

Inmunotoxinas en terapias dirigidas contra el cáncer

Immunotoxins in Targeted Cancer Therapies

Arasai Vázquez Escalona^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1043-5070>

Ana Digna Ávila Cabrera¹ <https://orcid.org/0000-0002-6553-2054>

Ana Victoria Casadesus Pazos² <http://orcid.org/0000-0001-6905-7628>

Carmen Soto Febles² <http://orcid.org/0000-0002-8767-8740>

Cristina Mateo de Acosta del Río² <http://orcid.org/0000-0003-2180-9653>

Saira Vázquez Escalona² <http://orcid.org/0000-0001-5016-2479>

Katya Sosa Aguiar² <http://orcid.org/000-0001-7650-238X>

¹Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR). La Habana, Cuba.

²Centro de Inmunología Molecular (CIM). La Habana, Cuba.

*Autora para la correspondencia: arivazquez2310@yahoo.com

RESUMEN

Introducción: Las inmunotoxinas son proteínas quiméricas terapéuticas formadas por la conjugación química o molecular de un anticuerpo monoclonal o su fragmento a una toxina proteica que provoca la muerte de la célula diana. En los últimos años se ha desarrollado una amplia variedad de estas moléculas para su empleo en la terapia del cáncer, pero se necesita de la búsqueda constante de toxinas más potentes para su uso en la elaboración de las inmunotoxinas.

Objetivo: Mencionar el concepto de inmunotoxinas y el estado del arte en los últimos diez años de su uso en las terapias dirigidas contra el cáncer.

Métodos: Se realizó una búsqueda de artículos en inglés y español desde 2011 hasta el 2021 con relación al estado del arte de las inmunotoxinas en cuanto a la metodología de obtención, tipos de inmunotoxinas, así como de los resultados obtenidos en ensayos preclínicos y clínicos.

Desarrollo: En la actualidad, se evalúan diversas inmunotoxinas en ensayos clínicos Fase II y III. En el 2018 se aprobó el uso de Moxetumomab pasudotox (Lumoxiti) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos para el tratamiento de la leucemia de células pilosas, lo cual confirma el interés y las posibilidades terapéuticas de este tipo de moléculas.

Conclusiones: El uso de conjugados tales como las inmunotoxinas se encuentra en una zona en conflicto en el tratamiento del cáncer. Los resultados de diversos grupos de trabajo manifiestan que este tipo de moléculas constituye una alternativa para superar la toxicidad colateral de los citostáticos y muestran un marcado interés en su uso oncológico. En este trabajo se reporta una actualización de las investigaciones realizadas en los últimos diez años en el uso de las inmunotoxinas como herramientas para la terapia del cáncer.

Palabras clave: inmunotoxinas; toxinas bacterianas; toxinas formadoras de poros; anticuerpos monoclonales; inmunoconjugados.

ABSTRACT

Introduction: Immunotoxins are therapeutic chimeric proteins formed by the chemical or molecular conjugation of a monoclonal antibody or its fragment to a protein toxin that causes the death of the target cell. In recent years, a wide variety of these molecules have been developed for use in cancer therapy, but a constant search for more potent toxins is needed for use in the manufacture of immunotoxins.

Objective: Mention the concept of immunotoxins and the state of the art in the last ten years of their use in targeted therapies against cancer.

Methods: A search was made for articles in English and Spanish from 2011 to 2021 in relation to the state of the art of immunotoxins in terms of obtaining methodology, types of immunotoxins, as well as the results obtained in preclinical and clinical trials.

Development: Various immunotoxins are currently being evaluated in Phase II and III clinical trials. In 2018, the use of Moxetumomab pasudotox (Lumoxiti) was approved by the United States Food and Drug Administration for the treatment of

hairy cell leukemia, which confirms the interest and therapeutic possibilities of this type of molecule.

Conclusions: The use of conjugates such as immunotoxins is in a hot spot in cancer treatment. The results of various work groups show that this type of molecule constitutes an alternative to overcome the collateral toxicity of cytostatics and shows a marked interest in their oncological use. This paper reports an update of the research carried out in the last ten years on the use of immunotoxins as tools for cancer therapy.

Keywords: immunotoxins; bacterial toxins; pore-forming toxins; monoclonal antibodies; immunoconjugates.

Recibido: 13/12/2021

Aceptado: 03/02/2022

Introducción

El cáncer representa la segunda causa de muerte a nivel mundial, solo superado por las enfermedades cardiovasculares. En Estados Unidos se diagnosticaron 1 806 590 nuevos casos de cáncer en el año 2020.^(1,2) En Cuba en el año 2020 se describieron 48 082 nuevos casos de cáncer, esto representa la segunda causa de muerte de las enfermedades no transmisibles, con una tendencia ascendente.^(3,4)

Debido al aumento de la incidencia y mortalidad del cáncer actualmente han surgido terapias dirigidas enfocadas en el empleo de fármacos que bloquean el crecimiento de las células malignas, con la identificación de blancos moleculares específicos implicados en la propagación y progresión de la enfermedad.^(5,6,7,8)

A los tratamientos convencionales de quimioterapia y radioterapia se suman los basados en anticuerpos monoclonales (AcMs) como una alternativa y así disminuir las reacciones adversas producidas por los citostáticos. Los AcMs constituyen una de las terapias más utilizadas en el tratamiento del cáncer por su capacidad de dirigirse a antígenos tumorales como dianas específicas y bloquear las funciones involucradas en el desarrollo y progresión tumoral.⁽⁹⁾

El empleo de AcMs no basta para el tratamiento del cáncer, por lo que surgieron inmunoconjugados mediante la unión con drogas citotóxicas o toxinas, para lograr más eficacia terapéutica.^(10,11,12) Estos inmunoconjugados incluyen las inmunotoxinas (ITs) dirigidas contra antígenos presentes en células tumorales, células endoteliales de la vasculatura tumoral o células inmunocompetentes.^(13,14,15) Se plantea que una sola molécula de IT es capaz de inactivar más de 200 ribosomas o factor de elongación por minuto y causar la muerte celular mientras que, se necesitan 10^4 - 10^5 moléculas de fármacos quimioterapéuticos para causar el mismo efecto.⁽¹⁶⁾

El objetivo del artículo fue mencionar el concepto de inmunotoxinas y el estado del arte en los últimos diez años de su uso en las terapias dirigidas contra el cáncer.

Métodos

Se realizó una búsqueda de artículos en inglés y español desde 2011 hasta el 2021 con relación al estado del arte de las inmunotoxinas en cuanto a la metodología de obtención, tipos de inmunotoxinas, así como de los resultados obtenidos en ensayos preclínicos y clínicos.

Desarrollo

Inmunotoxinas

El surgimiento de los anticuerpos monoclonales (AcMs) permitió el desarrollo de las inmunotoxinas como un grupo de moléculas quiméricas de naturaleza proteica compuestas por la unión de un AcM (o fragmento) a una toxina. Tienen la posibilidad de combinar la especificidad del anticuerpo con la capacidad tóxica de la toxina para actuar de forma específica sobre la célula diana a la que va dirigido. Se pueden construir por métodos químicos y por técnicas de ADN recombinante.^(17,18,19)

Las primeras inmunotoxinas se conjugaron AcMs con toxinas a través de un enlace disulfuro mediante métodos químicos.^(20,21,22,23) Se utilizaron toxinas de origen

microbiano como la exotoxina de *Pseudomona exotoxin* (PE), *Diphtheria* (toxina diftérica, DT), toxinas de origen vegetal como la ricina (de la planta *Ricinus communis*) y actinosporinas de origen marino como la Sticolisina (de la anémona *Stichodactyla helianthus*). La mayoría de los trabajos publicados inicialmente en este tema describieron la potencia de la toxina diftérica frente a células humanas⁽²⁴⁾ y sirvieron de base para unirla a anticuerpos, estableciéndose el concepto de inmunotoxinas como una alternativa clínica a los agentes anticancerígenos convencionales.^(25,26,27)

Tipos de inmunotoxinas

Se han clasificado en primera, segunda, tercera y cuarta generación, según la composición de sus dominios y el método de obtención.

Inmunotoxinas de primera y segunda generación

Se obtienen por métodos químicos en los que se utilizan agentes heterobifuncionales para la conjugación tales como:

- N-succinimidil-3-(2-pyridiltio) propionato (SPDP).
- 4-succinimifiloxicarbonil- α -metil- α - (2 piridilditio tolueno) (SMPT).
- Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC).
- Glutaraldehído.
- Carbodimida.

En la construcción de inmunotoxinas de primera generación, se utilizaron toxinas naturales compuestas por dos dominios. El primer dominio es el encargado del reconocimiento a la membrana celular y el segundo dominio activa los mecanismos moleculares intracelulares que provocan la muerte celular.⁽²⁸⁾ Las toxinas más utilizadas fueron las obtenidas a partir de bacterias como la PE,^(29,30,31) DT^(32,33) y de plantas como la ricina^(34,35) que necesitan internalización para inhibir la síntesis de proteínas a nivel ribosomal.^(5,36) Estas primeras construcciones provocaron efectos adversos al ser administrados a humanos, porque incluían las formas naturales de toxinas capaces de unirse

inespecíficamente a células no tumorales⁽³⁷⁾ lo que demostró una pobre especificidad de la IT.

En las ITs de segunda generación se utilizan formas truncadas de las toxinas donde se elimina el dominio implicado en la interacción con la célula, y se mantiene el dominio catalítico.^(5,38,39,40,41) Este nuevo enfoque redujo la toxicidad inespecífica de las IT.

El Instituto de Oncología y Radiobiología (INOR) ha sido uno de los precursores en el uso de actinoporinas como toxinas⁽¹⁷⁾ en la construcción de inmunotoxinas de primera generación^(20, 21) con una toxina hemolítica aislada de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus* (Tabla 1).^(20,21,36,42,43,44,45,46) Estas inmunotoxinas resultaron ser específicas frente a líneas celulares, pero perdían la actividad hemolítica que en condiciones reductoras se recuperaba, lo cual es un punto importante a considerar para los experimentos *in vivo*.^(20,21)

Tabla 1- Inmunotoxinas elaboradas en el INOR por métodos químicos

Inmunotoxina	Blanco	Toxina hemolítica (TH)	DE ₅₀ (mM)	Tipo celular	Referencias
IORT6-TH	CD1	TH*	5X10 ⁻⁹	Leucemia linfoblástica aguda humana de origen T	Ávila AD y otros, Int. J. Cancer; 1988
IORT1-TH	CD6	TH*	1.3X10 ⁻⁸	Linfocitos T de sangre periférica	Mateo de Acosta C y otros. Rev. Cubana Oncol. 1987
CB-CEA -TH	Antígeno carcinoembrionario (CEA)	TH*	3X10 ⁻⁸	Carcinoma de mama humano	Ávila AD y otros. Int. J. Cancer. 1989
IOR R3-TH	Receptor del factor de crecimiento humano	TH*	ND	Adenocarcinoma de pulmón	Ávila AD y otros. Pharmacologyonline Cancer; 2006
17-1A- TH	IgG2a identifica una proteína de 40kDa expresada en carcinomas	TH*	ND	Carcinoma de colon	Ávila AD y otros. Pharmacologyonline Cancer; 2006

	colorectal humano				
IOR egf/r3- TH	Receptor del factor de crecimiento murino	TH*	1X10 ⁻⁹	Adenocarcinoma de pulmón	Ávila AD. y otros. Biol. Res; 2007
IORT3-ricina-A	CD3	Cadena A de la Ricina**	1.0 X10 ⁻⁷	Linfocitos T de sangre periférica	Magadán R y otros. Rev. Interferón y Biotecnología; 1987

*Aislada y purificada de la anémone de mar *Stichodactyla helianthus*.

**Aislada y purificada de la planta *Ricinus communis*

Tejuca y otros, de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, construyeron una IT con esta toxina hemolítica y el AcM IOR C5 que reconoce un antígeno asociado a tumores de colon. Esta IT demostró ser específica frente a las líneas tumorales de colon con una actividad hemolítica siete veces mayor que la reportada por la toxina libre.^(47,48,49)

Lee y otros en el 2019 obtuvieron la inmunotoxina HER2 (ScFv)-PE24 por métodos químicos para el cáncer de mama HER-2 positivo. Se utilizó el Her2-ScFv del AcM Trastuzumab que reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF-R) y se unió a la exotoxina de *Pseudomona A 24* (PEA) con SPDP.⁽⁵⁰⁾ La actividad biológica de la inmunotoxina se evaluó en líneas celulares de cáncer de mama por citometría de flujo. La IT fue tóxica para las células SK-BR-3 y BT-474 que sobreexpresan el antígeno Her-2 y no fue tóxica para las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 que tienen baja expresión del Her2. Con el Her2-scFv libre no se obtuvo toxicidad para ninguna de las líneas celulares utilizadas y la toxina PEA redujo la viabilidad en todas las células.⁽⁵⁰⁾ No se describe ningún estudio *in vivo* que demuestre su actividad biológica frente a células de cáncer de mama Her-2 positivas ni de la estabilidad de la ITs.

Las ITs obtenidas por métodos químicos manifestaron inconvenientes tales como:

- Pobre estabilidad *in vivo*.⁽²⁵⁾
- Heterogeneidad de enlace.⁽²⁵⁾
- Elevada inmunogenicidad y limitada capacidad de producción a gran escala.^(51,52,53)
- Reducción en la afinidad de unión al antígeno por la conjugación aleatoria.⁽⁵³⁾

- Pobre penetración en las masas tumorales por su tamaño molecular (>190 kDa).⁽⁵³⁾

Inmunotoxinas de tercera generación

Con el avance de las técnicas de clonaje molecular y ADN recombinante se desarrollaron las llamadas ITs de tercera generación o inmunotoxinas recombinantes (RITs). La generación de dichas moléculas estuvo marcada por la aplicación de las técnicas de clonaje molecular y ADN recombinante a la producción de proteínas de fusión compuestas por un fragmento de anticuerpo unido al dominio catalítico de una toxina.^(54,55) Estas no utilizan un AcM completo, sino su región de reconocimiento que se compone de fragmentos variables (ScFv, por sus siglas en inglés) de cadenas pesadas y ligeras (unidas por un puente disulfuro) enlazadas mediante un péptido a los componentes funcionales de la toxina como dominio citotóxico.⁽¹⁵⁾

Las ITs de tercera generación persiguen la optimización de las propiedades de marcaje tumoral y distribución *in vivo*, la reducción de sus potenciales efectos secundarios; incluida la inmunogenicidad y la mejora de la producción mediante el diseño de construcciones con dimensiones y estructuras aptas para su producción.^(55,56,57)

La obtención de ITs por técnicas de ADN recombinante surgió para mejorar las limitaciones encontradas con los métodos químicos^(5,27) y convirtió a estas moléculas en objetivo de investigación en la terapia antitumoral con mayor potencial y expectativas generadas.⁽⁵⁵⁾ Se plantea que las inmunotoxinas recombinantes presentan mayores ventajas con respecto a las de primera y segunda generación.

El diseño de este tipo de IT permite la obtención de conjugados con menor tamaño molecular que pueden facilitar la penetración a las masas tumorales, contribuyendo a superar los problemas de la penetración inefectiva y neutralización de la inmunidad.⁽⁵³⁾ Las ITs recombinantes que presentan ScFv con tamaños de alrededor de 60 kDa muestran una mejor penetración en tumores sólidos, poseen menor tiempo de retención en sangre con un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de alrededor de 20 min y por tanto, una mejor eficacia terapéutica.⁽⁵⁸⁾

Pirzer y otros en el 2018 obtuvieron inmunotoxinas mediante técnicas recombinantes con una toxina mutante optimizada de *Pseudomona* (PE24) y la toxina Gelonina. Emplearon dos AcMs que reconocen al factor de crecimiento epidérmico para cada una de las ITs. El primero fue el Traztuzumab (anti HER-2) y el segundo empleaba dos dominios de cadena pesada de camélidos (VHH) (dromedarios de América del sur) anti HER-1 que denominaron 7D12, y que fusionaron con el nanocuerpo 9G8 (7D9G). Ambos anticuerpos los conjugaron a cada una de las toxinas.^(59,60) Para evaluar la actividad y funcionalidad de las inmunotoxinas llevaron a cabo un ensayo de traducción de proteínas *in vitro*, donde se empleó un lisado de proteínas de conejo al que añadieron diferentes concentraciones de cada una de las IT.⁽⁵⁹⁾ Se midió la luminiscencia para analizar la traducción de luciferasa. Las inmunotoxinas 7D9G-Gelonina y Traztuzumab-Gelonina inhibieron la síntesis de las proteínas ribosomales del lisado de conejo, mientras que las inmunotoxinas 7D9G-PE24 y Traztuzumab-PE24 no produjeron inhibición de la síntesis de las proteínas ribosomales del lisado de conejo. Los autores asocian este resultado con la carencia del NAD⁺ que es necesario para la actividad de la toxina PE24.⁽⁵⁹⁾

Para el ensayo de la actividad citotóxica y especificidad de las ITs se utilizaron las líneas celulares A549 de adenocarcinoma de pulmón con bajo número de receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), la línea celular CHO-Ki que no expresa el EGF-R, las MDA-MB-468 y SK-BR-3 (de mama) con alta expresión de HER-1 y HER-2, respectivamente.⁽⁵⁹⁾

Ninguna de las ITs inhibió el crecimiento celular en las líneas celulares CHO-Ki. 7D9G-Gelonina y 7D9G-PE24 mostraron una fuerte actividad frente a la línea celular MDA-MB-468 (que sobreexpresaba HER1) en comparación con el anticuerpo y la toxina libres. 7D9G-Gelonina presentó un valor de inhibición máxima media (IC₅₀) de 68,0 ± 4,2 pM. Sin embargo, este conjugado no mostró toxicidad frente a la línea celular A549 con baja expresión de los receptores HER1. Frente a las líneas celulares SK-BR-3 y MDA-MB-468 la IT 7D9G-PE24 mostró una mayor inhibición del crecimiento celular con respecto a la toxina libre, con valores de IC₅₀ de 3,9 ± 0,5 y 0,8 ± 0,1 pM, respectivamente.⁽⁵⁹⁾

Se obtuvieron resultados similares con los otros conjugados Traztuzumab-PE y Traztuzumab-Gelonina los cuales tampoco inhibieron el crecimiento en las células CHO-Ki.

La 7D9G-PE24 mostró además el valor más alto de toxicidad del estudio frente a MDA-MB-468 (adenocarcinoma metastásico de mama) y A549, con un valor subpicomolar IC_{50} de $0,8 \pm 0,1 \mu M$. Las diferentes respuestas de las ITs podrían deberse a los mecanismos de acción de las toxinas. Pues el mecanismo de acción de PE⁶¹ se conoce en más detalle que el de la Gelonina, la cual es una proteína inactivadora de ribosomas (RIP) de tipo I.

En la actualidad el INOR trabaja en la construcción de la RIT de tercera generación mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante donde se utiliza el AcM contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico murino (ScFv7A7) y una toxina hemolítica aislada de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*, para su posterior evaluación.

Inmunotoxinas de cuarta generación

Las inmunotoxinas de cuarta generación se elaboran mediante la unión de anticuerpos humanizados y toxinas de origen humano como son las enzimas RNasa, granzima B y proteínas quinasas asociadas a muerte celular, con el objetivo de disminuir la inmunogenicidad de la IT.⁽⁶²⁾

Toxinas utilizadas en la elaboración de inmunotoxinas

Para el desarrollo de las inmunotoxinas se emplean tres tipos principales de toxinas:

- Toxinas tipo I.
- Toxinas tipo II.
- Toxinas tipo III.

Toxinas tipo I

Son enzimas citotóxicas que necesitan alcanzar la célula para producir la muerte^(29,63) y una vez internalizadas modifican las funciones intracelulares de las células, lo que causa muerte celular.⁽⁶⁴⁾ Un ejemplo sería el uso de proteasas asociadas a gránulos, como la granzima B, originada a partir de gránulos citotóxicos de linfocitos T CD8+ y las células asesinas naturales (NK).⁽⁶⁵⁾

En este grupo de enzimas se enmarcan también las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) de plantas superiores, hongos, algas y bacterias que pueden ser glicosiladas.⁽⁶⁶⁾ Dentro de este grupo se encuentran toxinas como la ricina⁽⁶⁷⁾ y la saporina (de la planta *Saponaria officinalis*) utilizadas en la elaboración de inmunotoxinas^(68,69) capaces de unirse a las membranas de las células eucariotas. La ricina está compuesta por las cadenas A y B unidas por un puente disulfuro y tras internalizar en las células por endocitosis se libera la cadena A (componente tóxico) hacia el citosol lo que causa muerte celular por apoptosis. La saporina internaliza por endocitosis, interfiere en la interacción entre el ribosoma y el factor de elongación 2 y provoca la muerte celular por inhibición de síntesis de proteínas.

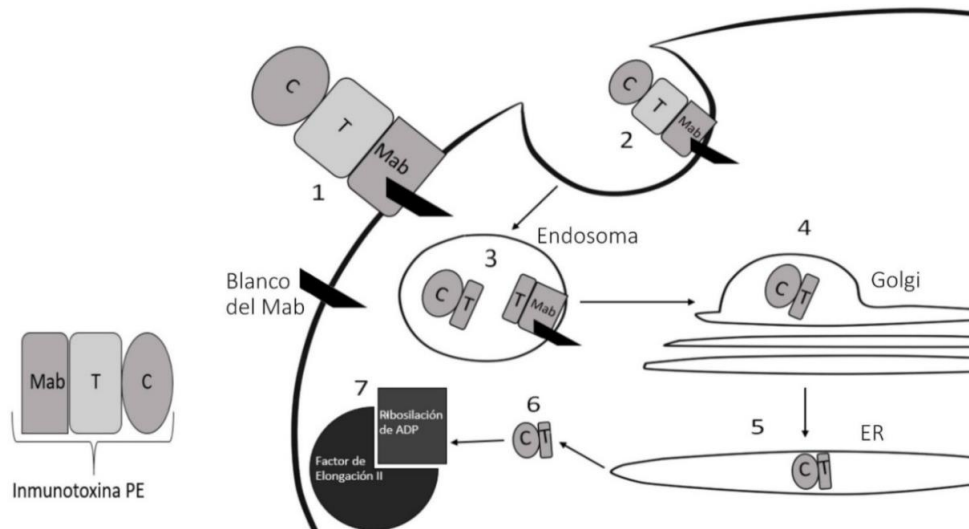
Ambas toxinas al ser internalizadas en las células, hacia el citoplasma, remueven en el ribosoma el residuo A4324 que es parte de la secuencia que codifica una sección del sitio de reconocimiento de los factores de elongación I y II e inhibe la síntesis de proteínas.^(68,70,71,72,73)

Toxinas tipo II

Son toxinas con regiones de anclaje a las membranas celulares que tras unirse al receptor son internalizadas y causan la muerte celular mediante mecanismos como la inhibición de la síntesis proteica o la unión al factor de elongación del citoesqueleto, e inhibición de la división celular. En la literatura hay trabajos que explican detalladamente los mecanismos de acción de las inmunotoxinas que emplean este tipo de toxinas.⁽⁷⁴⁾

Se han reportado resultados prometedores en ensayos clínicos de Fase I y II en linfomas de Hodgkin con las ITs RFT5.dgA y la ki-4dgA que utilizan la ricina como componente tóxico.⁽⁷⁵⁾ Sin embargo, una de las toxinas más empleadas en el desarrollo de inmunotoxinas de primera y de segunda generación es la exotoxina de *Pseudomona* (PE)⁽⁷⁶⁾ compuesta por tres dominios activos, cada uno con una función diferente. El primer dominio (dominio I) permite a la toxina reconocer y unirse de manera inespecífica a la membrana celular. En las inmunotoxinas de segunda y tercera generación elaboradas con PE se removió este dominio mediante técnicas de ADN recombinante. Una vez internalizada la toxina en las células el segundo dominio es procesado por la furina (proteasa que participa en

el procesamiento de proteínas), que separa la región Fv del AcM, y libera el tercer dominio en el interior celular. Este dominio III cataliza la inactivación del factor de elongación 2, de manera tal que inhibe la síntesis de proteínas y causa muerte celular (Fig. 1).^(77,78,79)



C: Dominio catalítico. T: Dominio transportador. Mab: Anticuerpo monoclonal.

Fig. 1- Mecanismos de acción de toxinas de diferentes fuentes utilizadas en la elaboración de inmunotoxinas. *Pseudomona exotoxin*.

Toxinas tipo III

Se definen como toxinas formadoras de poros que tienen un mecanismo de translocación y penetración en la membrana que contribuye formar el poro y producir apoptosis.^(80,81) Las toxinas tipo III son capaces de formar poros en la membrana celular⁽⁸²⁾ que permiten que el líquido extracelular penetre al interior celular. Esto causa un desbalance osmótico, un incremento del volumen celular y provocan un mecanismo de necrosis (Fig. 2).⁽⁸³⁾

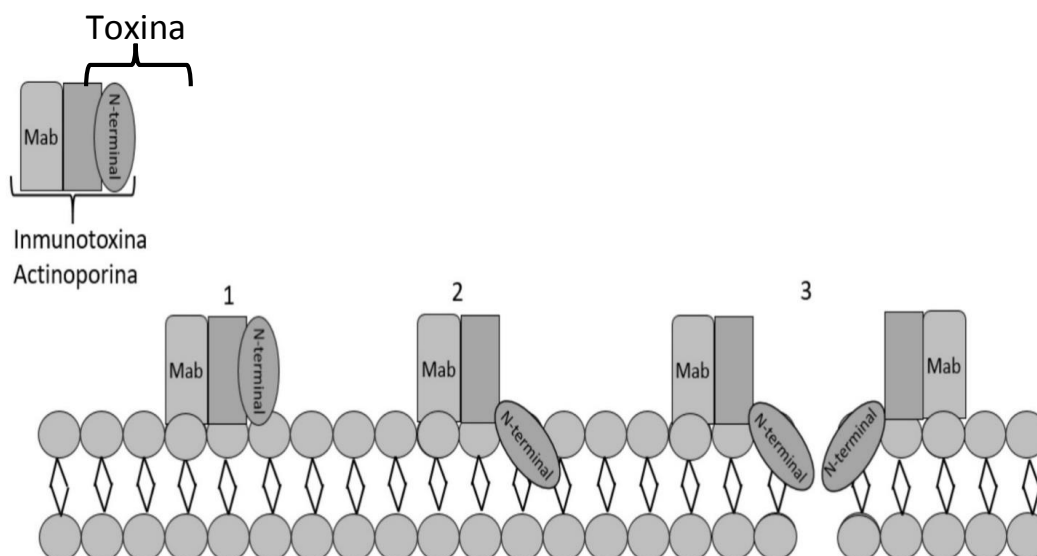


Fig. 2- Toxinas formadoras de poro (actinosporinas).

- Paso 1: La inmunotoxina de Pseudomona (IT) se une a la célula blanco.
- Paso 2: La IT penetra en la célula por endocitosis.
- Paso 3: La furina divide en dos el dominio T en el endosoma.
- Paso 4: El dominio C y uno de los segmentos del dominio T son transportados al Aparato de Golgi.
- Paso 5: Los dominios C y T son transportados al retículo endoplasmático.
- Paso 6: Se translocan al citoplasma.
- Paso 7: El dominio C inactiva el factor de elongación II por ribosilación catalítica ADP.

Este mecanismo provoca la inhibición de la síntesis de proteínas y por tanto la muerte celular.

La ventaja de estas toxinas es que no necesitan internalizar en las células, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y conduce a la muerte celular, lo que las convierte en una alternativa factible para algunos tumores de difícil acceso y previene su degradación en el interior celular. También pueden ser útiles como

puerta de entrada para que fármacos de quimioterapia puedan acceder a tumores de difícil acceso.⁽⁷⁴⁾

Las toxinas formadoras de poros (TFP) mejor caracterizadas corresponden a toxinas bacterianas como por ejemplo, la α -Hemolisina (Hla) perteneciente a *Streptococcus aureus* y Colisin de *Escherichia coli*. Sin embargo, existe un interés persistente en las TFP extraídas de distintos grupos de Cnidarios, que se debe al número de reportes toxicológicos relacionados con las picaduras de ejemplares pertenecientes a este grupo. Existen numerosos trabajos donde se mencionan algunas de estas toxinas y se explica su mecanismo de acción que va desde el anclaje a la membrana hasta la muerte celular.^(84,85,86,87,88) A estas toxinas producidas por los Cnidarios se les ha clasificado como Actinoporinas y están bien documentados los métodos de purificación, secuenciación y clonación de algunas de ellas.^(89,90,91,92)

Se han reportado casos en los que, para una mejor comprensión del mecanismo de acción, las toxinas han sido mutadas para identificar las regiones involucradas en el reconocimiento y anclaje a la membrana celular,^(93,94,95) así como sustancias capaces de potenciar o disminuir su actividad.^(96,97,98,99)

Lv y otros en el 2016 obtuvieron la IT Gigantoxin-4-4D5scFv mediante técnicas recombinantes con la toxina Gigantoxin-4 (de la anémona de mar *Stichodactyla gigantea*) y el fragmento D5scFv del AcM Herceptin (empleado en el tratamiento de cáncer de mama HER2/neu positivo). La actividad hemolítica de la inmunotoxina es dependiente de la concentración y resultó ser menor en comparación con la toxina libre, lo que según los autores, está relacionado con el mayor tamaño de la inmunotoxina.⁽¹⁰⁰⁾

En un ensayo de inhibición de la proliferación celular con 3(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT) se utilizaron las líneas celulares SK-OV-3 (HER2/neu positivas) y HEK-293 y (HER2/neu negativas). La inmunotoxina Gigantoxin-4-4D5 ScFv inhibió la proliferación de la línea celular SK-OV-3 ($IC_{50}=0.171$ nM) a una concentración menor que la toxina libre ($IC_{50}=74,1$ nM). La IT Gigantoxin-4-4D5scFv resultó ser más tóxica en la línea celular SK-OV-3 en comparación con la HEK-293 lo que indica una unión específica a través del anticuerpo.⁽¹⁰⁰⁾

3. Anticuerpos en la construcción de inmunotoxinas

Para la terapia del cáncer es necesaria la identificación de blancos terapéuticos que permitan atacar la enfermedad. Algunos de los más conocidos son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR),⁽¹⁰¹⁾ la proteína de membrana HER-2,⁽¹⁰¹⁾ el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF)⁽¹⁰²⁾ y la glicoproteína A33, que se expresa mayormente en tejidos del colon.⁽¹⁰³⁾

Los anticuerpos son muy efectivos en la identificación de estos blancos y les proporcionan a las inmunotoxinas selectividad y especificidad. Según su origen y estructura se clasifican en murinos (si provienen de ratón), quiméricos (cuando se fusiona una región variable murina con una región constante humana), humanizado (una región variable humanizada, con una región constante humana) donde la molécula es prácticamente humana (cuenta con algunos fragmentos de la secuencia de aminoácidos pertenece a otra especie) o completamente humana.^(104,105)

En la elaboración de la primera y la segunda generación de inmunotoxinas se han utilizado AcM murinos⁽¹⁰⁶⁾ que han presentado limitaciones debido a reacciones adversas tales como alergias, hepatotoxicidad y formación de complejos inmunes, causadas por la inmunogenicidad de la proteína de ratón.⁽¹⁰⁷⁾ Esto se debe a la interacción entre el fragmento Fc del ratón y los receptores humanos y la producción de anticuerpos anti-ratón (respuesta HAMA). Actualmente es una práctica común el empleo de anticuerpos humanizados debido a su menor inmunogenicidad, mayor eficacia y $t_{1/2}$.⁽¹⁰⁸⁾

En la tercera generación de inmunotoxinas, lo más frecuente es el empleo de AcMs quiméricos o humanizados, aunque puede encontrarse la utilización de anticuerpos murinos⁽⁵⁵⁾ y se emplean fragmentos ScFv debido a que los AcMs completos muestran poca efectividad y pobre acceso a los tumores sólidos.⁽¹⁰⁹⁾

Dentro de los anticuerpos más utilizados en la construcción de IT se encuentra el AcM humanizado Herceptín (Trastuzumab) que es usado en el tratamiento de cáncer de mama como terapia adyuvante a quimioterapia. Hajighasemlou y otros en el 2015 lo conjugaron con la toxina neurotóxica Botulinun (de *Clostridium botulinun*) con el fin de aumentar la eficacia de este AcM con una disminución de las dosis terapéuticas. Para el estudio emplearon las líneas celulares SK-BR-3 de

tumor de mama humano y la línea celular BT-474 de carcinoma mamario humano, ambas con alta expresión de Her 2. Las células se trataron tanto con la IT como con el anticuerpo libre y los resultados mostraron una disminución de la viabilidad celular de las BT-474 y SK-BR-3 del 94,96 % y 95,8 %, respectivamente con la inmunotoxina. El tratamiento con el AcM libre presentó una mayor actividad frente a BT-474 que frente a SK-BR-3. Lo que podría indicar que se puede aumentar la eficacia del Herceptin cuando se une a la toxina y esto significaría una disminución de las dosis del AcM y de sus efectos adversos. Esto convertiría al conjugado en un candidato para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión del receptor de Her2.⁽¹¹⁰⁾

Estudios realizados en Inmunotoxinas

Las inmunotoxinas desarrolladas mediante ingeniería genética han demostrado poseer menos inmunogenicidad y toxicidad no específica que las obtenidas por métodos químicos. Esta es una de las razones de que algunas hayan alcanzado la fase de estudios preclínicos y clínicos, siendo efectivas contra una amplia gama de tumores. Además de ser capaces de producir respuesta antitumoral al combinarlas con fármacos quimioterapéuticos.⁽¹¹¹⁾

Fase preclínica

Resultados descritos de estudios preclínicos actuales con inmunotoxinas han demostrado una alta efectividad y baja toxicidad.

Inmunotoxina MOC31PE

Andersson y otros en el 2017 utilizaron la inmunotoxina MOC31PE, para el tratamiento de la metástasis peritoneal en el cáncer epitelial de ovario. Está formada por la unión covalente del AcM-MOC31 (que reconoce la glicoproteína transmembrana EpCAM) con la toxina truncada PE. Se estudió la actividad individual de la inmunotoxina, así como su combinación con drogas citotóxicas en líneas celulares humanas que expresaban EpCAM (B76 y MDHA2774) *in vitro* y en modelos murinos con metástasis peritoneal en células epiteliales de ovario (PM-EOC).⁽¹¹²⁾

Los resultados *in vitro* muestran en ambas líneas celulares una reducción de la viabilidad de un 25-30 % a bajas concentraciones de la IT. Al combinarla con

Paclitaxel se alcanzó una disminución en un 50 % en la viabilidad celular, esto demuestra un efecto aditivo ($p < 0,05$).

En los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones desnudos portadores de tumores provenientes de las líneas celulares humanas B76 y 2774. Se observó un aumento de la supervivencia de 44 y 53 días, respectivamente, a una dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ que fue tolerada sin mostrar efectos adversos, con respecto a los controles. Al ser administrada junto Paclitaxel no se observó ningún efecto aditivo. Al administrar el Paclitaxel y la IT por separado la supervivencia de los animales fue similar a la de los grupos controles. Los resultados de los experimentos *in vitro* no coincidieron con los obtenidos en animales.

Se utilizaron dosis de MOC31PE junto con Mitomicina C y se obtuvo una inhibición del crecimiento tumoral, aumento de la supervivencia de ratones portadores de tumores y con bajos efectos adversos.⁽¹¹²⁾

Inmunotoxina EGFATFKDEL

Pilbeam y otros 2018 describieron la construcción de la inmunotoxina biespecífica EGFATFKDEL dirigida contra el EGFR y el receptor del activador de urokinasa tipo plasminogen (uPAR), con la toxina PE38. Esta inmunotoxina es un compuesto biespecífico que demostró ser efectivo en los sarcomas pediátricos.⁽¹¹³⁾

Los autores ensayaron la sensibilidad de ambos tipos de receptores de la IT frente a células de sarcoma (RH30 y TC-71) *in vitro* y en modelos murinos. En ratones desnudos portadores de tumores provenientes de las líneas celulares humanas RH30 y TC-71 se observó una disminución en el tamaño de los tumores con dosis de 5 μg y 10 μg en los animales tratados en comparación con el grupo control y una regresión de los tumores del 67 y 58 %, respectivamente.⁽¹¹³⁾

Los resultados descritos con la IT EGFATFKDEL para el tratamiento de sarcomas pediátricos indican que una inmunotoxina biespecífica que reconoce dos blancos en una misma célula tumoral puede ser más efectiva que una inmunotoxina que reconoce solamente un receptor.⁽¹¹³⁾

Fase clínica

En los últimos diez años se reportan ensayos clínicos en diferentes etapas en tumores de origen hematológico y tumores sólidos (Tabla 2) a pesar de que son

pocas las inmunotoxinas en fase clínica, lo que se debe en gran medida a su toxicidad y baja especificidad.⁽⁷⁴⁾

Un ejemplo es la LMB-100, una RIT compuesta por la toxina truncada de *Pseudomona A* (sin el dominio II) unida a un anticuerpo Fab humanizado que reconoce la glicoproteína mesotelina en la superficie celular de las células cancerosas. Hagerty y Hassan y otros en el 2020 realizaron el estudio fase I en 25 pacientes con dosis desde 40 µg/kg a 250 µg/kg en cuatro ciclos de 21 días. Se informaron efectos secundarios con la Dosis Máxima Tolerada (MDT, por sus siglas en inglés) en 2 de 4 pacientes (síndrome de fuga capilar), así como en 3 de 7 tratados con dosis de 170 µg/kg (aumento de la creatinina). Se acordó una MDT=140 µg/kg, informándose un efecto dosis dependiente en 10 pacientes durante el ciclo 1.^(114,115)

No se informó la aparición de anticuerpos antitoxina (ADA) mediante un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, por sus siglas en inglés) lo que indica que no hay afectación de la actividad de la IT en sangre durante el primer y segundo ciclo del tratamiento. En los ciclos 3 y 4 aumentó el título de anticuerpos ADA, lo que disminuye la LMB-100 en sangre.

Los resultados revelaron que la IT era segura y que sus efectos adversos eran similares en comparación a los de una inmunotoxina llamada SS1P y que fue previamente obtenida mediante la unión de scFv anti-mesotelina y PE38.⁽¹¹⁴⁾ Se destacó que la LMB-100 es capaz de inhibir la producción de anticuerpos ADA durante un tiempo más prolongado que SS1P, ya que estos no aparecieron hasta el tercer ciclo de tratamiento, mientras que en SS1P estaban presentes desde el ciclo uno.⁽¹¹⁴⁾

En el ensayo clínico Fase I, solamente 20 pacientes pudieron ser evaluados, 8 mantuvieron su enfermedad estable, mientras que el resto mostró progresión de la enfermedad tras tres meses de iniciado el tratamiento. Los autores relacionan la baja eficiencia de la IT con su $t_{1/2}$ (53 min) y la dificultad de aumentar el número de dosis debido a la aparición de ADA y sugieren combinar la IT con otros medicamentos como una opción anticancerígena.⁽¹¹⁵⁾

Tabla 2- Inmunotoxinas contra tumores hematológicos y sólidos en fases clínicas reportadas en los últimos diez años (2011-2021)

Inmunotoxina	Blanco	Tipo de tumor	Fase Clínica	Referencias
HuM-195/rGel	CD33	AML,CML, Síndrome mielodisplásico, Gelonina	I	Choudhary y otros; 2011. Becker y Benhar; 2012. Wayne y otros; 2014. Li y otros; 2017. Allahyari y otros; 2017
BL22	CD22	HCL, CLL, ALL, NH	II	Li y otros; 2017
LMB-2	CD25	HCL, ATL	I/II	Li y otros; 2017. Allahyari y otros; 2017. Wayne y otros; 2019. Mazor y Pastan; 2020
Denileukin diftiox (Ontak)	IL-2R, CD25,CD12,CD132,CD33	CTCL, NH, Melanoma, cáncer de ovario, mama y riñón	III/IV	Becker y Benhar; 2012. Wayne y otros; 2014 Li y otros; 2017
Ki-4-dgA	CD30	LH,NH	I/III/III	Choudhary y otros; 2011. Powell y otros; 2014. Li y otros; 2017
A-dmDT390-bisfv (UCHT1)	CD3ε/DT	CTCL, Leucemia	I/II	Becker y Benhar; 2012. Wayne y otros; 2014. Allahyari y otros; 2017
Anti-B4-bR,	CD19	NH-tipo B	II/III	Becker y Benhar; 2012. Li y otros;2017
RFT5-dgA (IMTOX 25)	CD25/CD19	HD,NHL, CTCL,GVHD, aploidenticalSCT	I/II	Choudhary y otros; 2011
VB4-845	Ep-CAM	Carcinoma de células transicionales	I	Li y otros; 2017
MOC31PE	EpCAM/PE	Carcinomas epiteliales	I	Allahyari y otros; 2017
LMB-100	Mesotelina	Mesotelioma	I	Hassan y otros; 2020

SS1(dsFv)PE38(SS1P)	Mesotelina/PE38	Mesotelioma, ovario, cáncer de páncreas	I/II	Choudhary y otros; 2011. Becker y Benhar; 2012. Li y otros; 2017. Allahyari y otros; 2017
---------------------	-----------------	---	------	---

CLL: Leucemia linfocitaria crónica. ALL: Leucemia linfocítica aguda. HCL: Leucemia de células vellosas. LH: Linfoma de Hodgkin. NH: No-Hodgkin. ATL: Leucemia de células T adultas. CTCL: Linfoma cutáneo de células T.

Otra IT con reportes recientes en estudios clínicos es la BL22 (RFB4/PE38) que es una RIT construida a partir del ScFv BFR4 (anticuerpo anti CD22 presente en células B) y la toxina PE38. En la fase I se informó un 65 % de remisión completa tras un solo ciclo de tratamiento con 3-50µg/kg de la IT a los 46 pacientes con malignidades hematológicas que fueron incluidos en el estudio. Durante la fase II se les aplicó una dosis de 40µg/kg a 36 pacientes con tumores hematológicos en el primer ciclo, a los pacientes que no mostraron remisión se les repitió el tratamiento, esta vez con 30µg/kg cada 4 semanas en un período de dos meses. Los resultados mostraron que BL22 presentó actividad significativa frente a HCL, mientras que su respuesta fue limitada en pacientes con los tumores hematológicos CLL, ALL, NH.⁽²²⁾

Mazor y Pastan en el 2020 realizaron pruebas clínicas en fase, I/II y III con la inmunotoxina LMB-2 en pacientes con tumores hematológicos y melanoma para estudiar la diferencia entre las respuestas de ambos tipos de tumores frente a las inmunotoxinas.⁽¹¹⁶⁾ Para las fases I y II se administró la inmunotoxina de forma endovenosa diariamente por 5 días en ciclos de 21 días por 5 ciclos. En la fase III se administró al azar 1 o 2 dosis de LMB-2 durante 5 días seguidos cada 3 semanas, igualmente con un total de 5 ciclos. En los pacientes con tumores sólidos se realizaron estudios en fase I y se aplicaron 30 µg/kg de LMB-2 cada 2 días para un total de tres dosis durante tres semanas.^(74,106,116)

El 17 % de los pacientes con tumores hematológicos desarrollaron anticuerpos ADA en el primer ciclo de la fase II. Mientras que el 92 % de los pacientes con melanoma desarrollaron anticuerpos ADA tras el primer ciclo. Estos resultados muestran una menor respuesta del SI en pacientes con tumores de origen hematológico frente a las IT.⁽¹¹⁶⁾

Inmunotoxinas aprobadas por la Administración de Alimentos y Drogas de U.S (FDA, por sus siglas en inglés)

En los últimos diez años la FDA aprobó cuatro inmunotoxinas: Brentuximab vedotin, Trastuzumab emtansine, Bexxar o Tositumab y Moxetumomab pasudotox (Tabla 3).

La primera inmunotoxina aprobada por la FDA en 1999 fue la Denileukin difitox para el tratamiento de linfoma de células T cutáneo, linfomas de células B no-hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia de linfocitos C, la enfermedad de Graft y células T reguladoras. Esta inmunotoxina fue elaborada mediante técnicas recombinantes con un AcM IL-2 que se une al receptor de Interleukina-2 (IL-2) y un segmento de la toxina diphtérica.^(117,118)

Tabla 3- Inmunotoxinas aprobadas por la FDA (2011-2021)

Nombre	Año	Construcción	Mecanismo de acción	Blanco
Brentuximab vedotin	2011	AcM anti-CD30 conjugado a Monomethylauristatin E (MMAE).	Bloquea la división celular.	Linfoma de Hodgkin refractorio, linfoma de células grandes anaplásico
Trastuzumab emtansine	2013	AcM anti-Her2 conjugado con mertasine (DM1).	Inhibe la vía de señalización de HER2 e internaliza el DM1	Cáncer de mama positivo a HER2
Bexxar/Tositumomab	2013	AcM anti-CD20 conjugados con Indium		Linfoma No-hodgkin
Moxetumomab pasudotox (Lumoxiti)	2018	scFv CD22 conjugada a la extotoxina de troncada PE38.	Reconoce el marcador CD22 de las células B	Leucemia de células vellosas

AcM: Anticuerpo monoclonal.

La inmunotoxina Moxetumomab (Lumoxiti) fue aprobada por la FDA en septiembre del 2018 para el tratamiento de pacientes adultos con leucemia refractaria de células vellosas. La dosis recomendada fue de 0,04 mg/kg y es aplicada por vía intravenosa y con una administración previa de una solución isotónica a los pacientes. Los efectos adversos más comunes fueron edemas, náuseas, fatigas y se asocia con toxicidad renal. Según Raedler y otros en el 2019 la IT posee respuestas duraderas y tolerancias aceptables.⁽¹¹⁹⁾

La IT Trastuzumab emtansine se aprobó en febrero del 2013 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico, siendo la dosis recomendada de

3.6 mg/kg suministrada por vía intravenosa en períodos de tres semanas. Los efectos secundarios más comunes consistían en fatiga, hemorragia, trombosis, dolores de cabeza, entre otros. Un análisis de biomarcadores realizado en el estudio fase III mostró que los pacientes con alta expresión de RNA mensajero de HER 2 desarrollaron una respuesta más favorable ante la IT que aquellos que no expresaron el marcador. ⁽¹²⁰⁾

Tumores sensibles a IT

Las Inmunotoxinas han sido empleadas en tumores sólidos y no sólidos, con mejor respuesta en estos últimos. ⁽¹²¹⁾ Los tumores sólidos pueden presentar poca irrigación sanguínea y células más condensadas lo que dificulta la “ruta de acceso” a las células tumorales individuales, sin embargo, poseen un sistema inmune (SI) tal capaz de mostrar una buena respuesta frente al tratamiento con inmunotoxinas.

En un estudio piloto Hassan y otros en el 2015 reportan una remisión y una inmunosupresión en pacientes con mesotelioma que fueron tratados con la RIT-SSP1 (inmunotoxina recombinante antimesotelina) y lograron modificar las células cancerígenas de forma irreversible, debido a la inactivación del factor-2 de elongación que detiene la síntesis de proteínas. ⁽⁷⁷⁾

Los tumores hematológicos por su parte, parecen responder mejor frente a las inmunotoxinas ya que, las células se encuentran en circulación. *Allahyari* y otros en el 2017 plantea que las inmunotoxinas son muy útiles en el tratamiento de tumores de células del sistema circulatorio que expresan un alto número de proteínas blanco. ⁽⁵⁾ Los pacientes con este tipo de tumor presentan un SI más deprimido, ⁽¹⁶⁾ porque las células implicadas en la respuesta del SI se encuentran comprometidas.

Giansanti y otros en el 2018 reportan que alrededor del 40 % de los pacientes con una variedad de tumores hematológicos responden al tratamiento con inmunotoxinas con toxinas de origen bacteriano o vegetal y que, a pesar de la producción de ADA, pueden someterse a múltiples dosis de las inmunotoxinas. Por el contrario, el 50-100 % de los pacientes con tumores sólidos producen anticuerpos ADA por lo que no pueden recibir más de una dosis única lo que reduce el potencial terapéutico de estos fármacos en este tipo de tumor. Todo esto

puede deberse a una mayor accesibilidad de los tumores hematológicos a las inmunotoxinas y al SI más debilitado del paciente en comparación con los pacientes con tumores sólidos.⁽⁷³⁾

En dependencia de la toxina utilizada la producción de anticuerpos contra la inmunotoxina podría ser superable, ya que al usar inmunoconjugados con actividad desestabilizadora de membranas se podría aumentar la permeabilidad de la membrana de forma selectiva, lo que facilita el acceso de otros agentes quimioterapéuticos con poca capacidad de penetración.⁽¹²²⁾

Estrategias para reducir la citotoxicidad no específica de inmunotoxinas

Las inmunotoxinas, constituyen una herramienta novedosa para combatir el cáncer pero existen desafíos prácticos que limitan el uso clínico. Los ensayos clínicos con inmunotoxinas han reportado efectos secundarios como la inmunogenicidad y el síndrome de fuga vascular.

La inmunogenicidad se refiere a la capacidad de una determinada sustancia de generar una respuesta inmune específica traducido como eventos adversos y en ensayos clínicos con inmunotoxinas se ha observado que el SI activo es capaz de producir ADA capaces de neutralizar las IT lo que se interpreta como un evento secundario.

En ensayos clínicos se han reportado eventos de toxicidad inespecífica en el tratamiento con inmunotoxinas para lo que se desarrollaron distintas estrategias de construcción y métodos de aplicación para disminuir su inmunogenicidad (Tabla 4):

- Disminución de las células T y B del sistema inmune con el uso de drogas inmunomoduladoras como el Rituximab antes de aplicar la inmunotoxina.⁽¹¹⁶⁾
- Utilización de anticuerpos humanizados en la construcción de la inmunotoxina para que el organismo no los identifique como factores no propios.⁽¹¹⁶⁾
- Reducir el tiempo de vida medio en sangre de las IT, para disminuir la inmunogenicidad mediante el empleo de scFv bivalentes que se unen con mayor afinidad a las membranas que su contraparte monovalente.⁽¹²³⁾

- Modificación de toxinas como la obtenida de la Pseudomona⁽¹¹⁶⁾ y algunas actinoporinas⁽⁴⁷⁾ para disminuir las uniones inespecíficas. Se ha modificado, mediante técnicas de biología molecular, la región de reconocimiento a la membrana de estas toxinas para disminuir su toxicidad inespecífica o inactivarlas temporalmente.
- Reducción de la toxicidad inespecífica de la IT mientras llega a la célula blanco con compuestos que se unen a la sección tóxica de la IT mediante un enlace no covalente que se rompe por la acción de proteasas, de manera tal que, una vez acoplada a la membrana celular la toxina se libera en el microambiente tumoral, y esto contribuiría a la disminución de los efectos no-específicos por toxicidad.⁽¹²⁴⁾

Tabla 4- Estrategias para reducir la citotoxicidad no específica de inmunotoxinas. Inmunotoxinas recombinantes mutadas para disminuir su inmunogenicidad

Nombre del fármaco	Blanco	Descripción de la toxina	IC ₅₀ (pm)	Actividad Relativa (%) (Comparada con PE38)	Tipo celular
Moxetumomab	CD22	PE38	3.4	100	CA46
LMB-T19		PE24 con mutaciones en 10 puntos para reducir el enlace de células B y T	3.4	100	
SS1P	Mesothelina	PE38	47.5	100	KLM1
LMB-100/RG7787		Fab humanizado y PE24 con mutaciones en 5 puntos para reducir el enlace de células B	9.9	480	
LMB-2	CD25	PE38	0.07	100	HUT102
Tac-M18-PE24(T)		PE24 enlace C-C y mutaciones en seis puntos para reducir la unión inespecífica	0.7	10	
LMB-75	BCMA	PE24	1.1	100	H929
LMB-273 (T20)		PE24 con mutaciones en 5 puntos para reducir el enlace de células B (excluyendo R494A)	1.1	100	
HN3-PE38	GPC3	PE38	586.0	100	Hep38B
HN3-mPE24		PE24 con mutación en 5 puntos para reducir el enlace de células B	592.0	99	

Fuente: Mazor and Pastan.⁽¹¹⁶⁾

Mutter y otros en el 2018 desarrollaron una inmunotoxina inactiva por métodos recombinantes (S-FraC-Nab-DHFR), con la toxina formadora de poros FraC, unida al nanocuerpo 7d12 anti EGFR y le añadieron un brazo sensible a furina que es una proteasa tumoral (DHFR). Con este mecanismo se logró que la inmunotoxina recuperara su actividad al exponerse a furina. Le introdujeron mutaciones al azar y las mutantes las denominaron como MD-DHFR-FraC que fueron ensayadas en las líneas celulares de carcinoma A431 que no expresaba furina y Calu-6 que expresa furina. La IT mostró actividad frente a Calu-6 ($IC_{50}=146\pm 18,5nM$), pero no con A431b.⁽¹²⁵⁾

La construcción de una inmunotoxina conlleva la adecuada selección del AcM para minimizar el reconocimiento de células normales y reducir la toxicidad no específica. Es igualmente importante la selección de la toxina y se plantea como más conveniente el empleo de actinosporinas, para tumores de difícil acceso. En estos casos, las inmunotoxinas podrían combinarse con agentes quimioterapéuticos para establecer un mecanismo de entrada del fármaco de manera específica y sinérgica para aumentar su acción tóxica y así disponer de un tratamiento que permita disminuir el tamaño de tumores sólidos.

El reconocimiento por el SI de las toxinas en las inmunotoxinas constituye una desventaja al igual que la toxicidad inespecífica por lo que para superar estas limitaciones se han utilizado toxinas truncadas. Además, se han desarrollado estrategias para mejorar la eficacia de las inmunotoxinas con el uso de fragmentos de anticuerpos que disminuye el tamaño de la molécula de la inmunotoxina, mejora la penetración en los tumores, disminuye la inmunogenicidad, aumenta la unión a la molécula blanco y la relación tumor-sangre.

Consideraciones finales

El uso de las inmunotoxinas ha estado en una zona de conflicto en el tratamiento del cáncer, sin embargo los resultados de diversos grupos de trabajo muestran que constituyen una alternativa para superar la toxicidad colateral de los citostáticos y han estimulado un interés en el desarrollo de la terapia dirigida.

Las estrategias para el tratamiento del cáncer con inmunotoxinas aún están en estudio, pues es necesario identificar toxinas más potentes, AcM y sus fragmentos con mayor especificidad, así como establecer los tratamientos específicos para cada paciente y el tipo de tumor.

Referencias bibliográficas

1. National Cancer Institute. Cancer Statistics. United States: NIH; 2020 [acceso 25/08/2020] Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020 [acceso 10/12/2020];70(1):7-30. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21590>
3. López LM, Aloma IA, Sánchez E, Martínez MA, Alonso I, Bess S, *et al.* Anuario Estadístico de salud 2018. Gaceta Oficial de la República de Cuba. 2019;47(59):39-45;55-83.
4. Aloma IA, Sánchez E, Martínez MA, López LM, Alonso I, Bess S, *et al.* Anuario Estadístico de salud 2019. Gaceta Oficial de la República de Cuba. 2020;47(59):39-43;55-65.
5. Allahyari H, Heidari S, Ghamgosha M, Saffarian P, Amani J. Immunotoxin: A new tool for cancer therapy. Tumour Biol. 2017 [acceso 05/01/2021];39(2):1010428317692226. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1010428317692226>
6. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, *et al.* Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. Nature. 2021 [acceso 11/12/2020];6;201. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00572-w.pdf>
7. Suryyadev YY, Kumar VA, Kumar YR, Vimal Y, Piyush Y. Targeted Cancer Therapy. Researcher's Reflection. 2017 [acceso 11/12/2020];1(1):11-7. Disponible en: <http://pgi.edu.in>
8. Ke X, Shen L. Molecular targeted thepaphy of cancer: The progress and future prospect. Frontiers in Laboratory Medicine. 2017;1(2):69-75. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2542364917300596?via%3DiHub>

9. Hwang K, Yoon JH, Lee JH, Lee S. Recent Advances in Monoclonal Antibody Therapy for Colorectal Cancers. *Biomedicines*. 2021 [acceso 03/02/2021];9(1):39. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7824816/pdf/biomedicines-09-00039.pdf>

10. Haefeez U, Parakh S, Gan H, Scott A. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*. 2020 [acceso 15/12/2020];25(20):4764. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/20/4764/html>

11. Biteghe FAN, Chalomie NET, Mungra N, Vignaux G, Gao N, Vergeade A, *et al.* Antibody-Based Immunotherapy: Alternative Approaches for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Biomedicines*. 2020 [acceso 23/10/2020];8(9):327. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/9/327/html>

12. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep*. 2018 [acceso 22/10/2020];45(6):2935-40. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1007/s11033-018-4427-x>

13. Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, Bolognesi A, Polito L. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2018 [acceso 22/10/2020];6(1):19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874676/>

14. Wei J, Bera TK, Liu XF, Zhou Q, Onda M, Ho M, *et al.* Recombinant immunotoxins with albumin-binding domains have long half-lives and high antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 [acceso 07/11/2020];115(15):E3501-E3508. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/pnas/115/15/E3501.full.pdf>

15. Polito L, Djemil A, Bortolotti M. Plant Toxin-Based Immunotoxins for Cancer Therapy: A Short Overview. *Biomedicines*. 2016 [acceso 09/11/2020];4(12):1-9. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/4/2/12/html>

16. Shan L, Liu Y, Wang P. Recombinant Immunotoxin Therapy of Solid Tumors: Challenges and Strategies. *J Basic Clin Med*. 2014 [acceso 12/11/2020];2(2):1-6.

- Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4192646/pdf/nihms581768.pdf>
17. Ghetie V, Vitetta ES. Chemical construction of immunotoxins. *Mol Biotechnol.* 2001;18:251-68. DOI: <https://doi.org/10.1385/MB:18:3:251>
18. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
19. Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins: From Design to Clinical Application. *Biomolecules.* 2021 [acceso 02/12/2021];11(11):1696. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/11/1696/htm>
20. Ávila A, Calderon C, Pérez R, Álvarez I, Pons C, Ortiz A, *et al.* Construction and Biological in vitro evaluation of Immunotoxins by Linking of monoclonal antibodies with a Hemolytic Toxin from a Sea Anemone. *Pharmacologyonline.* 2006 [acceso 15/12/2021];3:384-91. Disponible en: <https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2006/vol3/034.Avila.pdf>
21. Mei X, Chen J, Wang J, Zhu J. Immunotoxins: Targeted Toxin Delivery for Cancer Therapy. *Pharmaceutical Fronts.* 2019;1(01):e33-e45. DOI:10.1055/s-0039-1700507
22. Wang Z, Duran-Struuck R, Crepeau R, Matar A, Hanekamp I, Srinivasan S, *et al.* Development of a Diphtheria Toxin Based Antiporcine CD3 Recombinant Immunotoxin. *Bioconjug Chem.* 2011 [acceso 17/12/2021];22(10):2014-2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3200572/>
23. Antignani A, Ho ECH, Bilotta MT, Qiu R, Sarnvosky R, FitzGerald DJ, *et al.* Targeting receptors on cancer cells with protein toxins. *Biomolecules.* 2020 [acceso 05/01/2021];10(9):1331. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/9/1331/htm>
24. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell.* 1978 [acceso 20/12/2021];15(1):245-250. Disponible en: [https://sci-hub.se/10.1016/0092-8674\(78\)90099-5](https://sci-hub.se/10.1016/0092-8674(78)90099-5)
25. Shafiee F, Aucoin MG, Jahanian-Najafabadi A. Targeted diphtheria toxin-based therapy: a review article. *Front Microbiol.* 2019 [acceso

- 05/01/2021];10:2340. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6813239/>
26. Hamamichi S, Fukuhara T, Hattori N. Immunotoxin screening system: a rapid and direct approach to obtain functional antibodies with internalization capacities. *Toxins*. 2020 [acceso 05/01/2021];12(10):658. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7602748/>
27. Zuppone S, Fabbrini MS, Vago R. Hosts for hostile protein production: the challenge of recombinant immunotoxin expression. *Biomedicines*. 2019 [acceso 07/01/2021];7(2):38. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6630761/>
28. Yap W, Hwang J. Response of Cellular Innate Immunity to Cnidarian Pore-Forming Toxins. *Molecules*. 2018;23(10):2537. DOI:10.3390/molecules23102537
29. Wu T, Zhu J. Recent development and optimization of pseudomonas aeruginosa exotoxin immunotoxins in cancer therapeutic applications. *Int Immunopharmacol*. 2021 [acceso 31/05/2021];96:107759. Disponible en:
<https://sci-hub.se/10.1016/j.intimp.2021.107759>
30. Leshem Y, Pastan I. Pseudomonas exotoxin immunotoxins and anti-tumor immunity: from observations at the patient's bedside to evaluation in preclinical models. *Toxins*. 2019 [acceso 03/02/2021];11(1):20. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356957/>
31. Kreitman RJ, Arons E, Stetler-Stevenson M, Fitzgerald DJP, Wilson WH, Pastan I, *et al*. Recombinant immunotoxins and other therapies for relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011 [acceso 03/02/2021];52(S2):82-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7435070/>
32. Ross WC, Thorpe PE, Cumber AJ, Edwards DC, Hinson CA, Davies AJS, *et al*. Increased toxicity of diphtheria toxin for human lymphoblastoid cells following covalent linkage to anti-(human lymphocyte) globulin or its f(ab')₂ fragment. *Eur J Biochem*. 1980 [acceso 03/02/2021];104(2):381-90. Disponible en:
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04438.x>

33. Foss FM. DAB(389)IL-2 (ONTAK): a novel fusion toxin therapy for lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2000 [acceso 03/02/2021];1(2):110-116. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.3816/clm.2000.n.009>
34. Wawrzynczak EJ. Systemic immunotoxin therapy of cancer: advances and prospects. *Br. J. Cancer*. 1991 [acceso 10/02/2021];64(4):624-30. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1977692/pdf/brjcancer00074-0026.pdf>
35. Jiao P, Zhang J, Dong Y, Wei D, Ren Y. Construction and characterization of the recombinant immunotoxin RTA-4D5-KDEL targeting HER2/neu-positive cancer cells and locating the endoplasmic reticulum. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 [acceso 12/02/2021];102(22):9585-94. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1007/s00253-018-9291-z>
36. Ávila AD, Mateo de Acosta C, Lage A. A New Immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. *Int. J. Cancer*. 1988 [acceso 15/12/2020];42(4):568-71. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1002/ijc.2910420417>
37. Antignani A, Fitzgerald D. Immunotoxins: the role of the toxin. *Toxins*. 2013 [acceso 12/02/2021];5(8):1486-502. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/5/8/1486/htm>
38. Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC, Vitetta ES. Immunotoxins: an update. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:49-71.
39. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J*. 2006 [acceso 20/02/2021];8(3):E532-E51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2761061/>
40. Li Z, Yu T, Zhao P, Ma J. Immunotoxins and Cancer Therapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 2005 [acceso 27/02/2021];2(2):106-12. Disponible en: <http://www.cmi.ustc.edu.cn/2/2/106.pdf>
41. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. *Annu Rev Med*. 2007 ;58:221-37.
42. Mateo C, Ávila A, Rodríguez M, Lage A. Preparación de una inmunotoxina por acoplamiento de un monoclonal contra linfocitos t y una toxina hemolítica de origen marino. *Rev Cubana Oncol*, 1987;3(2):281-90.

43. Ávila A, Mateo C, Lage A. A carcinoembryonic antigen-directed immunotoxin built by linking a monoclonal antibody to a hemolytic toxin. *Int. J. Cancer*. 1989 [acceso 13/05/2021];43(5):926-929. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1002/ijc.2910430533>
44. Ávila A, Calderón C, Pérez R, Álvarez I, Pons C, Ortiz A, *et al.* Construction and Biological in vitro evaluation of immunotoxins by linking of monoclonal antibodies with a haemolytic toxin from a sea anemone. *Pharmacology online*. 2006;3:384-91.
45. Ávila A, Calderón C, Pérez R, Pons C, Pereda C, Ortiz A, *et al.* Construction of an immunotoxin by linking a monoclonal antibody against the human epidermal growth factor receptor and a hemolytic toxin. *Biol Res* 2007;40:173-83.
46. Magadán R, Mateo C, Lage A. Inmunotoxinas. Síntesis y evaluación biológica preliminar de un conjugado AcM anti T3-ricina cadena A. *Biología Aplicada*. 1987 [acceso 31/05/2021];4(3):267-69. Disponible en: <https://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/1987/4/3/p%20267%20-%20269%20.pdf>
47. Tejuca M, Pérez-Barzaga V, Pazos F, Álvarez C, Lanio ME. Construction of sea anemone cytolysin-based immunotoxins for selective killing of cancer cells. *Rev. Cub. Física*. 2009 [acceso 04/04/2021];26(1):15-22. Disponible en: <http://www.revistacubanadefisica.org/RCFextradata/OldFiles/2009/vol.26-No.1/RCF-26-1-2009-15.pdf>
48. Tejuca M, Díaz I, Figueredo R, Roque L, Pazos F, Martínez D, *et al.* Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(6):731-44. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1016/j.intimp.2004.02.010>
49. Tejuca M, Anderluh G, Dalla Serra M. Sea anemone cytolysins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*. 2009 [acceso 04/04/2021];54(8):1206-14. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1016/j.toxicon.2009.02.025>
50. Lee S, Park S, Nguyen TM, Lee E, Kim J, Baek S, *et al.* A chemical conjugate between HER2-targeting antibody fragment and Pseudomonas exotoxin A fragment demonstrates cytotoxic effects on HER2-expressing breast cancer cells.

BMB Reports. 2019 [acceso 07/04/2021];52(8):496-501. Disponible en: https://www.bmbreports.org/journal/download_pdf.php?doi=10.5483/BMBRep.2019.52.8.250

51. Vitetta ES, Krolick KA, Miyama-Inaba M, Cushley W, Uhr JW. Immunotoxins: a new approach to cancer therapy. Science. 1983 [acceso 12/02/2020];219(4585):644-50. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.2307/1690510>

52. Mahmoudi R, Dianat-Moghadam H, Poorebrahim M. Recombinant immunotoxins development for HER2-based targeted cancer therapies. Cancer Cell International. 2021 [acceso 09/08/2021];21(1):470. Disponible en: <https://cancer-ci.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12935-021-02182-6.pdf>

53. Shan L, Liu Y, Wang P. Recombinant Immunotoxin Therapy of Solid Tumors: Challenges and Strategies. J Basic Clin Med. 2013 [acceso 01/03/2021];2(2):1-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4192646/pdf/nihms581768.pdf>

54. Sanz L, Ibáñez-Pérez R, Guerrero-Ochoa P, Lacadena J, Anel A. Antibody-Based Immunotoxins for Colorectal Cancer Therapy. Biomedicines. 2021 [acceso 20/11/2021];9(11):1729. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/11/1729/htm>

55. Kim JS, Jun SY, Kim YS. Critical Issues in the Development of Immunotoxins for Anticancer Therapy. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020 [acceso 05/03/2021];109(1):104-115. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354919306744?via%3DiHub>

56. Alewine C, Hassan R, Pastan I. Advances in anticancer immunotoxin therapy. Oncologist. 2015 [acceso 05/03/2021];20(2):176-85. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4319635/>

57. Li M, Liu ZS, Liu XL, Hui Q, Lu SY, Qu LL, *et al.* Clinical targeting recombinant immunotoxins for cancer therapy. Onco Targets Ther. 2017;10:3645-3665. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5530862/>

58. Ruiz de la Herrán J, Tomé-Amat J, Lázaro Gorines R, Gavilanes JG, Lacadena J. Inclusion of a Furin Cleavage Site Enhances Antitumor Efficacy against Colorectal Cancer Cells of Ribotoxin- α -Sarcin- or RNase T1-Based Immunotoxins. *Toxins*. 2019;11(10):593. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/10/593/htm>
59. Pirzer T, Becher KS, Rieker M, Meckel T, Mootz HD, Kolmar H, *et al.* Generation of Potent Anti-HER1/2 Immunotoxins by Protein Ligation Using Split Inteins. *ACS Chemical Biology*. 2018 [acceso 09/03/2021];13(8):2058-66. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1021/acscchembio.8b00222>
60. Ayala Vargas C. Los camélidos sudamericanos. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria de Recursos Naturales*. 2018 [acceso 07/03/2021];15(Especial). Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182018000300003&lng=es&nrm=iso
61. Dhillon S. Moxetumomab Pasudotox: First Global Approval. *Drugs*. 2018 [acceso 12/04/2021];78(16):1763-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323103/>
62. Zhu S, Liu Y, Wang PC, Gu X, Shan L. Recombinant Immunotoxin Therapy of Glioblastoma: Smart Design, Key Findings, and Specific Challenges. *Bio Med Research International*. 2017 [acceso 12/05/2021]; 2017. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/7929286/>
63. Ruiz de la Herrán J. Diseño de variantes optimizadas de inmunotoxinas basadas en ribonucleasas fúngicas: efecto antitumoral in vitro e in vivo [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. 2021 [acceso 21/09/2021]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/66069/1/T42478.pdf>
64. Jones TD, Hearn AR, Holgate RGE, Kozub D, Fogg MH, *et al.* A deimmunised form of the ribotoxin, α -sarcin, lacking CD4+T cell epitopes and its use as an immunotoxin warhead. *Protein Engineering Design and Selection*. 2016 [acceso 01/06/2021];29(11):531-40. Disponible en: <https://academic.oup.com/peds/article/29/11/531/2462506>

65. Ibáñez Pérez R, Guerrero Ochoa P, Al Wasaby S, Navarro R, Tapia Galisteo A, Miguel D, *et al.* Anti-tumoral potente of human granulysin-based, CEA-targeted cytotoxic immunotoxin. *Onco Immunology*. 2019 [acceso 01/06/2021];8(11):1641392. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2019.1641392>
66. Rust A, Partridge LJ, Davletov B, Hautbergue GM. The Use of Plant-Derived Ribosome Inactivating Proteins in Immunotoxin Development: Past, Present and Future Generations. *Toxins*. 2017 [acceso 07/06/2021]; 9(11):344. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5705959/>
67. Fleming BD, Ho M. Development of Glypican-3 Targeting Immunotoxins for the Treatment of Liver Cancer: An Update. *Biomolecules*. 2020 [acceso 07/06/2021];10(6):934. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/6/934/htm>
68. Słomińska-Wojewódzka M, Sandvig K. Ricin and Ricin-Containing Immunotoxins: Insights into Intracellular Transport and Mechanism of action in Vitro. *Antibodies*. 2013 [acceso 30/08/2021];2(2):236-69. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4468/2/2/236/htm>
70. Zuppone S, Assalini C, Minici C, Bertagnoli S, Branduardi P, Degano M, *et al.* The anti-tumoral potential of the saporin-based uPAR-targeting chimera ATF-SAP. *Sci Rep*. 2020 [acceso 18/07/2021]; 10(1):2521. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7018701/>
71. Lord JM, Roberts LM, Robertus JD. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *The FASEB Journal*. 1994 [acceso 20/07/2021];8:201-8. Disponible en: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fasebj.8.2.8119491>
72. Hayoun MA, Kong EL, Smith ME, King KC. Ricin Toxicity. *StatPearls*. 2021 [acceso 07/08/2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441948/>
73. Lin Y, Xu L, Li Y, Wu X, Liu Y. Ribosome-Inactivating Proteins of *Bougainvillea glabra* Uncovered Polymorphism and Active Site Divergence. *Toxins*. 2021 [acceso 02/07/2021];13(5):331. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/5/331/htm>

74. Giansanti F, Flavell D, Angelucci F, Fabbrini M, Ippoliti R. Strategies to Improve the Clinical Utility of Saporin-Based Targeted Toxins. *Toxins*. 2018 [acceso 09/08/2021];10(2):82. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/10/2/82/htm>
75. Wayne AS, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ, Pastan I. Immunotoxins for leukemia. *Blood*. 2014 [acceso 19/08/2021];123(16):2470-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3990911/>
76. Mei X, Chen J, Wang J, Zhu J. Immunotoxin: Targeted Toxin Delivery for Cancer Therapy. *Pharmaceut Front*. 2019 [acceso 17/08/2021];1(1):33-45. Disponible en: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-0039-1700507>
77. Michalska M, Wolf P. Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol*. 2015 [acceso 12/08/2021];6:963. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4584936/>
78. Chandramohan V, Sampson JH, Pastan IH, Bigner DD. Immunotoxin Therapy for Brain Tumors. In: Sampson JH (ed). *Translational Immunotherapy of Brain Tumors*. ScienceDirect. 2017 [acceso 20/08/2021]:227-60. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128024201000107?via%3Dihub>
79. Sokolova E, Guryev E, Yuditsev A, Vodeneev V, Deyev S, Balalaeva I, *et al*. HER2-specific recombinant immunotoxin 4D5scFv-PE40 passes through retrograde trafficking route and forces cells to enter apoptosis. *Oncotarget*. 2017 [acceso 12/08/2021];8(13):22048-58. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5400645/>
80. Dieffenbach M, Pastan I. Mechanisms of Resistance to Immunotoxins Containing Pseudomonas Exotoxin A in Cancer Therapy. *Biomolecules*. 2020 [acceso 25/08/2021];10(7):979. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7408526/>
81. Hu B, Guo W, Wang LH, Wang JG, Liu XY, Jiao BH, *et al*. Purification and characterization of gigantoxin-4, a new actinoporin from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *Int J Biol Sci*. 2011 [acceso 20/08/2021];7(6):729-39. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119845/>

82. García-Ortega L, Alegre-Cebolla J, García-Linales S, Bruix M, Martínez-del-Pozo A, Gavilanes JG, *et al.* The behavior of sea anemone actinoporins at the water-membrane interface. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011 [acceso 06/09/2021];1808(9):2275-2288. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273611001465?via%3DiHub>
83. Zahaf NI, Schmidt G. Bacterial Toxins for Cancer Therapy. *Toxins*. 2017 [acceso 02/09/2021];9(8):236. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/9/8/236/htm>
84. Febles CS, Esperón LL, Alvarado-Mesén J, Álvarez FLI, Yglesias A, Rodríguez H, *et al.* Cell death mechanisms induced by pore forming toxins with special focus on actinoporins. *Rev Cubana de Ciencias Biológicas*. 2020 [acceso 02/09/2021];8(2):1-22. Disponible en: <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/download/311/369>
85. Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, Tejuca M, Pazos F, Lanio ME, *et al.* Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon*. 2009 [acceso 06/09/2021];54(8):1135-47. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109001330?via%3DiHub>
86. Galloso HM, Oduardo AP. Modelos de formación de poros de las actinoporinas, citolisinas producidas por anémonas marinas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 2016 [acceso 12/09/2021];5(2):1-15. Disponible en: <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/download/154/263>
87. Álvarez C, Ros U, Valle A, Pedrera L, Soto C, Hervis YP, *et al.* Biophysical and biochemical strategies to understand membrane binding and pore formation by sticholysins, pore-forming proteins from a sea anemone. *Biophys Rev*. 2017 [acceso 02/09/2021];9(5):529-544. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5662052/>
88. Leychenko E, Isaeva M, Tkacheva E, Zelepuga E, Kvetkina A, Guzev K, *et al.* Multigene Family of Pore-Forming Toxins from Sea Anemone *Heteractis crispata*.

- Mar. Drugs. 2018 [acceso 15/09/2021];16(6):183. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/16/6/183/htm>
89. Attimarad SL, Gaviraj EN, Nagesh C, Kugaji MS, Sutar RS. Screening, Isolation and Purification of Antibiotics(s) from Marine Actinomycetes. International Journal of Research. 2012 [acceso 06/03/2021];3(3):447-53. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281787350_Screening_isolation_and_purification_of_antibiotics_from_marine_actinomycetes
90. Caaveiro JMM, Tsumoto K. Molecular basis for the activation of actinoporins by lipids. Methods Enzymol. 2021 [acceso 06/08/2021];649:277-306. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687921000306?via%3Dihub>
91. Pazos IF, Martínez D, Tejuca M, Valle A, del Pozo A, Álvarez C, *et al.* Comparison of pore-forming ability in membranes of a native and a recombinant variant of Sticholysin II from Stichodactyla helianthus. Toxicon. 2003;42(6):571-8. Disponible en: [https://sci-hub.se/10.1016/s0041-0101\(03\)00227-7](https://sci-hub.se/10.1016/s0041-0101(03)00227-7)
92. Alvarado Mesén J, Solano Campos F, Canet L, Pedrera L, Hervis YP, Soto C, *et al.* Cloning, purification and characterization of nigrelysin, a novel actinoporin from the sea anemone Anthopleura nigrescens. Biochimie. 2019;156:206-23. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908418302086?via%3Dihub>
93. Ramírez Carreto S, Pérez García EI, Salazar García SI, Bernáldez Sarabia J, Licea Navarro A, Rudiño Piñera E, *et al.* Identification of a pore-forming protein from sea anemone Anthopleura dowii Verrill (1869) venom by mass spectrometry. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2019 [acceso 02/10/2021];25:e147418. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483413/>
94. Antonini V, Pérez-Barzaga V, Bampi S, Pentón D, Martínez D, Dalla Serra M, *et al.* Functional characterization of sticholysin I and W111C mutant reveals the sequence of the actinoporin's pore assembly. PLoS One. 2014 [acceso 02/10/2021];9(10):e110824. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110824>

95. Castillo A, Mesa H, Cabezas S, Valiente PA, Pazos IP, Álvarez CM, *et al.* StIIIR124C: un nuevo mutante para la caracterización del mecanismo de formación de poros de Sticholisina II en células. Rev Cubana de Ciencias Biológicas. 2018 [acceso 03/10/2021];6(1):1-10. Disponible en: <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/download/218/304>
96. Valle A, Pérez-Socas LB, Canet L, Hervis YP, de Armas-Guitart G, Martins-de-Sa D, *et al.* Self-homodimerization of an actinoporin by disulfide bridging reveals implications for their structure and pore formation. Sci Rep. 2018;8(1):6614. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24688-2>
97. Del Valle A, Acosta-Rivero N, Laborde RJ, Cruz-Leal Y, Cabezas S, Luzardo MC, *et al.* Sticholysin II shows similar immunostimulatory properties to LLO stimulating dendritic cells and MHC-I restricted T cell responses of heterologous antigen. Toxicon. 2021 [acceso 23/10/2021];200:38-47. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1016/j.toxicon.2021.06.020>
98. Laborde RJ, Ishimura ME, Abreu-Butin L, Nogueira CV, Grubaugh D, Cruz-Leal Y, *et al.* Sticholysins, pore-forming proteins from a marine anemone can induce maturation of dendritic cells through a TLR4 dependent-pathway. Mol Immunol. 2021 [acceso 08/10/2021];131:144-54. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1016/j.molimm.2020.12.032>
99. Rivera-de-Torre E, Palacios-Ortega J, Garb JE, Slotte JP, Gavilanes JG, Martínez-Del-Pozo Á, *et al.* Structural and functional characterization of sticholysin III: A newly discovered actinoporin within the venom of the sea anemone Stichodactyla helianthus. Arch Biochem Biophys. 2020;689:108435. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986120304446?via%3Dihub>
100. Lv X, Zhang J, Xu R, Dong Y, Sun A, Shen Y, *et al.* Gigantoxin-4-4D5 scFv is a novel recombinant immunotoxin with specific toxicity against HER2/neu-positive ovarian carcinoma cells. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 [acceso 10/10/2021];100(14):6403-6413. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7487-7>

101. Ronellenfitch MW, Luger AL, Steinbach JP. EGFR and mTOR as therapeutic targets in glioblastoma. *Oncotarget*. 2019 [acceso 07/10/2021];10(46):4721-4723. Disponible en: <https://www.oncotarget.com/article/27094/pdf/>
102. Wang J, Xu B. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2019 [acceso 08/10/2021];4:34. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-019-0069-2>
103. Ntellas P, Mavroeidis L, Gkoura S, Gazouli I, Amylidi AL, Papadaki A, *et al*. Old Player-New Tricks: Non Angiogenic Effects of the VEGF/VEGFR Pathway in Cancer. *Cancers*. 2020 [acceso 23/10/2021];12(11):3145. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3145/htm>
104. Murer P, Plüss L, Neri D. A novel human monoclonal antibody specific to the A33 glycoprotein recognizes colorectal cancer and inhibits metastasis. *MAbs*. 2020 [acceso 15/10/2021];12(1):1714371. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420862.2020.1714371>
105. Fuenmayor J, Hoyos RG, Montaña RF. Anticuerpos Monoclonales en el Tratamiento del Cancer. *Terapia Dirigida para Tumores Sólidos. Rev Venez Oncol*. 2013 [acceso 12/10/2021];25(4):236-254. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3756/375634881005.pdf>
106. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cáncer immunotherapy. *Molecular Biology Reports*. 2018 [acceso 14/10/2021];45(6):2935-2940. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30311129/>
107. Becker N, Benhar I. Antibody-Based Immunotoxins for the Treatment of Cancer. *Antibodies*. 2012 [acceso 08/09/2021];1(1):39-69. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4468/1/1/39/htm>
108. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*. 2020 [acceso 10/10/2021];9(3):34. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4468/9/3/34/htm>
109. Creus N, Massó J, Codina C, Ribas J. Anticuerpos monoclonales en Oncología. Madrid: Farmacia Hospitalaria. 2002;26(1):28-43.

110. Cao Y, Marks JD, Marks JW, Cheung LH, Kim S, Rosenblum MG, *et al.* Construction and Characterization of Novel, Recombinant Immunotoxins Targeting the Her2/neu Oncogene Product: *in vitro* and *in vivo* Studies. *Cancer Research*, 2009;69(23):8987-95. DOI:10.1158/0008-5472.can-09-2693.
111. Hajighasemlou S, Alebouyeh M, Rastegar H, Taghizadeh M, Mirmoghtadaei M. Preparation of Immunotoxin Herceptin-Botulinum and Killing Effects on Two Breast Cancer Cell Lines, *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):5977-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5977>
112. Hassan R, Alewine C, Pastan I. New Life for Immunotoxin Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2015;22(5):1055-8. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-15-1623
113. Andersson Y, Haavardtun SI, Davidson B, Dorum A, Fleten KF. MOC31PE immunotoxin - targeting peritoneal metastasis from epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017 [acceso 23/10/2021];8(37):61800-9. Disponible en: www.impactjournals.com/oncotarget
114. Pilbeam K, Wang H, Taras E, Bergerson RJ, Etestad B, *et al.* Targeting pediatric sarcoma with a bispecific ligand immunotoxin targeting urokinase and epidermal growth factor receptors. *Oncotarget*. 2018 [acceso 17/09/2021];9(15):11938-47. Disponible en: www.impactjournals.com/oncotarget/
115. Hagerty BL, Pegna GJ, Xu J, Tai CH, Alewine C. Mesothelin-Targeted Recombinant Immunotoxins for Solid Tumors. *Biomolecules*. 2020;10(7):973. DOI:10.3390/biom10070973
116. Hassan R, Alewine C, Mian I, Spreafico A, Siu LL, Gomez-Roca C, *et al.* Phase 1 study of the immunotoxin LMB-100 in patients with mesothelioma and other solid tumors expressing mesothelin. *Cancer*. 2020;126(22):4936-47. DOI:10.1002/cncr.33145
117. Mazor R, Pastan, I. Immunogenicity of Immunotoxins Containing Pseudomonas Exotoxin A: Causes, Consequences, and Mitigation. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1261. DOI:10.3389/fimmu.2020.01261
118. Akbari B, Farajnia S, Ahdi Khosroshahi S, Safari F, Yousefi M. Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. *International Reviews of Immunology*. 2017 [acceso 13/10/2021];36(4):207-219. DOI:10.1080/08830185.2017.1284211

119. Duvic M. Optimizing denileukin diftitox (Ontak) therapy. Haematological reports. 2006;2(13):57-60.
120. Raedler L. Lumoxiti (Moxetumomab Pasudotox-tdfk) First CD22-Directed Cytotoxin Approved for Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. American Health&DrugBenefits. 2019;12:52-4.
121. Raedler L. Kadcyca (Ado-TrastuzumabEmtansine): First Antibody-Drug Conjugate Approved for the Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. American Health & Drug Benefits. 2014;7:110-4.
122. Pranchevicius MCS, Vieira T. R. Production of recombinant immunotherapeutics for anticancer treatment. Bioengineered. 2013;4(5):305-12. DOI:10.4161/bioe.24666
123. Galstyan A, Markman JL, Shatalova ES, Chiechi A, Korman AJ, Patil R, *et al.* Blood-brainbarrier permeable nano immunoconjugates induce local immune responses for glioma therapy. NatureCommunications. 2019;10(1):3850. DOI:10.1038/s41467-019-11719-3
124. Hetzel C, Bachran C, Tur M, Fuchs H, Stocker M. Improved Immunotoxins with Novel Functional Elements. Current Pharmaceutical Design. 2009;15(23):2700-11. DOI:10.2174/138161209788923930
125. Potrich C, Tomazzolli R, Dalla Serra M, Anderluh G, Malovrh P. Cytotoxic Activity of a Tumor Protease-Activated Pore-Forming Toxin. Bioconjugate Chemistry. 2005;16(2):369-76. DOI:10.1021/bc049873z
126. Mutter NL, Soskine M, Huang G, Albuquerque IS, Bernardes GJL, Maglia G, *et al.* Modular pore-forming immunotoxins with caged cytotoxicity tailored by directed evolution. ACS Chemical Biology. 2018;13(11):3153-60. DOI:10.1021/acscchembio.8b00720

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.