están constituidas por nigrina o ebulina y un anticuerpo monoclonal dirigido contra una proteína específica de la superficie celular de las células endoteliales de la neovasculatura tumoral o que esté presente en mayor concentración que en la vasculatura normal. Una molécula de estas características es la endoglina o CD105, proteína cuyas características moleculares y funcionales han sido estudiadas entre otros por el Dr. Carmelo Bernabéu, amigo y bioquímico que nos ayuda seleccionando y suministrándonos los anticuerpos monoclonales anti-endoglina para la construcción de estas inmunotoxinas. La endoglina se encuentra presente en la mayor parte de los tumores estudiados por técnicas morfológicas y aunque se encuentra presente en algún tejido, lo está a menor concentración (28).

Como la nigrina o la ebulina se une solo a los receptores responsables del reciclado y degradación concomitante al paso por los compartimentos lisosómicos, y no tiene el sitio para los receptores de translocación, no presenta la toxicidad inespecífica que presenta la ricina. La nigrina libre simplemente se degrada y no se internaliza en la célula vía transporte retrógrado como la ricina.

Las inmunotoxinas de nigrina son por lo tanto superiores a las construidas con ricina bloqueada porque, en primer lugar, la nigrina no se manipula químicamente y por ello no pierde ni actividad ni estabilidad y en segundo lugar al ser mucho menos tóxica que la ricina, la obtención y purificación de nigrina y su conjugación con los anticuerpos

monoclonales para la fabricación de las inmunotoxinas es mucho menos peligrosa que operando con la ricina.

Para investigar la citotoxicidad de una inmunotoxina construida con ebulina y un anticuerpo monoclonal anti-endoglina, el anticuerpo 44G4, hemos utilizado como células blanco mioblastos de rata transfectados con el gen de la endoglina humana en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabeu. Estas células expresan endoglina humana y por lo tanto pueden ser sensibles a nuestra inmunotoxina anti-endoglina.

Al estudiar la viabilidad celular frente a concentración de proteína, pudimos determinar que las células parentales que no expresan endoglina presentan la misma sensibilidad a la ebulina que a la inmunotoxina de ebulina. Por el contrario las células transfectadas con el gen de la endoglina humana son más sensibles a la inmunotoxina que a la ebulina. La ventana entre toxina e inmunotoxina es de más de dos órdenes de magnitud, pero como la muerte de una célula endotelial de la neovascularización tumoral acarrea la muerte de entre 100 y 250 células tumorales, la ventana real puede ser de entre 10.000 y 25.000 (29).

En cuanto al mecanismo de internalización de la inmunotoxina, aunque no está bien aclarado, creemos que la unión de la inmunotoxina a la endoglina provoca la internalización de todo el complejo y una vez en el citoplasma, el complejo podría seguir la vía de transporte retrógrado desde el endosoma hasta el retículo endoplásmico rugoso en donde se liberaría la cadena A de la ebulina al citosol e inhibiría la síntesis de proteínas al inactivar los ribosomas. Este mecanismo comportaría la detección de endoglina en vesículas de Golgi y en el retículo endoplásmico rugoso.

Alternativamente, el complejo endoglina-inmunotoxina podría simplemente provocar en el endosoma la translocación de la cadena A de la ebulina al citosol, y alcanzándose los ribosomas se bloquearía con ello la síntesis de proteínas. Ambas posibilidades abren una apasionante vía de investigación para elucidar las etapas participantes en el tráfico intracelular de esta inmunotoxina.

Las inmunotoxinas descritas hasta aquí están compuestas por una RIP y un anticuerpo monoclonal frente a una molécula presente de manera específica sólo o en mayor concentración en las células tumorales.

Este anticuerpo se puede sustituir por moléculas transportadoras diferentes permitiendo la construcción de conjugados también de gran utilidad para la terapia experimental.

Investigaciones recientes han demostrado que la metástasis del cáncer de colon cursa con la aparición de determinadas sialoproteínas en la superficie de las células malignas. Estas sialoproteínas contienen ácido siálico terminal ligado con enlace $\alpha 2,6$ a Galactosa o NAc-Galactosamina. La RIP SNA I de corteza de *Sambucus nigra* a través de su cadena B, liga también ácido siálico mediante enlace $\alpha 2,6$ a Galactosa o Nac-Galactosamina. Nosotros hemos aprovechado esta capacidad de SNA I para diseñar un conjugado con gran toxicidad específica para las células de cáncer de colon aisladas, que como hemos dicho presentan ácido siálico con enlace $\alpha 2,6$ (30).

Este conjugado está constituido por nigrina o una RIP similar y la cadena B de la RIP SNA I unidas ambas proteínas por puentes disulfuro artificiales introducidos en ellas. La cadena B se manipula químicamente para impedir que se reasocie con las cadenas A de SNA I y en este proceso se pierde la capacidad de ligar galactosa pero se mantiene la de ligar ácido siálico.

Al estudiar la viabilidad celular de células Colo 320 procedentes de carcinoma de colon humano frente a la concentración de proteína, pudimos determinar que el conjugado es más tóxico que la RIP sola, con una ventana de entre 1,5 y 2 órdenes de magnitud como mínimo y con un mecanismo molecular de acción que suponemos muy similar al de la inmunotoxina antiangiogénica (31).

La Ciencia no está reñida con la belleza. Nosotros nos consideramos muy afortunados por haber podido traducir sólo en una minúscula parte la indudable belleza del saúco en términos moleculares. El descubrimiento de las RIPs del saúco nos ha permitido no sólo estudiar sus propiedades moleculares sino también utilizar estas proteínas, ebulina, nigrinas b y b básica y SNA I para la construcción de fármacos activos y muy específicos in vitro contra la vasculatura tumoral y las propias células cancerosas en el caso del cáncer de colon. La acción de ambos fármacos experimentales podría destruir tanto los tumores existentes, como las células malignas circulantes o los tumores avasculares y así

prevenir la metástasis. Los experimentos *in vivo* con animales dirán si estos conjugados e inmunotoxinas se comportan como se espera según los resultados *in vitro* y por lo tanto si son útiles o no.

Hasta ahora he mostrado la cara amable de las RIPs y de las inmunotoxinas y no quiero concluir esta exposición sin comentar algunos de los problemas clínicos que plantea el uso *in vivo* de inmunotoxinas y conjugados con RIPs.

Uno de los principales problemas en el tratamiento de tumores sólidos con inmunotoxinas y otros agentes químicos es que dichos agentes antitumorales entran con gran dificultad en el interior del tumor. Las células tumorales no están en contacto directo con la sangre, los agentes químicos tienen que penetrar en el interior del tumor. La presión en el interior del tumor es mayor que en el exterior y por lo tanto los fármacos solamente pueden entrar por difusión, para ello en muchos casos se deben utilizar concentraciones elevadas que son a menudo tóxicas para el paciente (32). Por ello teóricamente la terapia antiangiogénica parece ser superior a la terapia directa contra las células cancerosas.

Otro grave problema es la neutralización inmunológica de las inmunotoxinas. Las RIPs, como proteínas que son, desarrollan resistencia inmunológica al ser inyectadas en el organismo, por lo que la eficacia de una inmunotoxina viene dada no solo por su actividad específica sino también por la aparición de anticuerpos neutralizantes en el organismo receptor. En ensayos clínicos se ha puesto de manifiesto el problema de la aparición efectiva de anticuerpos neutralizantes tanto frente a la parte tóxica de la inmunotoxina como frente al anticuerpo monoclonal de ratón (33). Esto ha sido contrarrestado parcialmente administrando simultáneamente drogas citostáticas inmuno-depresoras (34). Una buena solución es la de disponer de una gran variedad de RIPs inmunológicamente distintas y que puedan conjugarse a distintos anticuerpos dirigidos frente al mismo blanco para aumentar así el arsenal de inmunotoxinas. Para reducir la respuesta contra el anticuerpo de ratón, la solución es humanizar el anticuerpo monoclonal de ratón por ingeniería genética.

Por último un serio problema que se ha observado en la terapia con inmunotoxinas es el denominado síndrome de pérdida o

derrame vascular (vascular leak syndrome). Este problema surge con la administración de inmunotoxinas de ricina fundamentalmente y consiste en la destrucción de capilares de manera aparentemente inespecífica, lo cual conlleva extravasación de sangre y formación de edema.

Recientemente, Siegall y cols. (35) han encontrado que la dexametasona previene dicho síndrome. Además la desoxiespergualina muestra una poderosa actividad inhibidora de este síndrome y suma además un efecto reductor de la respuesta inmunológica contra los anticuerpos de ratón, por lo que es concebible una notable mejora en los resultados de la terapia anticancerosa al reducir los efectos secundarios que son siempre limitantes (35).

El futuro de las RIPs y de las inmunotoxinas en la terapia experimental del cáncer es muy halagüeño habida cuenta de su efectividad y especificidad en los modelos experimentales, pero siempre que se resuelvan los problemas que ya hemos apuntado, como son fundamentalmente su carácter antigénico y el síndrome de derrame vascular que muchas de ellas presentan. Como también hemos apuntado hay soluciones factibles para ambos problemas. El hecho de que ya se haya constituido una compañía en EEUU con la finalidad de producir: inmunotoxinas, inmunoconjugados, fragmentos de anticuerpos monoclonales e inmunoenzimas, avala esta esperanza de futuro.

No quiero concluir esta exposición sin mostrar mi agradecimiento a mis colaboradores de los diez últimos años, algunos ya Profesores Titulares, otros postdoctorales y otros en fase de formación en mi laboratorio. A todos gracias. Tampoco puedo dejar de citar a investigadores como Stirpe, MacDonald, Lord, Méndez, Robertus, Shibuya, con los que hemos realizado investigaciones esenciales en los resultados que he presentado en esta exposición. A todos muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental presentado en este trabajo que ha sido realizado en mi laboratorio ha sido financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT GG85-0113), Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT BIO88-0705, CICYT

BIO92-0231, CICYT infra-BIO93-186, CICYT PTR94-0062, CICYT BIO95-0610, CICYT BIO98-0727), Consejería de Sanidad y Bienestar Social (convenios en los años 95 a 99), Iberduero y Fondos FEDER (1FD97-0110). Expreso mi agradecimiento a mis colaboradores españoles y extranjeros y a todas las instituciones que de alguna manera han posibilitado mi trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CROMPTON, R. AND GALL, D. (1980) *Medico-legal J.* 48: 41-62.
- (2) STILLMARK, H. (1889) *Arb.pharmak.Inst.Dorpat* 3:59-151.
- (3) OLSNES, S., FERNANDEZ-PUENTES, C., CARRASCO, L. AND VÁZQUEZ, D. (1975) *Eur.J.Biochem.* 60: 281-288.
- (4) JIMÉNEZ, A. AND VÁZQUEZ, D. (1985) *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 649-672.
- (5) BARBIERI, L., BATTELLI, M.G. AND STIRPE, F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 237-282.
- (6) GIRBÉS T. Y FERRERAS, J.M. (1998) *Recent Res. Devel. in Agricultural and Biol. Chem.* 2: 1-16.
- (7) CITORES, L., FERRERAS, J.M., IGLESIAS, R., CARBAJALES, M.L., ARIAS, F.J., JIMÉNEZ, P., ROJO, M.A., GIRBÉS, T. (1993) *FEBS Lett.* 329: 59-62.
- (8) GIRBÉS, T., CITORES, L., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., MUÑOZ, R., ROJO, M.A., ARIAS, F.J., GARCÍA, J.R., MÉNDEZ, E. AND CALONGE, M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 18195-18199.
- (9) GIRBÉS, T., CITORES, L., FERRERAS, J.M., ROJO, M.A., IGLESIAS, I., MUÑOZ, R., ARIAS, F.J., CALONGE, M., GARCÍA, J.R. AND MÉNDEZ, E. (1993) *Plant Mol. Biol.* 22: 1181-1186.
- (10) ENDO, Y. AND TSURUGI, K. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 8128-8130.
- (11) GIRBES, T., VÁZQUEZ, D. AND MODOLELL, J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67: 257-265
- (12) GIRBES, T., VÁZQUEZ, D. AND MODOLELL, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 473-481
- (13) GIRBES, T., CAMPUZANO, S., VÁZQUEZ, D. AND MODOLELL, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 483-490
- (14) LEE-HUANG S., KUNG, H.F., HUANG, P.L., HUANG, P.L., LI, B.Q., HUANG, P., HUANG, H.I. AND CHEN, H.C. (1991) *FEBS Lett.* 291: 139-144.
- (15) LEE-HUANG, S., KUNG, H. F., HUANG, P. L., BOURINBAIAR, A. S., HUANG, P. L., TSAI, W. P., CHEN, A. Y. AND HUANG, H. I. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12208-12212.

- (16) FERRERAS, J.M., BARBIERI, L., GIRBÉS, T., BATTELLI, M.G., ROJO, M.A., ARIAS, F.J., ROCHER, A., SORIANO, F., MÉNDEZ, E. AND STIRPE, F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1216: 31-42.
- (17) BARBIERI, L., GORINI, P., VALBONESI, P., CASTIGLIONI, P. AND STIRPE, F. (1994) *Nature* 372: 624.
- (18) IRVIN, J.D. (1983) *Pharmac. Ther.* 21: 371-387.
- (19) GIRBÉS, T., DE TORRE, C., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M. AND MÉNDEZ, E. (1996) *Nature* 379: 777-778.
- (20) SHIH, N. R., MCDONALD, K. A., JACKMAN, A. P., GIRBÉS, T. AND IGLESIAS, R. (1997) *Plant Sci.* 130: 145-150
- (21) DE BENITO, F.M., CITORES, L., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., CAMAFEITA, E., MÉNDEZ, E. AND GIRBÉS, T. (1997) *FEBS Lett.* 413: 85-91.
- (22) CITORES, L., DE BENITO, F.M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., JIMÉNEZ, P., ARGÜESO, P., FARIAS, G., MÉNDEZ, E. AND GIRBÉS, T. (1996) *J. Exp. Bot.* 47: 1577-1585.
- (23) DE BENITO, F.M., IGLESIAS, R., FERRERAS, J.M., CITORES, L., CAMAFEITA, E., MÉNDEZ, E. AND GIRBÉS, T. (1998) *FEBS Lett.* 428: 75-79.
- (24) BATTELLI, M.G., CITORES, L., BUONAMICI, P., FERRERAS, J.M., DE BENITO, F.M., STIRPE, F. & GIRBÉS, T. (1997) *Arch. Toxicol.* 71: 360-364.
- (25) EHRLICH, P. (1956) in "Collected Papers of Paul Ehrlich" (Himmelweit, F. eds.) Vol. 2, pp. 442-447, Pergamon Press, London.
- (26) GROSSBARD, M.L., LAMBERT, J.M., GOLDMACHER, V.S., BLÄTTLER, W.A. AND NADLER, L.M. (1992) *Cancer Res.* 52: 4200-4207.
- (27) FOLKMAN, J. (1996) *Investigación y Ciencia* 242: 101-104.
- (28) RAAB, U., LASTRES, P., AREVALO, M.A., LOPEZ-NOVOA, J.M., CABAÑAS, C., de la ROSA, E.J. AND BERNABEU, C. (1999) *FEBS Letters* 459: 249-254.
- (29) GIRBES, T., FERRERAS, J.M., IGLESIAS, R., CITORES, L., ARIAS, J., ROJO, A., MUÑOZ, R., JIMENEZ, P. y MARTINEZ, F. (1994) patente internacional PCT/ES94/00020.
- (30) SARA, T., ROTH, J., ZUBER, C., STAMM, B. AND HEITZ, P. (1991) *Am.J.Pathol.* 139: 1435-1448.
- (31) GIRBES, T., ROJO, A., BENITEZ, J. Y MUÑOZ, R. (1999) patente inglesa 9916890.8
- (32) JAIN R. K. (1994) *Sci Am.* 271: 58-65. (82)
- (33) FRANKEL, A., TAGGE, E. AND WILLINGHAM, M. (1995) *Seminars in Cancer Biology* 6: 307-317.

- (34) WEINER, L.M.; O'DWYER, J.; KITSON, J.; COMIS, R.L.; FRANKEL, A.E.; BAUER, R.J.; KONRAD, M.S. AND GROVES, E.S. (1989) *Cancer Res.* 49: 4062-4067.
- (35) SIEGALL, C., LIGGIT, D., CHACE, D., TEPPER, M., AND PERRY, H. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91: 9514-9518.