



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA
PROTEÍNA FUSIÓN EXPRESADA EN
PLANTAS: UN ENFOQUE DE
INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER
DIRIGIDA A CTLA-4**

OPCIÓN DE TITULACIÓN:
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:
M.C. ALEJANDRA WONG ARCE

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Sergio Rosales Mendoza

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JULIO 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA
PROTEÍNA FUSIÓN EXPRESADA EN
PLANTAS: UN ENFOQUE DE
INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER
DIRIGIDA A CTLA-4**

OPCIÓN DE TITULACIÓN:
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:
M.C. ALEJANDRA WONG ARCE

DIRECTOR DE TESIS:
DR. SERGIO ROSALES MENDOZA

SINODALES:

DR. Sergio Rosales Mendoza _____

DRA. Diana Patricia Portales Pérez _____

DRA. María del Carmen González Castillo _____

Dr. Roberto González Amaro _____

Dra. Leticia Moreno Fierros _____

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con número de registro 000590, en el Nivel de Doctorado (Consolidado).

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 587795



Desarrollo y evaluación de una proteína fusión expresada en plantas: un enfoque de inmunoterapia contra el cáncer dirigida a CTLA-4 por Alejandra Wong Arce se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias en Bioprocesos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente._**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Doctorado MC. Alejandra Wong Arce, titulada “DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA PROTEÍNA FUSIÓN EXPRESADA EN PLANTAS: UN ENFOQUE DE INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DIRIGIDA A CTLA-4”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar tentativamente el próximo día 21 de Julio a las 12:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.



ATENTAMENTE

Comité Tutorial

Director: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Tutor: Dra. Ma. Del Carmen González
Castillo

Tutor: Dr. Roberto González Amaro

Tutor: Dra. Diana Patricia Portales



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372
www.uaslp.mx

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y en la Sección de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la misma Universidad. Así mismo, parte del proyecto se trabajó en colaboración con el Departamento de Farmacognosia y Botánica Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Chulalongkorn (Bangkok, Tailandia).

Con financiamiento de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de doctorado con el número de registro 587795 y número de CVU 706228, y el financiamiento otorgado a través del proyecto CONACYT CB-2015-256063.

Otros apoyos:

Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) a través del apoyo otorgado al proyecto C20-FAI-10-53.53.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco principalmente al Dr. Sergio Rosales Mendoza quien ha desarrollado un papel fundamental en mi formación profesional. Gracias por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por compartirme su conocimiento y por impulsarme a desarrollar las habilidades necesarias para incursionar en el campo de la docencia e investigación. Gracias por inspirarme y por brindarme su confianza y amistad.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dra. Diana, Dra. Carmen, Dr. Roberto y Dra. Leticia por su asesoría y apoyo durante la realización y evaluación de las distintas etapas del proyecto.

A mis amigas, las “Andreas”, gracias por su apoyo diario, gracias por hacer el trabajo más ligero, más ameno y feliz, disfrute cada día compartido con ustedes en el laboratorio.

Finalmente le agradezco a todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes y de la Sección de Biotecnología, por su constante apoyo y sus consejos en el desarrollo de cada experimento, por generar ese ambiente de cordialidad que me permitió disfrutar todos los días de trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Principalmente le doy gracias a Dios por mi vida, por permitirme seguir avanzando en este camino de retos y alcanzar otra meta profesional acompañada de todas las personas que me quieren y que me han apoyado durante esta etapa.

A mis papás Alejandra y Salvador por ser los pilares de mi vida, por creer en mí y por siempre mostrarse orgullosos de sus hijos, por apoyarme en cada reto que he emprendido y por nunca dejarme caer, por ser la fuerza que me impulsa a seguir y por hacer de mí la persona que soy.

A mis hermanos Fernanda y Salvador por ser mi inspiración, por darme ánimos para ser mejor cada día, por siempre estar a mi lado.

A mis cuñados, suegros, sobrinos, tíos y primos, por siempre echarme porras y brindarme su apoyo incondicional, y en especial a mis ángeles en el cielo, Javier y abuelos, por ser luz en mi vida y porque sé que desde allá me cuidan y me guían.

A mis amigos y amigas que siempre me procuran y me brindan su apoyo. Gracias por las palabras de aliento que me inspiran a seguir cumpliendo sueños en mi vida. Gracias por compartir conmigo todo lo que han aprendido de las distintas áreas a las que cada uno se ha dirigido, y principalmente, por todos los momentos que hemos vivido juntos.

Finalmente, gracias a mis motores de vida, mi hija María Emilia y mi esposo Diego. Gracias hija por motivarme todos los días a ser mejor en cada aspecto de mi vida y gracias por el tiempo que me has dado para cumplir esta meta. Gracias Diego por ser mi compañero de vida y mi mano derecha, gracias por no dudar en enfrentar conmigo cualquier reto, por escucharme e impulsarme a seguir. Gracias por su amor, admiración y por creer en mí, gracias por ser mi todo.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	9
2. ABSTRACT	10
3. RESUMEN EN EXTENSO.....	11
3.1. INTRODUCCIÓN	11
3.1.1. Bases de la inmunoterapia contra el cáncer	12
3.1.2. CTLA-4 como blanco terapéutico	13
3.1.3. Vacunas de ADN contra CTLA-4	19
3.1.4. Plantas como biofábricas de vacunas	21
3.2. JUSTIFICACIÓN	24
3.3. HIPÓTESIS	25
3.4. OBJETIVO GENERAL	25
3.4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.5. METODOLOGÍA	26
3.5.1. Diseño de las proteínas quiméricas y construcción del vector de expresión ..	26
3.5.2. Expresión y purificación de las proteínas quiméricas	26
3.5.3. Análisis de SDS-PAGE y Western blot	27
3.5.4. ELISA CTLA-4 y ELISA-GM1	28
3.5.5. Evaluación del potencial inmunogénico	28
3.5.6. Citometría de flujo	29
3.6. RESULTADOS	30
3.7. DISCUSIÓN	32
3.8. CONCLUSIÓN	34
3.9. PERSPECTIVAS	34
3.10. REFERENCIAS	34
PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN	42
Artículo publicado: Expression and immunogenicity assessment of a plant-made immunogen targeting the cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4: a possible approach for cancer immunotherapy	42
ANEXOS	43
Artículos en redacción	43
- Overview of cancer vaccine development targeting CTLA-4 and PD-1.....	43
Otros artículos publicados	43
- Expression in algae of chimeric protein carrying several epitopes from tumor associated antigens	43

1. RESUMEN

Las inmunoterapias contra el cáncer son una estrategia promisorio para combatir este problema de salud global. Actualmente, una terapia novedosa para el tratamiento de tumores malignos se basa en anticuerpos monoclonales que bloquean moléculas que actúan como puntos de control (checkpoint) de la respuesta inmune, tales como el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1). Una posible innovación en esta área es la inducción de respuestas humorales contra CTLA-4 o PD-1 a fin de favorecer la activación de la respuesta inmune celular contra las células tumorales. El objetivo de este estudio implicó la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* de una proteína quimérica basada en la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* como acarreador y el dominio extracelular de CTLA-4 (LTB-CTLA4). Se obtuvieron rendimientos de proteína recombinante de 1.29 µg/g de peso fresco de hojas a los 4 días post-infiltración. La integridad de la proteína quimérica LTB-CTLA4 producida en plantas se confirmó por Western blot y ELISA. La inmunogenicidad del antígeno expresado en plantas se evaluó en ratones BALB/c, generándose evidencia de la inducción de respuestas humorales contra LTB y CTLA-4. El inmunógeno expresado en plantas LTB-CTLA-4 constituye un candidato promisorio para futuros estudios de protección contra cáncer en modelos murinos.

Palabras clave: CTLA-4, LTB, proteína recombinante, vacuna expresada en plantas, inmunoterapia contra cáncer

2. ABSTRACT

Cancer immunotherapy is a promising intervention to fight against this global health problem. In particular targeting immune checkpoints, such as cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and programmed-death protein 1 (PD-1), by specific monoclonal antibodies is a current treatment for many malignances. A possible innovation in this field is based on the induction of humoral responses in the host by suppressing the effects of such immune checkpoints and as consequence favoring the activation of cellular immunity against the tumor cells. In this study, chimeric protein comprising the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as carrier and the extracellular domain of CTLA-4 (LTB-CTLA4) was produced in *Nicotiana benthamiana* by transient expression. The recombinant protein was accumulated up to 1.29 µg/g of leaves fresh weight on 4 day-post-infiltration. The integrity of the plant-made LTB-CTLA4 antigen was confirmed by western blot analysis and ELISA. Immunogenicity of the plant-made LTB-CTLA4 was assessed in BALB/c mice and the results showed that humoral responses were induced against both the LTB and CTLA-4 moieties. The plant-made LTB-CTLA4 stands as a promising candidate for the design of advanced protection studies against cancer in murine models.

Keywords: CTLA-4, LTB, recombinant protein, plant-made vaccine, cancer immunotherapy

3. RESUMEN EN EXTENSO

3.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, también conocido como neoplasia maligna, es un término utilizado para nombrar a un grupo de enfermedades caracterizadas por la presencia de células anormales que se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos debido a que se propagan a través de la sangre y tejidos linfáticos, dando origen a un fenómeno de invasión tisular conocido como metástasis [1]. El cáncer presenta las siguientes características: auto-capacidad de crecimiento, insensibilidad a las señales extracelulares de control de crecimiento, evasión apoptótica, potencial replicativo ilimitado, capacidad angiogénica y capacidad de metástasis. Existen distintas clasificaciones para el cáncer, sin embargo, de acuerdo con el origen celular se ha generado la siguiente clasificación: i) carcinoma, que se origina en las células epiteliales, iniciando en la piel o en tejidos que revisten o cubren órganos internos; ii) sarcoma, que se origina en las células de tipo conectivo como músculo, cartílago, hueso o tejido adiposo; iii) linfoma, que se origina en el tejido linfático; iv) leucemia, que se origina en distintos tipos de células circulantes debido a una alteración hematopoyética [2].

Según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de la base de datos de GLOBOCAN en 2020, se estima que la carga mundial de cáncer aumentó a 19.2 millones de casos nuevos y 9.96 millones de muertes. El riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer antes de los 75 años es del 22.6% para hombres y 18.6% para mujeres [3]. En México, el 9% de las defunciones registradas entre enero y agosto del 2020 fueron a causa de tumores malignos, y la distribución porcentual por sexo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en hombres (49%) por esta causa. En la población más joven, menores de 29 años, la leucemia es la principal causa de muerte por tumor maligno, mientras que en la población mayor, de 30 a 59 años, los

fallecimientos son a causa de tumores de colon, estómago y pulmón para los hombres, y en mujeres son los tumores de mama, cuello del útero y ovario [4].

3.1.1. Bases de la inmunoterapia contra el cáncer

Tanto la respuesta inmune humoral como celular proveen de mecanismos efectores que pueden ejercer efectos anti-tumorales. Uno de los mecanismos más importantes consiste en la inducción de respuestas de células natural killer (NK) y células CD8⁺, los cuales son activados tras la presentación del antígeno previamente asociado al complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), lo que lleva a la inducción de citotoxicidad y apoptosis [5]. Existen tres etapas distintas que deben alcanzarse, ya sea espontáneamente o terapéuticamente, para desencadenar una respuesta inmune antitumoral efectiva. En primera instancia, las células dendríticas (CDs) deben reconocer a los antígenos asociados a tumores (AATs) de origen endógeno o bien aquellos que forman parte de una vacuna. Estos antígenos pueden comprender proteínas con alteraciones derivadas de mutaciones características de distintos tipos de cáncer; o bien aquellas que se expresan preferentemente en las células cancerosas (por ejemplo, antígenos de cáncer de testículo); o proteínas de diferenciación asociadas con el tejido de origen del cáncer, contra los cuales no se ha establecido por completo el mecanismo de tolerancia tímica o periférica (por ejemplo, proteínas asociadas a melanoma). Consecutivamente, cuando las CDs entran en contacto con el antígeno, reciben una señal de activación adecuada (etapa de “maduración”) que les permite promover la inmunidad a través del procesamiento y presentación de los péptidos derivados de antígenos tumorales, y finalmente, dentro de los órganos linfoides, las CDs asociadas a antígenos tumorales deberán generar respuestas protectoras de células T. Aunque existen diversas respuestas que pueden ser inducidas a través de las células T, la expansión de clones de células T efectoras CD8⁺ es crucial. Por otro lado, las CDs también desencadenan la inducción de respuestas humorales y la activación de células NK que en conjunto constituyen otro brazo de la inmunidad antitumoral efectora [6]. Finalmente, las células T específicas deben entrar en el ambiente tumoral y ejercer sus mecanismos efectores; en este punto, superar los

mecanismos inmunosupresores de las células malignas representa un reto. Los tumores pueden (presumiblemente, al sesgar la maduración de CDs) desencadenar la respuesta inmune “incorrecta” o permitir la expansión de células T reguladoras (T_{reg}), lo que suprime la actividad de las células T efectoras [7]. Los tumores pueden regular negativamente la expresión de antígenos tumorales diana y también producir una variedad de moléculas de superficie (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2) que interactúan con los receptores de células T activadas (por ejemplo, PD-1), causando anergia en las células T [8]. La expresión de esos ligandos supresores puede estar asociado con mutaciones oncogénicas. Además, los tumores pueden liberar moléculas inmunosupresoras, como indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que consume triptófano y limita la función de las células T [9]. La hipoxia también puede conducir a la liberación de CCL28, que atrae la inmigración de células T_{reg} [10]. Finalmente, las células del estroma tumoral también pueden suprimir la función de linfocitos efectoras mediante el bloqueo de la proliferación y la función efectora; también suprimen la adhesión de las células T al endotelio tumoral. Por tanto, los enfoques terapéuticos deben superar barreras importantes: 1) los AATs son idénticos o están estrechamente relacionados a los antígenos de células sanas, lo que hace dificulta la diferenciación entre respuestas terapéuticas patológicas o respuestas autoinmunes; 2) la tolerancia central y periférica conspiran por agotar o inactivar el repertorio de células T; 3) el microambiente tumoral es intrínsecamente inmunosupresor [6].

Sin embargo, en este escenario el desarrollo de inmunoterapias ha dado lugar a casos de éxito, tales como la terapia basada en células dendríticas contra el cáncer de próstata metastásico (Provenge) aprobada por la FDA, así como las terapias basadas en anticuerpos monoclonales contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) o la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) [11-13].

3.1.2. CTLA-4 como blanco terapéutico

Un campo de investigación promisorio es la posibilidad de interferir a nivel celular con los fenómenos de evasión inmune del tumor. El enfoque más exitoso ha sido la

inhibición de células inmunosupresoras a través del bloqueo de moléculas reguladoras negativas, las cuales comprenden una familia de proteínas que contribuyen a la regulación de la respuesta mediada por células T. Entre estas moléculas, el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es la más estudiada, y las estrategias terapéuticas dirigidas a su inhibición se encuentran en etapas avanzadas de investigación clínica [14,15].

Como se mencionó anteriormente, la primera señal de activación de las células T es el reconocimiento del antígeno a través del receptor de células T (TCR). Como segunda señal, se requiere la participación de moléculas co-estimuladoras expresadas en la superficie de las células T (ej. CD28) y de las CPA (ej. B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)); el fallo en la recepción de esta segunda señal se debe a la tolerancia inmunológica. Las moléculas co-inhedoras (ej. CTLA-4) previenen la hiper-activación inmune y evitan el daño en tejido mediante la limitación de la actividad de células T. Por tanto, las moléculas co-inhedoras son necesarias para controlar el potencial destructivo del sistema inmune y mantener la homeostasis inmune, es decir, la existencia tanto de células T efectoras como células T reguladoras, así como CDs maduras y tolerogénicas [16].

El receptor CTLA-4, también conocido como CD152, es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) y es la primera molécula co-inhedoras identificada. Presenta una homología del 30% con CD28 y está implicada en la regulación de la activación de los linfocitos T. El gen *ctla-4* se expresa constitutivamente en los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ (células T_{reg}) debido a que es necesario para la transcripción del factor Foxp3, el cual determina el linaje de células T_{reg}. No obstante, varios estudios han demostrado la expresión del gen *ctla-4* en otro tipo de células, incluyendo linfocitos B, monocitos, granulocitos, entre otras; su función es desconocida en estas células [13]. CTLA-4 es un regulador negativo clave que se recluta y sobreexpresa en la membrana plasmática tras la estimulación del TCR con el antígeno durante la fase inicial de la activación de células T, de tal forma que compite con CD28 por la unión a los miembros de la familia B7 (CD80/CD86) de moléculas accesorias expresadas en CDs y otras

CPAs. La unión con CD28 promueve la proliferación de células T al incrementar la producción de IL-2 y factores anti-apoptóticos; además, reduce el número de uniones TCR-antígeno para generar una respuesta. En contraste, la unión de CTLA-4 bloquea la respuesta celular mediada por CD28, disminuye la producción de citocinas estimuladoras (ej. IL-2), incrementa la producción de citocinas inmunosupresoras (ej. TGF- β) y arresta el ciclo celular [17]. Por tanto, inhibe eficazmente la activación y estimulación de células T, atenuando la respuesta inmune y restaurando la tolerancia, tanto a antígenos propios, lo que permite mantener la homeostasis inmune, como hacia los antígenos asociados a tumores.

Además de bloquear la función de CD28, CTLA-4 ejerce su función co-inhibitoria a través de la señalización de CD80/CD86: por ejemplo, la interacción entre CTLA-4 y CD80/CD86 induce el catabolismo de triptófano por la inducción de la expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa, que finalmente inhibe las respuestas de células T.

La proteína CTLA-4 contiene un dominio extracelular de 5 unidades, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática; además, presenta distintas isoformas. La isoforma unida a la membrana actúa como un homodímero interconectado por un enlace disulfuro, mientras que la isoforma soluble actúa como un monómero. El dominio intracelular de la CTLA-4 es similar al de CD28 y tiene actividad catalítica. La inhibición de las respuestas de las células T inducida por la CTLA-4 se debe a la desfosforilización de algunas proteínas como la CD3 o la LAT (linker of activated T cells) [18]. Además, presenta dos sitios de N-glicosilación en Asn78 y Asn111, sin embargo, ninguno parece ser importante para la estructura o estabilidad de CTLA-4. Existe evidencia de que las interacciones extracelulares con CTLA-4 conducen a la oligomerización de CD80, creando así el potencial de regular las vías de señalización intracelular [19].

Notablemente, en contraste con los patógenos, las células tumorales no solo pueden inducir la sobreexpresión de CTLA-4 en células T, sino que también carecen de moléculas co-estimuladoras; lo que les permite evadir el sistema inmune y proliferar. La importancia fundamental de CTLA-4 sobre el control de las células T está bien

fundamentada en investigaciones previas que han demostrado que la delección del gen CTLA-4 conduce a una hiperactivación inmune sistémica letal caracterizada por linfoproliferación y destrucción de tejido multiorgánico [20]. Además, se ha sugerido que la función de las T_{reg} también es bloqueada por anticuerpos anti-CTLA-4. Un abordaje para suprimir la regulación negativa mediada por CTLA-4 consiste en su bloqueo mediante anticuerpos monoclonales; lo que conduce a una interacción viable entre B7 (B7.1/B7.2) en CPAs y CD28 en células T [6, 21]. Este enfoque está siendo explorado a nivel clínico en distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, próstata, pancreático, hepático y colorrectal [22,23].

3.1.2.1. Evidencia preclínica del bloqueo de CTLA-4 como terapia contra cáncer

El papel fundamental de CTLA-4 como punto de control o “checkpoint” en las respuestas del sistema inmune adaptativo aunado a la teoría de la vigilancia inmune del cáncer sustenta la hipótesis de que el bloqueo de CTLA-4 puede romper la tolerancia inmune hacia las células malignas y conduce a la erradicación o regresión del tumor. En modelos de ratón se ha demostrado que el desarrollo de anticuerpos inhibidores específicos de CTLA-4 aumenta la activación de las células T y su proliferación *in vivo* [24]. También se ha demostrado que los AATs no siempre pueden provocar una respuesta inmune efectiva a través de las rutas de TCR/MHC y CD80/CD86, a menos que la vía de CTLA-4 sea bloqueada [25, 26].

Los efectos terapéuticos del bloqueo de CTLA-4 se han probado en un rango de biomodelos de tumores, incluyendo melanoma [27], carcinoma de mama [28] y linfoma [29]. En modelos animales de cáncer de próstata, el tratamiento con anti-CTLA-4 no solo obtuvo una disminución del crecimiento tumoral, sino que también se asoció con un importante beneficio en tras la extirpación quirúrgica del tumor. Sin embargo, el tratamiento con anticuerpos específicos anti-CTLA-4 resultó más efectivo en combinación con las vacunas contra cáncer [30,31]. En este sentido, en un modelo de ratón de cáncer de próstata, la incidencia de tumores fue reducida cinco veces mediante la administración de un anticuerpo anti-CTLA-4 a un ratón previamente

vacunado. En otro estudio, la inhibición de CTLA-4 junto con la vacuna de ADN dirigida a AATs específicos para melanoma aumentó sinérgicamente la tasa de erradicación del melanoma B16: este régimen de combinación resultó más efectivo cuando se administró por primera vez la vacuna, seguido por el anticuerpo anti-CTLA-4 y luego por una vacuna de refuerzo [32].

A pesar de los buenos resultados de la terapia, otro hallazgo importante fue que muchos animales que experimentaban rechazo inmune del cáncer también desarrollaron enfermedades autoinmunes (por ejemplo, despigmentación progresiva de la piel en el modelo de melanoma B16), que revela la pérdida de tolerancia a los tejidos normales [33]. Estas observaciones junto con el fenómeno de linfoproliferación observado en ratones con delección de CTLA-4, hacen evidente que se debe de evaluar de forma detallada la seguridad de las terapias basadas en anticuerpos anti-CTLA-4 en humanos.

3.1.2.2. Evidencia clínica del uso de anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4

El desarrollo más importante de inmunoterapia en cáncer fue la aprobación por parte la FDA de dos anticuerpos monoclonales humanos específicos para CTLA-4, ipilimumab en 2011 y tremelimumab en 2015, para su uso en pacientes con melanoma metastásico; ya sea como terapia inicial o después de recaída [34,35]. Después del bloqueo de CTLA-4 con tremelimumab, se observó infiltración de linfocitos T CD8⁺ y disminuyó la expresión de Foxp3 [36]. En cuanto a la eficacia terapéutica, distintos ensayos clínicos fase I/II usando tremelimumab (solo o en combinación con vacunas) han demostrado que el anticuerpo puede favorecer la regresión de cáncer en más de 10% de pacientes afectados con melanoma metastásico [37-39]. Actualmente, tremelimumab se aplica en combinación con otros fármacos anti-cáncer para el tratamiento de pacientes afectados con melanoma y otros tipos de tumores como cáncer de próstata [40]. Por otro lado, el bloqueo con ipilimumab incrementa la expansión clonal de CTL específicos para péptidos usados para vacunación de pacientes con melanoma [41]. En cuanto a la actividad terapéutica, ipilimumab

demostró resultados prometedores en etapas tempranas de las evaluaciones clínicas. En este sentido, en un estudio con 14 pacientes con melanoma avanzado se administraron múltiples dosis intravenosas de ipilimumab en combinación con vacunación subcutánea con 2 péptidos derivados del AAT gp100 [42]. El bloqueo de CTLA-4 indujo regresión del cáncer en 3 pacientes. Ipilimumab también se ha investigado para el tratamiento de otros tumores [43]. Por ejemplo, en un ensayo aleatorizado de fase II en pacientes (n = 130) con carcinoma de pulmón avanzado sin previa quimioterapia, los pacientes se dividieron (proporción = 1: 1: 1) para recibir paclitaxel más carboplatino con placebo (control) o ipilimumab (10 mg / kg) como dos tratamientos alternativos, ipilimumab simultáneo (ipilimumab + quimioterapia seguido de placebo o quimioterapia) o ipilimumab en fase (placebo + quimioterapia seguido de ipilimumab + quimioterapia). El tratamiento de ipilimumab en fase, pero no el tratamiento de ipilimumab simultáneo incrementó la progresión libre de tumor con relación a los controles [44]. En conjunto, los estudios de ipilimumab han demostrado el beneficio terapéutico del tratamiento y que es bien tolerado en un rango de dosis con la posibilidad de presentar algunos efectos secundarios, principalmente relacionados con autoinmunidad. En este sentido, se ha sugerido una correlación entre la dosis y la toxicidad y el beneficio clínico. Sin embargo, el número relativamente pequeño de pacientes ingresados en los estudios impide llegar a conclusiones definitivas sobre la eficacia, respuesta a la dosis y seguridad.

3.1.2.3. Toxicidad asociada al bloqueo de CTLA-4

Un problema importante en el uso de los anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 es la toxicidad. Como se esperaba de los hallazgos con estudios con animales, el bloqueo de este punto de control inmune se puede acompañar de efectos secundarios bien caracterizados conocidos globalmente como “eventos adversos relacionados con el sistema inmune” (irAEs). Los irAEs incluyen principalmente colitis (con diarrea como principal síntoma), dermatitis, hepatitis y endocrinopatías (por ejemplo, hipofístis); uveítis, nefritis y miopatía inflamatoria [45].

Estas toxicidades típicas probablemente provienen de la estimulación inmune inespecífica después del bloqueo de CTLA-4; en general son leves y autolimitadas, y se pueden tratar con corticoesteroides sistémicos. En casos raros, pueden presentarse efectos secundarios graves como colitis hemorrágica/perforante o necrólisis epidérmica tóxica que requieren un estricto control del paciente, hospitalización, interrupción del bloqueo de CTLA-4 y terapia de apoyo adecuada [45].

En un estudio se analizaron los datos de seguridad del tratamiento administrado a 1498 pacientes con melanoma avanzado, de los cuales 14 completaron las fases 1 a 3 de los ensayos clínicos con ipilimumab; el 64.2% presentaron efectos adversos y menos del 1% resultaron en muerte. Los irAEs más comunes fueron erupciones en piel, hepatitis, colitis, endocriopatías, hipopituitarismo o daño neurológico. Otros irAEs observados en 1% de los pacientes fueron uveítis, neumonitis, pancreatitis, nefritis autoinmune y otros [46]. Los datos de toxicidad revelan también que existe una asociación entre el desarrollo de irAEs y regresión tumoral en pacientes con melanoma en metástasis, así como un tiempo prolongado de recaída. Además, resultó interesante que el tratamiento de los efectos adversos autoinmunes con corticosteroides no afecta la actividad antitumoral [47,48].

3.1.3. Vacunas de ADN contra CTLA-4

El desarrollo de inmunoterapias alternativas que no requieran una dosificación constante y que disminuyan los costos asociados al tratamiento con anticuerpos monoclonales constituye un objetivo relevante. Por tanto, el desarrollo de vacunas contra CTLA4 se ha explorado por algunos grupos, principalmente bajo el enfoque de vacunas de ADN. Estas vacunas están compuestas por plásmidos que portan el gen codificante del antígeno vacunal y las regiones regulatorias que permiten su expresión. De esta forma cuando la vacuna es administrada, el antígeno blanco se expresa *in vivo*, con la consecuente inducción de respuestas inmunes humorales o celulares [49]. En los últimos años, se han logrado avances importantes en el desarrollo de vacunas de ADN, particularmente para el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas

crónicas. Sin embargo, estas vacunas han mostrado en general una inmunogenicidad modesta en humanos [50]. Por tanto, actualmente se desarrollan alternativas para aumentar su potencial inmunogénico, lo que incluye la coadministración con citocinas, probar distintas vías de inmunización, el uso de vehículos de entrega novedosos, entre otros.

Bajo el concepto de inducir respuestas inmunes contra un antígeno específico y a la vez contra CTLA-4, lo que permitiría una supresión de su papel inhibitorio en la inducción de respuestas de células T, se han desarrollado vacunas de ADN “duales” que codifican para una proteína de fusión que comprende al antígeno blanco y secuencias relevantes de CTLA-4. Este enfoque ha demostrado ser promisorio para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas de ADN contra cáncer [51-53]. En este escenario, se ha demostrado que la inmunización con plásmidos que expresan antígenos fusionados a CTLA-4 inducen respuestas específicas, preferentemente humorales (Th2); aunque la vacunación con ADN a través de la vía intramuscular generalmente induce respuestas inmunes del tipo Th1. Por lo tanto, la fusión de un antígeno específico a CTLA-4 proporciona una modificación simple pero efectiva de la vacuna de ADN si se desea una respuesta que presente un balance entre las respuestas Th1 y Th2 [54]. Sin embargo, se han identificado un número reducido de desarrollos de vacunas de ADN contra cáncer. Sloots y cols. (2008) demostraron que la vacunación con ADN plasmídico portador del dominio extracelular de CTLA-4 fusionado al antígeno HER-2 humano (residuos 1-222) mejora considerablemente la eliminación de tumores en ratones BALB/c, previamente expuestos a células de carcinoma renal (Renca) que expresan HER-2; lo que correlacionó con la inducción de respuesta humoral y de células T CD8⁺ contra HER-2 [55]. Del mismo modo, una vacuna de ADN codificante de CTLA-4 fusionado a los 224 residuos correspondientes al fragmento homólogo HER-2 Neu de rata retrasó la aparición espontánea de carcinomas en ratones BALB/neuT. En otro estudio reportado en 2013, los autores produjeron una vacuna de ADN que codifica para la secuencia de CTLA-4 humano fusionada al dominio transmembranal de la fosfatasa alcalina de placenta (PLAP); la

cual indujo en ratones c57BL/6 una respuesta humoral contra CTLA-4 humana con reactividad cruzada contra CTLA-4 murina, lo cual se correlacionó con una inhibición del crecimiento de tumores inducidos por células B16F10. Por otro lado, se observó que el acoplamiento de liposomas con pVAC-1-mCTLA-4 rompió la tolerancia al autoantígeno en ratones BALB/c y logró la inducción de una respuesta inmune potente contra CTLA-4 murino, así como la supresión del crecimiento del carcinoma subcutáneo de células renales (Renca) [56]. En otro estudio publicado en 2016, los autores diseñaron una vacuna de ADN basada en una fusión del antígeno prostático de células madre (PSCA) y el gen de CTLA-4. Los resultados mostraron en ratones la inducción de un alto nivel de anticuerpos anti-PSCA y un incremento significativo en la respuesta de células T CD4⁺ reactivas hacia PSCA. Para evaluar la eficacia anti-tumoral de esta vacuna, los ratones fueron retados con células tumorales expresando PSCA. El plásmido codificante de la fusión de PSCA y CTLA-4 generó una inhibición mayor del crecimiento tumoral en comparación con el plásmido que solamente codifica para el antígeno blanco [57].

Las vacunas de ADN ofrecen numerosas ventajas, tales como su bajo costo, fácil desarrollo y alta estabilidad; sin embargo, es indispensable comprobar plenamente que la administración del ADN exógeno es segura, por ejemplo: a) que no se inserta en el genoma del hospedero, ya que de lo contrario podría activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumores; b) que no se originan defectos genéticos heredables por integrarse en células germinales; c) que realmente no desencadenaría la producción de anticuerpos anti-ADN responsables de provocar o acelerar el desarrollo de enfermedades autoinmunes; d) que no se induzca tolerancia inmunológica [58].

3.1.4. Plantas como biofábricas de vacunas

Si bien existe un conjunto de plataformas bien establecidas para la producción de vacunas recombinantes, existen algunas limitaciones a superar para su aplicabilidad a nivel global. Las plataformas convencionales de expresión de proteínas tales como

bacterias, hongos, células de mamíferos o células de insecto, comúnmente involucran un proceso de producción complejo en términos del uso de medios de cultivo costosos, así como un requerimiento de purificación rigurosa; además, requieren de una gran inversión en biorreactores y las formulaciones obtenidas requieren cadena de frío durante su distribución y ser administradas por personal capacitado. En este sentido, es crucial el desarrollo de bioprocesos que produzcan biofarmacéuticos o vacunas a bajo costo y que sean formulaciones fáciles y seguras de administrar, especialmente en países en desarrollo [59]. El concepto de usar plantas genéticamente modificadas para la producción de biofarmacéuticos, principalmente vacunas, ofrece las siguientes ventajas: i) producción a bajos costos, ii) fácil escalamiento, iii) alta seguridad debido a que resulta inviable la reproducción de patógenos humanos en plantas, iv) alta capacidad biosintética, y v) efectos de bioencapsulación, que resulta esencial para asegurar la biodisponibilidad del componente terapéutico mediante una administración oral [60]. El uso de plantas como biofábricas constituye un enfoque conveniente para lograr la producción de vacunas por las ventajas clave anteriormente descritas. A la fecha se han desarrollado una amplia gama de tecnologías para expresar eficazmente antígenos en las células vegetales, entre los que destaca la transformación transitoria basada en vectores replicativos, que, después de la purificación del antígeno, permiten la formulación de vacunas parenterales. Sin embargo, el desarrollo de vacunas supone varios retos, relativos a garantizar la estabilidad y biodisponibilidad de la vacuna, así como superar la tolerancia inmunológica logrando la inducción de una respuesta inmune efectiva. Un enfoque para abordar este último aspecto consiste en el uso de adyuvantes que favorecen la inmunogenicidad del antígeno blanco. En particular, la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) ha sido utilizada como un adyuvante seguro y efectivo para la inducción de respuestas humorales y celulares. LT está integrada por dos subunidades: un dominio catalítico con actividad de ribosil transferasa A (LTA) de 27 kDa y la subunidad B (LTB) de 11 kDa que se presenta en forma de un pentámero asociado a la subunidad A para constituir la holotoxina [61]. LT entra a las células eucariotas mediante la interacción de LTB con los gangliósidos presentes en la membrana. El uso de LT como adyuvante es limitado debido a la

toxicidad de la subunidad A, sin embargo, LTB ha sido ampliamente utilizada como vehículo que aumenta la inmunogenicidad a nivel de mucosas para antígenos genéticamente fusionados a ésta [62]. LTB activa selectivamente la diferenciación de poblaciones de linfocitos e incrementa la presentación vía MHC-II por parte de las células dendríticas [63], conduciendo a la inducción de respuestas tanto de mucosas como sistémicas; lo que ofrece la posibilidad de lograr efectos terapéuticos en enfermedades que afectan tejidos distintos a los pertenecientes al tracto gastrointestinal. Pitcovski y cols. (2006) demostraron que la entrega por vía subcutánea (s.c.) de polipéptidos multiepitópicos, derivados de antígenos asociados a cáncer y fusionados genéticamente a LTB, logró la inducción de respuestas inmunes humorales en ratones. Determinaron que la producción de anticuerpos es dependiente de la unión de LTB a las células [61]. En otro estudio realizado por Marcela Díaz y cols. (2013) se logró demostrar la actividad adyuvante de LTB en un estudio fase 1 con pacientes que fueron vacunados vía intramuscular (i.m.) con V930, una vacuna de ADN con cantidades iguales de plásmidos expresando el dominio extracelular y transmembranal del receptor 2 del factor de crecimiento epidermal (HER-2), y con el plásmido expresando el antígeno carcinoembrionario (CEA) fusionado a LTB. La vacunación fue bien tolerada sin observarse el desarrollo de efectos adversos. Los resultados demostraron un incremento significativo tanto en la inmunidad celular, como aquella mediada por anticuerpos contra el antígeno bacteriano (LTB) [64]. En otro estudio reportado Ríos-Huerta y cols. (2017) lograron producir en células vegetales la proteína quimérica LTB-EBOV, que integró LTB como acarreador y dos epítopes de la proteína GP1 de *Zaire ebolavirus*. La proteína LTB-EBOV resultó ser inmunogénica en ratones BALB/c inmunizados por vía oral o s.c. Es importante señalar que se logró la inducción de respuestas humorales de IgA e IgG en ratones inmunizados por la vía oral [65].

Las vacunas de subunidades se pueden producir mediante métodos de transformación estable o expresión transitoria. En el sistema de transformación estable, los genes de la vacuna se insertan en el genoma de la planta, mientras que en el sistema de

expresión transitoria los genes son expresados en un corto plazo sin que ocurra la inserción en el genoma de la planta. La expresión transitoria se puede lograr mediante infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. Esta tecnología se ha aplicado principalmente a la producción de vacunas y anticuerpos que están cercanos a su comercialización. La mejor especie para la expresión transitoria es *Nicotiana benthamiana*, ya que es susceptible a diversos virus vegetales y a *A. tumefaciens* y por tanto es eficientemente sometida a infiltración sistémica empleando *A. tumefaciens* [66].

A la fecha se han propuesto una diversidad de prototipos de vacunas contra cáncer expresadas en plantas e incluso han sido aprobadas para ensayos clínicos. Por ejemplo, en un ensayo clínico fase 1 para linfoma non-Hodgkin se realizó la expresión transitoria de idiotipos individualizados (específicos para cada paciente) en *N. benthamiana* contra linfoma folicular de células B. Este enfoque permitió una producción rápida de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) derivados del tumor y la inmunización de cada paciente con antígenos terapéuticos individuales [67]. A pesar del éxito en la producción de vacunas contra el cáncer en sistemas vegetales, aún existen retos para establecer los sistemas de plantas como plataformas para la producción de vacunas, por ejemplo, un bajo nivel de expresión de la proteína de interés o la presencia de glicosilaciones específicas de la planta que no son deseadas. Sin embargo, los avances en la biotecnología de plantas, glicoingeniería e inmunología molecular pueden ser herramientas que conduzcan a la superación de estos inconvenientes y establecer a las plantas como una alternativa potencial como sistemas de producción de vacunas contra el cáncer.

3.2. JUSTIFICACIÓN

Las estrategias inmunoterapéuticas son consideradas un enfoque de frontera para tratar el cáncer. Sin embargo, es necesario expandir la investigación en este tópico en vista de los altos costos de los tratamientos basados en anticuerpos monoclonales, así como la necesidad de incrementar la eficacia de los tratamientos para garantizar el control de la enfermedad mínima residual. La implementación de una vacuna basada

en un inmunógeno con la capacidad de inducir respuestas inmunes hacia CTLA-4 es una propuesta relevante debido a la posible mejora en la eficacia terapéutica de las inmunoterapias contra el cáncer. En el contexto de la producción de vacunas recombinantes en hospederos novedosos, la aplicación de plantas como biofábricas constituye un enfoque atractivo por las ventajas clave que ofrece en vías de lograr la producción de vacunas a bajos costos. Es en este contexto que se propone la producción en plantas de una proteína fusión que comprenda a LTB como acarreador y la secuencia del dominio extracelular de CTLA-4, como un enfoque para el desarrollo de una nueva estrategia de vacunación contra el cáncer que sea efectiva y de bajo costo.

3.3. HIPÓTESIS

Es posible expresar en plantas el antígeno quimérico basado en el dominio extracelular de CTLA-4 y un acarreador inmunogénico (la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli*), dando lugar a una proteína con actividad inmunogénica en un modelo murino.

3.4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una vacuna candidato contra el cáncer, expresada en plantas y dirigida hacia CTLA-4, así como evaluar su potencial inmunogénico en un modelo murino bajo un esquema de inmunización parenteral.

3.4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar la quimera que comprenda LTB y el dominio extracelular CTLA-4 como antígeno blanco.
- Expresar el antígeno LTB-CTLA4 en *N. benthamiana* empleando un vector de expresión geminiviral.

- Determinar en ratones BALB/c la inmunogenicidad por la vía subcutánea del antígeno LTB-CTLA4 expresado en plantas.

3.5. METODOLOGÍA

3.5.1. Diseño de las proteínas quiméricas y construcción del vector de expresión

Se diseñaron tres proteínas quiméricas que incluyeron la secuencia de la proteína acarreadora LTB y el dominio extracelular de la secuencia humana de CTLA-4 (residues 1-125; GenBank BC074893.2). En el extremo amino terminal se fusionaron 3 distintos péptido señal que se probaron para determinar cuál de ellos conduce a la mayor expresión de la proteína fusión: 1) la secuencia de un péptido señal derivado de la proteína HA del virus de la influenza A [H1N1], 2) la secuencia de un péptido señal de la proteína BIP1 de *Chlamydomonas reinhardtii* o 3) la secuencia de un péptido señal murino líder derivado de la cadena pesada de IgG murina. En el extremo carboxilo terminal se agregó la secuencia SEKDEL y 8xHis para su posterior purificación. Los genes se clonaron dentro del vector geminiviral pBYR2e usando las enzimas de restricción *XbaI* y *SacI* (Figura 1*). Posteriormente, se transformó *E.coli* DH18B mediante choque térmico con el vector resultante pBYR2e-LTB-CTLA4. Las colonias fueron analizadas por PCR y posteriormente se transformó *A. tumefaciens* GV3101 por electroporación. Las colonias que contenían los genes de interés se confirmaron mediante PCR.

*VER SECCIÓN: PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN

3.5.2. Expresión y purificación de las proteínas quiméricas

Las colonias positivas de *A. tumefaciens* GV3101 que contenían el vector de expresión pBYR2e-LTB-CTLA4 se cultivaron a 28°C en medio LB toda la noche. Las células se cosecharon y el pellet se resuspendió en buffer de infiltración ajustando la concentración celular a una OD₆₀₀ de 0.4 para transformar las plantas. *N. benthamiana*

de 6 a 8 semanas de edad fueron agroinfiltradas usando jeringa. Se recolectaron hojas de las plantas infiltradas de experimento piloto a los 2, 3, 4, 5, y 6 días post-infiltración (dpi) para evaluar los patrones de expresión de las proteínas de interés. Las hojas se molieron y se prepararon los extractos de proteína total soluble. Para la producción a gran escala, las plantas se agroinfiltraron usando una cámara de vacío. El tejido fresco de hojas de plantas transformadas se procesó y filtró en presencia de buffer 5 para cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM e imidazol 5 mM, pH 7.4). Se recuperó el sobrenadante y los restos celulares invisibles se eliminaron mediante filtración con jeringa de 0.45 µm. El filtrado se cargó en una columna de afinidad Ni-NTA, se realizó un lavado y posteriormente se eluyó la proteína con buffer 250 (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 50 mM e imidazol 250 mM). La proteína eluida se filtró y lavó en varias ocasiones para disminuir la concentración de imidazol. Finalmente, la proteína purificada se almacenó a -80°C o se liofilizó para su almacenaje y posterior uso.

3.5.3. Análisis de SDS-PAGE y Western blot

Las muestras se resuspendieron en agua inyectable o en buffer reductor 10x para realizar el análisis en condiciones reductoras (Tris HCl 125 mM, SDS al 12%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 22%, azul de bromofenol al 0.001%, pH 6.8). Las proteínas se separaron usando un gel de acrilamida al 15% y las bandas fueron visualizadas mediante tinción con coomassie. Para el análisis por Western blot, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con leche en polvo descremada al 5% en PBS y se sondearon con un anticuerpo de conejo contra la subunidad B de la toxina del cólera (anti-CTB) conjugado con HRP de cabra o con un anticuerpo anti-His de cabra conjugado con HRP. Las bandas se detectaron mediante cámara de detección quimioluminiscente.

3.5.4. ELISA CTLA-4 y ELISA-GM1

Se utilizó el kit CTLA-4 SimpleStep ELISA humano para detectar el dominio extracelular de CTLA-4 en el antígeno quimérico elaborado en plantas. Adicionalmente, se evaluó el nivel de expresión de LTB-CTLA4 en el extracto de proteína total soluble mediante ELISA dependiente de gangliósido GM1 utilizando los extractos obtenidos como se describió anteriormente, sin incluir β -mercaptoetanol en el buffer de extracción. Se recubrieron placas de poliestireno de noventa y seis pozos durante la noche a 4 ° C con gangliósido GM1 tipo III (1,5 μ g por pocillo) disuelto en buffer de carbonatos (Na_2CO_3 15 mM y NaHCO_3 35 mM). Después de lavar con PBST, las placas se bloquearon durante 2 hrs a temperatura ambiente con leche en polvo sin grasa al 5% disuelta en PBST. Se añadieron los extractos de proteínas y las placas se incubaron durante la noche a 4 ° C. Después de la incubación, se añadió suero anti-CT (dilución 1: 500) como marcaje primario y se realizó una incubación a 4 ° C durante la noche. Se aplicó anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano como anticuerpo secundario (dilución 1: 2000) durante 2 hrs a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló mediante la adición de una solución de sustrato ABTS [0.6 mM 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) con H_2O_2 1 mM] y, finalmente, se obtuvieron los valores de densidad óptica $\text{OD}_{405\text{nm}}$ usando un fotómetro de microplaca Thermo Scientific Multiskan FC. Adicionalmente, se incluyó una curva estándar preparada con patrones CTB puros en el ensayo para cuantificar el contenido de proteína recombinante en hojas de *N. benthamiana*.

3.5.5. Evaluación del potencial inmunogénico

Se evaluó la inmunogenicidad de la proteína LTB-CTLA4 expresada en plantas en ratones BALB/c hembra de 10 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar con acceso libre a alimentos y agua de acuerdo con los procedimientos indicados por las Regulaciones Federales para la Experimentación y Cuidado de Animales (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, México). El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (número

CEID/201803).

Los grupos de ratones BALB/c (n = 5) se establecieron aleatoriamente y se sometieron a un esquema de inmunización subcutánea con 3 inmunizaciones en los días 1, 15 y 30 con LTB-CTLA4 expresada en plantas (10 µg) o el péptido CTLA4 (10 µg). Los antígenos se emulsionaron en un volumen de adyuvante incompleto de Freund (IFA). Además, se incluyó un grupo control que únicamente fue inmunizado con el vehículo PBS. Se recuperaron muestras de sangre los días 0, 14, 29, 45, 115 y 130 (T0, T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente). Para determinar la respuesta de IgG contra LTB o el péptido CTLA4 se analizaron muestras de suero mediante ELISA. Para este propósito, se recubrieron placas de poliestireno de noventa y seis pozos durante la noche a 4 ° C con 1 µg/pozo del péptido sintético CTLA4 (secuencia: DSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD) o 1 µg/pozo de LTB puro. El protocolo incluyó tres lavados con PBST entre cada paso. Las placas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% durante 2 hrs 25 ° C. Se agregaron diluciones en serie de sueros de ratones y las placas se incubaron a 4 ° C durante la noche. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario (dilución 1: 2000) y las placas se incubaron durante 2 hrs 25 ° C. La detección de unión a anticuerpos se realizó como se describe en el apartado anterior. Los niveles de anticuerpos se reportan como los valores medios de OD medidos en un lector de microplacas. Adicionalmente, se hizo un análisis de subclases de IgG usando anti-IgG1 y anti-IgG2 conjugados a HRP en dilución 1:2000. Para la determinación del título de anticuerpos, se analizaron las diluciones en serie y las diluciones más altas en las que el valor de OD estaba por encima del registrado para el grupo PBS + 2 × SD se determinó como el valor del título. Los datos generados a partir de la prueba de inmunogenicidad se analizaron mediante un ANOVA unidireccional utilizando el software GraphPad Prism 8 (p <0.05).

3.5.6. Citometría de flujo

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de una muestra de sangre venosa humana por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Se

evaluó la viabilidad celular mediante la tinción de azul de tripán. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado (10% de suero fetal bovino, 10 nM glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina) con PHA (10 µg/mL) durante 48 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se recolectaron un total de 5x10⁵ células por condición para incubarlas con suero anti-CTLA4 de ratones inmunizados con LTB-CTLA4 producido en plantas o con suero pre-inmunización a una dilución 1:100 por 30 min a 4°C. Al término de la incubación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal producido en cabra anti-IgG de ratón marcado con FITC durante 30 min a 4°C y adicionalmente, se tiñeron con un anticuerpo anti-CD3 de humano marcado con PerCP. Se establecieron controles experimentales realizando una tinción de células con isotipo K IgG2a de ratón o con un anticuerpo producido en ratón anti-CTLA4 de humano marcado con APC. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se fijaron con 1% de paraformaldehído antes de analizarlas en el citómetro. En todas las condiciones los receptores Fc fueron bloqueados incubando las células con 10% de suero AB humano por 30 min a 4°C. El análisis se realizó en el citómetro de flujo FACSCanto II y con el software FACSDiva. En todas las condiciones, la expresión de CTLA4 fue evaluada en la población de células CD3 positiva. Fueron analizados hasta 20,000 eventos en la región de células CD3.

3.6. RESULTADOS

Los genes optimizados *in silico* con diferentes péptidos señal se clonaron en un vector geminiviral y fueron expresados en *N. benthamiana*. El fenotipo de las hojas infiltradas con los plásmidos que contienen diferentes secuencias de péptido señal presentó pequeñas diferencias (Figura 2A*). El resultado de ELISA demostró que el mejor rendimiento de expresión de LTB-CTLA4 se obtuvo con el casete de expresión que contenía el péptido señal de planta, que mostró señales de necrosis a 6 dpi. El nivel de expresión más alto de LTB-CTLA4 fue de 1,29 µg/g de peso fresco de hojas a 4 dpi (Figura 2B*). El LTB-CTLA4 expresando las secuencias de péptido señal del virus de

la influenza y *C.reinhardtii* mostraron señales de necrosis a 4 dpi y acumularon menos proteína LTB-CTLA4 (datos no mostrados). Adicionalmente, la proteína LTB-CTLA4 en los extractos de plantas se detectó mediante análisis por Western blot usando un anticuerpo anti-conejo-anti-CTB-HRP de cabra (Figura 2C*). Es importante notar que el resultado por Western blot presenta una tendencia similar a lo que se obtuvo en el ELISA en la figura 2B*.

Se realizó otro análisis por Western blot utilizando anti-CTB-HRP y anti-His-HRP para probar la presencia e integridad de la proteína fusión LTB-CTLA4. El marcaje con ambos anticuerpos reveló la presencia de la proteína (~30 kDa) en muestras de hojas infiltradas. Las figuras 3A* y 3B* muestran una banda de LTB-CTLA4 entre los 150 y 250 kDa cuando se analizó en condiciones no reductoras, lo que sugiere que LTB-CTLA4 se ensambla en un pentámero. Además, en condiciones reductoras se mostró que LTB-CTLA4 también puede formar varios oligómeros. La figura 3C* muestra que se logró purificar la proteína LTB-CTLA4 a través de cromatografía de afinidad Ni-NTA. Adicionalmente, se confirmó la oligomerización y capacidad de unión a GM1 de la proteína quimérica a través del ensayo ELISA-GM1 (Figura 4*).

Se evaluó la inmunogenicidad de la proteína LTB-CTLA4 expresada en plantas en ratones BALB/c hembra. Los ratones fueron divididos en 3 grupos, a un grupo se le administró la proteína LTB-CTLA4 expresada en *N. benthamiana* (10 µg), otro grupo recibió el péptido sintético CTLA4 (10 µg), y un grupo control al que únicamente se le administró PBS. Los antígenos fueron administrados con adyuvante incompleto de Freund y los ratones recibieron 3 dosis vía subcutánea en los días 1, 15 y 30. Se obtuvieron muestras de sangre a los días 0, 14, 29, 45, 115 y 130 (T0, T1, T2, T3, T4 y T5, respectivamente) para determinar la respuesta de IgG contra LTB o el péptido CTLA4 en suero mediante ELISA. Los resultados demuestran que se obtuvo un importante incremento en la respuesta IgG contra el péptido sintético CTLA4 en el suero de los ratones inmunizados con el antígeno LTB-CTLA4 expresado en planta a partir del tiempo T3 comparado con los otros grupos. La seroconversión para LTB ocurrió una semana después de la primera inmunización para el grupo inmunizado con

el antígeno expresado en plantas (Figura 5*). Además, se demostró que el título de anticuerpo, determinado como el valor de OD que está por encima del registrado para el grupo PBS + 2 × SD, es significativamente mayor para los ratones inmunizados con LTB-CTLA4 expresado en plantas comparado con el obtenido para el grupo de ratones que solo recibieron el péptido sintético CTLA4 (Figura 6A*).

Finalmente, PBMCs de humano fueron incubadas con suero de ratones inmunizados con LTB-CTLA4 expresado en plantas para determinar su reactividad frente a CTLA-4 nativa por citometría de flujo. Los resultados demuestran un porcentaje significativamente mayor de células positivas cuando se empleó el suero de ratones inmunizados con LTB-CTLA4, mientras que los sueros preinmunes condujeron a una positividad muy baja (Figura 7*).

*VER SECCIÓN: PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN

3.7. DISCUSIÓN

Diversas estrategias terapéuticas que se han dirigido a la inhibición de CTLA-4 se encuentran en etapas avanzadas de investigación clínica y algunas de ellas han sido aprobadas por la FDA, este es el caso del anticuerpo monoclonal Ipilimumab. Sin embargo, aunque las posibilidades terapéuticas de los anticuerpos monoclonales son enormes, una limitación importante son los altos costos y la necesidad de una dosificación constante. Ante estas limitaciones el uso de plantas como biofábricas biofarmacéuticas ofrece entre otras ventajas una producción económica y relativamente rápida.

Bajo este contexto, se decidió combinar el enfoque de inmunidad activa contra moléculas punto de control con las ventajas de la tecnología molecular agrícola para establecer un modelo de inmunoterapia basado en un antígeno vegetal, LTB-CTLA4, que se expresó transitoriamente en *N.benthamiana*. Para ello, se utilizó un sistema de expresión geminiviral y los rendimientos fueron de hasta 0.96 µg de LTB-CTLA4 purificado por gramo de hojas frescas obtenido a los 4-5 días post-infiltración. Aunque este sistema normalmente da como resultado rendimientos en el orden de

microgramos por gramo de hojas frescas, este es un parámetro dependiente del producto. Los rendimientos observados en el presente estudio son comparables a los observados para enfoques de transformación nuclear estable, que están en el rango de 20-50 µg de peso seco.

Una ventaja clave del sistema de expresión que se seleccionó es la rápida producción del antígeno ya que no requiere etapa de selección y regeneración; el tiempo total invertido para la expresión de la proteína es de 3-4 semanas antes de realizar un escalamiento. Las diferentes señales de necrosis observadas en las hojas de *N.benthamiana* infiltradas con las construcciones portadoras de 3 diferentes péptido señal se cree que es debido a la expresión masiva y acumulación temprana de la proteína recombinante que genera estrés en la planta lo que incrementa la presencia de especies reactivas de oxígeno causando muerte celular.

Una vez que se determinaron las mejores condiciones de expresión del antígeno LTB-CTLA4, se generaron grandes lotes de expresión transitoria para proceder con la purificación de la proteína en cromatografía por columna Ni-NTA. Los resultados presentan una proteína contaminante que probablemente corresponde a RuBisCO. Debido a que LTB-CTLA4 y la enzima RuBisCO tiene un rango de precipitación cercano se debe explorar otros enfoques de purificación para lograr mayor pureza de LTB-CTLA4.

Se logró establecer el potencial inmunogénico de LTB-CTLA4 de origen vegetal después de completar el esquema de inmunización en ratones BALB/c. La proteína quimérica es capaz de inducir respuesta humoral con el título más alto de IgG anti-CTLA4 a las 12 semanas después de la administración de la última dosis. Además, se analizó la relación de IgG1/IgG2a y el resultado correlaciona con la típica respuesta Th2 favorecida por la presencia de la secuencia acarreadora LTB. A través de ensayo por citometría de flujo se determinó la reactividad significativa del suero de ratones inmunizados con LTB-CTLA4 frente a PBMC humanas, lo que sugiere que el anti-CTLA4 en suero de ratones reconoce las moléculas CTLA-4 nativas que se expresan en la superficie celular.

En resumen, se produjo con éxito LTB-CTLA4 en plantas y se propuso como vacuna candidato para terapia contra cáncer, la vacuna se produjo con rapidez y su expresión transitoria en plantas resulta en un enfoque rentable para generar un bioproducto accesible. Los estudios futuros se centrarán en analizar más a fondo la inducción de la respuesta inmune, así como investigar la eficacia de la vacuna para evitar la progresión del tumor.

3.8. CONCLUSIÓN

Se logró producir una proteína quimérica que comprende la fusión de una secuencia de la molécula CTLA-4 y una secuencia acarreadora inmunogénica, LTB, a través de su expresión transitoria en plantas y resultó en un candidato promisorio de vacuna contra cáncer por su capacidad para inducir respuestas humorales significativas en un modelo murino.

3.9. PERSPECTIVAS

- Evaluar la inmunoprotección de la proteína fusión LTB-CTLA4 en un modelo murino.

3.10. REFERENCIAS

1. INC. Instituto nacional del cáncer, el cáncer 2013, consultado en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/> 06-FEB-2014
2. Barreno, P. G. (2006). Cáncer. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 55-82.
3. International Agency for Research on Cancer: Globocan 2020, consultado en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
4. INEGI 2021, consultado en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf

5. Peres, L., da Luz, F. A., Pultz, B., Brígido, P. C., de Araújo, R. A., Goulart, L. R., & Silva, M. J. (2015). Peptide vaccines in breast cancer: The immunological basis for clinical response. *Biotechnology advances*, 33(8), 1868–1877. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.013>
6. Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480–489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>
7. Frydrychowicz, M., Boruckowski, M., Kolecka-Bednarczyk, A., & Dworacki, G. (2017). The Dual Role of Treg in Cancer. *Scandinavian journal of immunology*, 86(6), 436–443. <https://doi.org/10.1111/sji.12615>
8. Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., Honjo, T., & Fujii, S. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3360–3365. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611533104>
9. Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in immunology*, 37(3), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002>
10. Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I. S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L. P., Gimotty, P. A., Gilks, C. B., Lal, P., Zhang, L., & Coukos, G. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*, 475(7355), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature10169>
11. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., ... Urban, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 363(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
12. Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D., & Allison, J. P. (2011). Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature reviews. Cancer*, 11(11), 805–812. <https://doi.org/10.1038/nrc3153>
13. Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(17), 1974–1982. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358>
14. Pardoll D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

15. Lipson, E. J., & Drake, C. G. (2011). Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(22), 6958–6962. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1595>
16. Chen L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature reviews. Immunology*, 4(5), 336–347. <https://doi.org/10.1038/nri1349>
17. Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, 229(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x>
18. Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5256), 1734–1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
19. Fernández-Ponce C., Hernández-Martínez D., Silvera-Redondo C. (2006). Ctl-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. *Salud Uninorte*. 22(2).
20. Chang, T. T., Kuchroo, V. K., & Sharpe, A. H. (2002). Role of the B7-CD28/CTLA-4 pathway in autoimmune disease. *Current directions in autoimmunity*, 5, 113–130. <https://doi.org/10.1159/000060550>
21. Fairman, R., Fenderson, W., Hail, M. E., Wu, Y., & Shaw, S. Y. (1999). Molecular weights of CTLA-4 and CD80 by sedimentation equilibrium ultracentrifugation. *Analytical biochemistry*, 270(2), 286–295. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4095>
22. Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3(5), 541–547. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90125-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6)
23. Galanina, N., Kline, J., & Bishop, M. R. (2017). Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Therapeutic advances in hematology*, 8(2), 81–90. <https://doi.org/10.1177/2040620716673787>
24. Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), 405–413. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-x)
25. Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5256), 1734–1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>

26. Yang, Y. F., Zou, J. P., Mu, J., Wijesuriya, R., Ono, S., Walunas, T., Bluestone, J., Fujiwara, H., & Hamaoka, T. (1997). Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer research*, 57(18), 4036–4041.
27. Wang, X. Y., Zuo, D., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2011). Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a new therapeutic approach for advanced melanoma. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 12(17), 2695–2706. <https://doi.org/10.1517/14656566.2011.629187>
28. Hurwitz, A. A., Yu, T. F., Leach, D. R., & Allison, J. P. (1998). CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 10067–10071. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10067>
29. Van Ginderachter, J. A., Liu, Y., Geldhof, A. B., Brijs, L., Thielemans, K., De Baetselier, P., & Raes, G. (2000). B7-1, IFN gamma and anti-CTLA-4 co-operate to prevent T-cell tolerization during immunotherapy against a murine T-lymphoma. *International journal of cancer*, 87(4), 539–547.
30. Kwon, E. D., Hurwitz, A. A., Foster, B. A., Madias, C., Feldhaus, A. L., Greenberg, N. M., Burg, M. B., & Allison, J. P. (1997). Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), 8099–8103. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8099>
31. Kwon, E. D., Foster, B. A., Hurwitz, A. A., Madias, C., Allison, J. P., Greenberg, N. M., & Burg, M. B. (1999). Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15074–15079. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15074>
32. Gregor, P. D., Wolchok, J. D., Ferrone, C. R., Buchinshky, H., Guevara-Patiño, J. A., Perales, M. A., Mortazavi, F., Bacich, D., Heston, W., Latouche, J. B., Sadelain, M., Allison, J. P., Scher, H. I., & Houghton, A. N. (2004). CTLA-4 blockade in combination with xenogeneic DNA vaccines enhances T-cell responses, tumor immunity and autoimmunity to self antigens in animal and cellular model systems. *Vaccine*, 22(13-14), 1700–1708. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.048>
33. van Elsas, A., Hurwitz, A. A., & Allison, J. P. (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-

- CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *The Journal of experimental medicine*, 190(3), 355–366. <https://doi.org/10.1084/jem.190.3.355>
34. Ribas A. (2010). Clinical development of the anti-CTLA-4 antibody tremelimumab. *Seminars in oncology*, 37(5), 450–454. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.010>
35. Boasberg, P., Hamid, O., & O'Day, S. (2010). Ipilimumab: unleashing the power of the immune system through CTLA-4 blockade. *Seminars in oncology*, 37(5), 440–449. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.004>
36. Ribas, A., Comin-Anduix, B., Economou, J. S., Donahue, T. R., de la Rocha, P., Morris, L. F., Jalil, J., Dissette, V. B., Shintaku, I. P., Glaspy, J. A., Gomez-Navarro, J., & Cochran, A. J. (2009). Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(1), 390–399.
37. Huang, R. R., Jalil, J., Economou, J. S., Chmielowski, B., Koya, R. C., Mok, S., Sazegar, H., Seja, E., Villanueva, A., Gomez-Navarro, J., Glaspy, J. A., Cochran, A. J., & Ribas, A. (2011). CTLA4 blockade induces frequent tumor infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(12), 4101–4109. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0407>
38. Kirkwood, J. M., Lorigan, P., Hersey, P., Hauschild, A., Robert, C., McDermott, D., Marshall, M. A., Gomez-Navarro, J., Liang, J. Q., & Bulanhagui, C. A. (2010). Phase II trial of tremelimumab (CP-675,206) in patients with advanced refractory or relapsed melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(3), 1042–1048. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2033>
39. Camacho, L. H., Antonia, S., Sosman, J., Kirkwood, J. M., Gajewski, T. F., Redman, B., Pavlov, D., Bulanhagui, C., Bozon, V. A., Gomez-Navarro, J., & Ribas, A. (2009). Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(7), 1075–1081. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.2435>
40. Ribas, A., Comin-Anduix, B., Chmielowski, B., Jalil, J., de la Rocha, P., McCannel, T. A., Ochoa, M. T., Seja, E., Villanueva, A., Oseguera, D. K., Straatsma, B. R., Cochran, A. J., Glaspy, J. A., Hui, L., Marincola, F. M., Wang, E., Economou, J. S., & Gomez-Navarro, J. (2009). Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clinical*

cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 15(19), 6267–6276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1254>

41. Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., Yellin, M., & Weber, J. (2005). Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(4), 741–750. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.128>
42. Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., Duray, P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. P., Davis, T. A., & Rosenberg, S. A. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8372–8377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533209100>
43. Calabrò, L., Danielli, R., Sigalotti, L., & Maio, M. (2010). Clinical studies with anti-CTLA-4 antibodies in non-melanoma indications. *Seminars in oncology*, 37(5), 460–467. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.006>
44. Reck, M., Bondarenko, I., Luft, A., Serwatowski, P., Barlesi, F., Chacko, R., Sebastian, M., Lu, H., Cuillerot, J. M., & Lynch, T. J. (2013). Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(1), 75–83. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds213>
45. Di Giacomo, A. M., Biagioli, M., & Maio, M. (2010). The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Seminars in oncology*, 37(5), 499–507. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.007>
46. Ibrahim, R., Berman, D., DePril, V., Humphrey, R., Chen, T., Messina, M., Chin, K., Liu, H., Bielefield, M., & Hoos, A. (2011). Ipilimumab safety profile: Summary of findings from completed trials in advanced melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(15). https://doi.org/10.1200/jco.2011.29.15_suppl.8583
47. Weber J. (2007). Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *The oncologist*, 12(7), 864–872. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-7-864>

48. Tarhini A. (2013). Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab ctla-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica*, 2013, 857519. <https://doi.org/10.1155/2013/857519>
49. Lee, S. H., Danishmalik, S. N., & Sin, J. I. (2015). DNA vaccines, electroporation and their applications in cancer treatment. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(8), 1889–1900. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1035502>
50. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2014). DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(11), 3153–3164. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.980686>
51. Kennedy, N. J., Spithill, T. W., Tennent, J., Wood, P. R., & Piedrafita, D. (2006). DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine*, 24(7), 970–979. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.076>
52. Chinnasamy, D., Tector, M., Chinnasamy, N., Dennert, K., Kozinski, K. M., & Oaks, M. K. (2006). A mechanistic study of immune system activation by fusion of antigens with the ligand-binding domain of CTLA4. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 55(12), 1504–1514. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0153-7>
53. Tachedjian, M., Boyle, J. S., Lew, A. M., Horvatic, B., Scheerlinck, J. P., Tennent, J. M., & Andrew, M. E. (2003). Gene gun immunization in a preclinical model is enhanced by B7 targeting. *Vaccine*, 21(21-22), 2900–2905. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00162-2)
54. Boyle, J. S., Brady, J. L., & Lew, A. M. (1998). Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*, 392(6674), 408–411. <https://doi.org/10.1038/32932>
55. Sloots, A., Mastini, C., Rohrbach, F., Weth, R., Curcio, C., Burkhardt, U., Jäger, E., Forni, G., Cavallo, F., & Wels, W. S. (2008). DNA vaccines targeting tumor antigens to B7 molecules on antigen-presenting cells induce protective antitumor immunity and delay onset of HER-2/Neu-driven mammary carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(21), 6933–6943. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1257>
56. Lan, K. H., Liu, Y. C., Shih, Y. S., Tsaid, C. L., Yen, S. H., & Lan, K. L. (2013). A DNA vaccine against cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) prevents tumor growth. *Biochemical and biophysical research communications*, 440(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.031>
57. Mai, T. J., Ma, R., Li, Z., & Bi, S. C. (2016). Construction of a fusion plasmid containing the PSCA gene and cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4

- (CTLA-4) and its anti-tumor effect in an animal model of prostate cancer. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 49(11), e5620. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165620>
58. Khan K. H. (2013). DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*, 3(1), 26–35. <https://doi.org/10.11599/germs.2013.1034>
 59. Rosales-Mendoza, S., & Nieto-Gómez, R. (2018). Green Therapeutic Biocapsules: Using Plant Cells to Orally Deliver Biopharmaceuticals. *Trends in biotechnology*, 36(10), 1054–1067. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.010>
 60. Yusibov, V., Streatfield, S. J., & Kushnir, N. (2011). Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond. *Human vaccines*, 7(3), 313–321. <https://doi.org/10.4161/hv.7.3.14207>
 61. Pitcovski, J., Bazak, Z., Wasserman, E., Elias, O., Levy, A., Peretz, T., Fingerut, E., & Frankenburg, S. (2006). Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. *Vaccine*, 24(5), 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.052>
 62. Arevalo-Villalobos, J. I., Govea-Alonso, D. O., Monreal-Escalante, E., Zarazúa, S., & Rosales-Mendoza, S. (2017). LTB-Syn: a recombinant immunogen for the development of plant-made vaccines against synucleinopathies. *Planta*, 245(6), 1231–1239. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2675-y>
 63. Fingerut, E., Gutter, B., Goldway, M., Eliahoo, D., & Pitcovski, J. (2006). B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology*, 112(3-4), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.005>
 64. Diaz, C. M., Chiappori, A., Aurisicchio, L., Bagchi, A., Clark, J., Dubey, S., Fridman, A., Fabregas, J. C., Marshall, J., Scarselli, E., La Monica, N., Ciliberto, G., & Montero, A. J. (2013). Phase 1 studies of the safety and immunogenicity of electroporated HER2/CEA DNA vaccine followed by adenoviral boost immunization in patients with solid tumors. *Journal of translational medicine*, 11, 62. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-62>
 65. Ríos-Huerta, R., Monreal-Escalante, E., Govea-Alonso, D. O., Angulo, C., & Rosales-Mendoza, S. (2017). Expression of an immunogenic LTB-based chimeric protein targeting Zaire ebolavirus epitopes from GP1 in plant cells. *Plant cell reports*, 36(2), 355–365. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2088-6>
 66. Lee, J. H., & Ko, K. (2017). Production of Recombinant Anti-Cancer Vaccines in Plants. *Biomolecules & therapeutics*, 25(4), 345–353. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.126>

67. McCormick, A. A., Reddy, S., Reinl, S. J., Cameron, T. I., Czerwinski, D. K., Vojdani, F., Hanley, K. M., Garger, S. J., White, E. L., Novak, J., Barrett, J., Holtz, R. B., Tusé, D., & Levy, R. (2008). Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10131–10136. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803636105>

PRODUCTO DE INVESTIGACIÓN

Artículo publicado: Expression and immunogenicity assessment of a plant-made immunogen targeting the cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4: a possible approach for cancer immunotherapy



Journal of Biotechnology
Volume 329, 10 March 2021, Pages 29-37



Expression and immunogenicity assessment of a plant-made immunogen targeting the cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4: a possible approach for cancer immunotherapy

Sutita Yiemchavee ^{a, b, 1}, Alejandra Wong-Arce ^{c, d, 1}, Andrea Romero-Maldonado ^{c, d}, Balamurugan Shanmugaraj ^{a, b}, Adriana E. Monsivais-Urenda ^{d, e}, Waranyoo Phoolcharoen ^{a, b}  , Sergio Rosales-Mendoza ^{c, d}  

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.01.016.

ANEXOS

Artículos en redacción

- Overview of cancer vaccine development targeting CTLA-4 and PD-1

El artículo de revisión está enfocado en analizar el panorama de vacunas que se han desarrollado dirigidas específicamente a los dos blancos terapéuticos con mayor foco de atención para el desarrollo de inmunoterapias contra cáncer, PD-1 y CTLA-4.

Otros artículos publicados

- Expression in algae of chimeric protein carrying several epitopes from tumor associated antigens

International Journal of Biological Macromolecules. Volume 147. 15 March 2020, 46-52

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.250

Autores: Jesús Hernández-Ramírez, Alejandra Wong-Arce, Omar González-Ortega, Sergio Rosales-Mendoza

Abstract: Immunotherapies for cancer treatment constitute promising avenues to fight this global health issue. Algae can be used as both biofactories and delivery vehicles of vaccines; having low cost, fast growth, enhanced safety, and adjuvant effects as advantages. In the present study a multiepitope protein, called BCB, was designed as an attractive approach to develop new cancer immunotherapies. The BCB protein targets epitopes from the following tumor-associated antigens: human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), mucin-like glycoprotein 1 (MUC1), Wilms' tumor antigen (WT1), and mammaglobin.

Moreover, the BCB protein is based on the B subunit of the heat labile *E. coli* enterotoxin as immunogenic carrier to brake tolerance against self-antigens. A synthetic BCB-coding gene was obtained and expressed in *Schizochytrium sp.* using the Algevir system. The BCB protein was successfully expressed in transformed algae at levels up to 637 µg/g fresh weight, retaining the GM1-binding activity. The algae-made BCB showed reactivity towards an anti-serum against the tumor cell line 4T1; evidencing its antigenicity. Moreover, the immunogenicity was evidenced in mice immunized with BCB, which developed serum IgG antibodies reacting against the 4T1 lysate. This study constitutes the first step in the development of innovative algae-based vaccines against cancer.

Key words: Algevir; chimeric antigen; tumor-associated antigen.