

Títol del treball: Onconase, a ribonuclease with antitumor and antiviral properties

Estudiant: Núria Viñolas Miquel

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1945303@campus.udg.edu

Tutor: Dra. Maria Vilanova Bruges

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Maria Vilanova
Brugués - DNI
40461329M (TCAT)

Firmado digitalmente por Maria Vilanova
Brugués - DNI 40461329M (TCAT)
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
o=Universitat de Girona, 2.5.4.97=VATES-
Q6750002E, ou=Empleat públic de nivell
mig, sn=Vilanova Brugués - DNI 40461329M,
givenName=Maria,
serialNumber=dDCES-40461329M, cn=Maria
Vilanova Brugués - DNI 40461329M (TCAT)
Fecha: 2021.05.19 12:39:31 +02'00'

Nom del tutor: Dra. Maria Vilanova Bruges

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): maria.vilanova@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 27/05/2021

Resum

Aquest treball de recerca tracta sobre l'enzim anomenat onconasa. És una ribonucleasa (RNasa) que pertany a la superfamília de les ribonucleases pancreàtiques i que actualment s'està utilitzant en assaigs clínics com a agent antitumoral i antiviral. L'objectiu principal d'aquest treball és conèixer els mecanismes moleculars pels quals l'onconasa actua sobre les cèl·lules i la seva utilització com a agent antiviral i antitumoral. Prèviament, s'ha estudiat la seva estructura molecular ja que és diferent a la d'altres ribonucleases de la seva mateixa família, fet que li confereix elevada estabilitat. Es descriu el mecanisme molecular pel qual té activitat citotòxica selectiva per cèl·lules tumorals, la hipòtesi que es proposa per explicar la seva arribada al citosol, el procés de degradació de RNA i la inducció d'apoptosi de cèl·lules tumorals. S'ha de tenir en compte que l'onconasa no produeix apoptosi només produint degradació de RNA, sinó que també pot induir la sobre-expressió de determinats RNAs la qual cosa indica que la seva citotoxicitat no es pot explicar només per una aturada del procés de síntesi proteica deguda a la degradació de diferents RNAs. Com a agent antiviral, es descriu el mecanisme a partir del qual produeix la degradació de RNA viral o elements que són necessaris per a la replicació viral, i es comenten casos particulars de determinats virus en els quals l'onconasa ha mostrat eficàcia, així com les hipòtesis que expliquen l'eliminació de cèl·lules que han estat infectades per virus. Com a agent antitumoral, s'analitza la capacitat que presenta d'amplificar l'acció de determinats compostos utilitzats actualment com a agents quimioterapèutics per a combatre determinats tipus de càncers. Per tant, tot i que el mecanisme d'aquest enzim no és completament conegut, s'ha observat que presenta elevada efectivitat contra l'acció de virus (com el virus de la immunodeficiència humana, el virus del papil·loma humà o el virus de la ràbia) i de cèl·lules tumorals. En el cas de les cèl·lules tumorals, com que l'onconasa és una ribonucleasa, no és genotòxica, és a dir, no actua sobre el DNA i per tant, no provoca mutacions (els fàrmacs que actuen sobre el DNA poden ser mutagènics i produir l'aparició de nous càncers). Per tots aquests motius, l'onconasa pot arribar a ser un fàrmac altament efectiu.

Resumen

Este trabajo de búsqueda trata sobre la enzima nombrada onconasa. Es una ribonucleasa (RNasa) que forma parte de la superfamilia de las ribonucleasas pancreáticas y que actualmente se está utilizando en ensayos clínicos como agente antitumoral y antiviral. El objetivo principal de este trabajo es conocer los mecanismos moleculares a través de los cuales la onconasa actúa sobre las células y su uso como agente antiviral y antitumoral. Previamente, se ha estudiado su estructura molecular ya que es diferente a la de otras ribonucleasas de su misma familia, hecho que le confiere elevada estabilidad. Se describe el mecanismo molecular por el cual tiene actividad citotóxica selectiva para células tumorales, la hipótesis que se propone para explicar su llegada al citoplasma, el proceso de degradación de RNA i la inducción de apoptosis de células tumorales. Se tiene que tener en cuenta que la onconasa no produce apoptosis solo produciendo degradación de RNA, sino que también puede inducir la sobreexpresión de determinados RNAs la cual cosa indica que su citotoxicidad no se puede explicar solo por una parada del proceso de síntesis proteica debida a la degradación de diferentes RNAs. Como agente antiviral, se describe el mecanismo a partir del cual se produce la degradación de RNA viral o elementos que son necesarios para la replicación viral, y se comentan casos particulares de ciertos virus en los cuales la onconasa ha mostrado eficacia, así como las hipótesis que explican la eliminación de células que han estado infectadas por virus. Como agente antitumoral, se analiza la capacidad que presenta de amplificar la acción de determinados compuestos utilizados actualmente como agentes quimioterapéuticos para combatir determinados tipos de cánceres. Por lo tanto, aunque el mecanismo de esta enzima no es completamente conocido, se ha observado que presenta elevada efectividad contra la acción de virus (como el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del papiloma humano o el virus de la rabia) i de células tumorales. En el caso de las células tumorales, como la onconasa es una ribonucleasa, no es genotóxica, es decir, no actúa sobre el DNA, y por tanto, no provoca mutaciones (los fármacos que actúan sobre el DNA pueden ser mutagénicos y producir la aparición de nuevos cánceres). Por todos estos motivos, la onconasa puede llegar a ser un fármaco altamente efectivo.

Abstract

This research work is about the enzyme onconase. It's a ribonuclease (RNase) that belongs to the superfamily of pancreatic ribonucleases and that at present is used in clinical trials as antitumoral and antiviral agent. The main objective of this work is to describe the molecular mechanisms that are responsible for the antiviral and antitumor activities of onconasa. First, its molecular structure is described because it is different from that presented by other ribonucleases of the same family. This 3D-structure endows onconasa with a high stability. It is described the molecular mechanism that likely explain its selective cytotoxicity for tumor cells and for cells infected by different virus. In addition, it is discussed the hypothesis that explain its translocation to the cytosol, the process of RNA degradation and the induction of apoptosis of tumor cells. It is important to remark that onconase does not produce apoptosis only by arresting protein synthesis due to a degradation of different RNAs. It is described that onconase also induces the overexpression of certain RNAs, suggesting that other mechanism are involved in the apoptosis induced by this enzyme. As antiviral agent, it is described the mechanism that onconase uses to degrade viral RNA or the necessary elements for viral replication. Moreover, it is discussed some particular cases of specific viruses that are efficiently affected by onconase. As antitumor agent, it is analyzed the capacity of onconase to amplify the action of certain compounds that are used as chemotherapeutics agents to fight certain types of cancers, i.e., its synergy with these antitumor agents. Although the mechanism of this enzyme is not completely known, it has been observed to be highly effective against the action of some viruses (such as human immunodeficiency virus, human papilloma virus or rabies virus) and tumor cells. Because onconase is a ribonuclease, it doesn't act on DNA and does not cause mutations (drugs that act on DNA can be mutagenic and produce the appearance of cancers) i.e., it is not genotoxic. For all these reasons, onconase can become a highly effective drug.

Índex

1. Introducció
2. Objectius
3. Metodologia
4. Resultats i discussió
 - 4.1. Estructura molecular
 - 4.2. Mecanisme molecular com a fàrmac
 - 4.2.1. Interacció i internalització dins la cèl·lula
 - 4.2.2. Degradació de l'RNA intracel·lular
 - 4.2.3. Inducció de l'apoptosi
 - 4.3. Utilització de l'onconasa com a agent antiviral
 - 4.4. Utilització de l'onconasa com a agent antitumoral
5. Ètica i sostenibilitat
6. Conclusions
7. Bibliografia

1. Introducció

La medicina i la utilització de determinats fàrmacs ha permès, després de variis estudis i experiments, conferir solucions a certes malalties. El que s'ha intentat trobar, des de fa molts anys, és una cura pel càncer o una manera d'eliminar virus que causen infeccions, com ara el virus de la immunodeficiència humana (VIH). En un futur, una possible solució a aquests problemes podria ser la proteïna anomenada onconasa, ja que podria actuar com a fàrmac, però en aquest cas, sense actuar sobre el DNA, sinó degradant l'RNA, inhibint la síntesi de proteïnes i produint apoptosi de cèl·lules tumorals o de cèl·lules infectades per virus.

L'onconasa, coneguda també com a ranpirnasa, pannon o proteïna P-30, és una endoribonucleasa de tipus III, de baix pes molecular, capaç de degradar RNA i que presenta activitat antiviral i antitumoral. Aquest enzim pertany a la superfamília de ribonucleases pancreàtiques (entre les quals la ribonucleasa de pàncrees boví o RNasa A és el referent), i s'aïlla dels oòcits o embrions de la granota *Rana pipiens*. Es sintetitza en el fetge d'aquesta granota de manera estacional, s'allibera a la sang i es diposita en els oòcits (Lee i Raines, 2008).

Inicialment va ser aïllada l'any 1991 com una proteïna bàsica que presentava activitat antiproliferativa o citotòxica *in vitro* contra línies cel·lulars tumorals (Hodge *et al.*, 2016).

Com a agent antiviral, s'ha vist que presenta eficàcia contra l'Ebola (Hodge *et al.*, 2016), contra infeccions provocades pel virus del papil·loma *in vivo* (Squiquera *et al.*, 2017), i contra infeccions provocades pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) *in vitro* (Saxena *et al.*, 1996). En cèl·lules infectades pel VIH l'onconasa actua inhibint la replicació dels virions, sense interferir en l'expressió gènica d'aquestes cèl·lules (Brand *et al.* 2018).

Com a agent antitumoral, l'onconasa ja s'ha utilitzat en estudis clínics en fase II, en els quals s'avalua si el tractament que s'ha proposat és eficaç (es pot realitzar en cas que en la fase I s'hagi determinat que és segur), per tractar el mesotelioma (tipus de càncer maligne que es produeix al mesoteli, capa prima de teixit que recobreix la majoria d'òrgans), el càncer de pit, el càncer de pulmó i el càncer de cèl·lules renals. S'ha determinat que la dosi de màxima tolerància (MTD) (dosi més elevada d'un medicament o tractament que no provoca efectes secundaris) de la onconasa és de 960 µg/m², amb la dosi de toxicitat limitant (DLT) (efectes secundaris que provoca un medicament o tractament) caracteritzada per proteïnúria amb o sense azotèmia, edema perifèric i fatiga (Costanzi, Sidransky, Navon i Goldsweig, 2005).

També ha arribat a fase III, en la qual s'analitza si el nou tractament és més efectiu que el tractament convencional, i s'ha combinat l'onconasa amb doxorubicina (fàrmac utilitzat durant la quimioteràpia de càncer) en persones que presenten mesotelioma (Costanzi *et al.*, 2005).

Estructuralment, la ranpirnasa és una cadena proteica simple i està formada per 104 aminoàcids. El seu pes molecular és de 11.820 Da (Lee i Raines, 2008), i és estable i resistent a la proteòlisis. Aquesta presenta un 30% d'homologia de seqüència amb la RNasa A (Ardelt, Mikulski i Shogen, 1991) i una estructura molt similar (Mosimann, Ardel i James, 1994).

L'onconasa és resistent a la proteòlisis degut a la seva estructura, i també és resistent a inhibidors de ribonucleases que es troben en el citoplasma en els mamífers (Hodge *et al.*, 2016); conseqüentment, presenta activitat degradativa de RNAs quan entra dins les cèl·lules de mamífers, i per tant, també en els humans. Aquest fet, junt amb la seva capacitat de degradar RNA de doble cadena (Saxena, Saxena i Shogen, 2009) explica la seva citotoxicitat, i també que es pugui utilitzar com a fàrmac antiviral i antitumoral.

Una altra avantatge és la seva elevada termoestabilitat. La seva temperatura de fusió és de 87°C (Lee i Raines, 2008) i determinats estudis demostren que podria esdevenir més activa en temperatures per sobre de la temperatura corporal humana. Per tant, presenta propietats millorades respecte altres RNases de la seva mateixa família, ja que és més termoestable i més resistent a la proteòlisi (Hodge *et al.*, 2016).

A banda dels seus avantatges bioquímics i estructurals, és fàcil d'obtenir i, conseqüentment, si s'administrés com a fàrmac, es podria produir en grans quantitats i de manera eficaç (Hodge *et al.*, 2016).

Tot i que el mecanisme a partir del qual actua l'onconasa no es coneix molt, se sap que consisteix en introduir-se a l'interior de la cèl·lula, degradar l'RNA intracel·lular (pot degradar diferents tipus de RNAs cel·lulars) i inhibir la síntesi proteica, però s'ha observat que aquesta inhibició no és l'únic mecanisme emprat per l'onconasa per induir la mort cel·lular (Jordanov *et al.*, 2000).

També s'ha pogut determinar que s'uneix a la membrana plasmàtica de cèl·lules sensibles amb elevada afinitat, i en els tractaments clínics, l'onconasa presenta una baixa toxicitat; no es coneix molt bé perquè les cèl·lules tumorals són més sensibles a aquest enzim que les normals, però

existeixen certes hipòtesis. Una explicació es basa en el fet que l'onconasa és una proteïna bàsica (carregada positivament), i les membranes de les cèl·lules tumorals estan carregades negativament de manera més elevada que les no tumorals (Deptala *et al.*, 1998).

Un altre procés que no es coneix profundament és l'entrada d'aquesta dins la cèl·lula, ja que la ranpirnasa és altament hidrofílica, i ha de travessar la bicapa lipídica (hidrofòbica) (Lee i Raines, 2008).

Per tant, tot i ser una proteïna amb propietats interessants pel que fa a la medicina, encara manquen molts coneixements sobre aquesta, i sobre com duu a terme el seu mecanisme d'acció com a fàrmac.

És important destacar que l'onconasa no és una proteïna nova, sinó que ja fa uns anys que s'estudia. Es pot observar a la Figura 1, en què es representa gràficament el nombre de resultats obtinguts en el cercador de Pubmed. S'observen lleugeres diferències en el nombre de resultats si la cerca es correspon a "ranpirnase" (sinònim de onconasa) a la Figura 2.

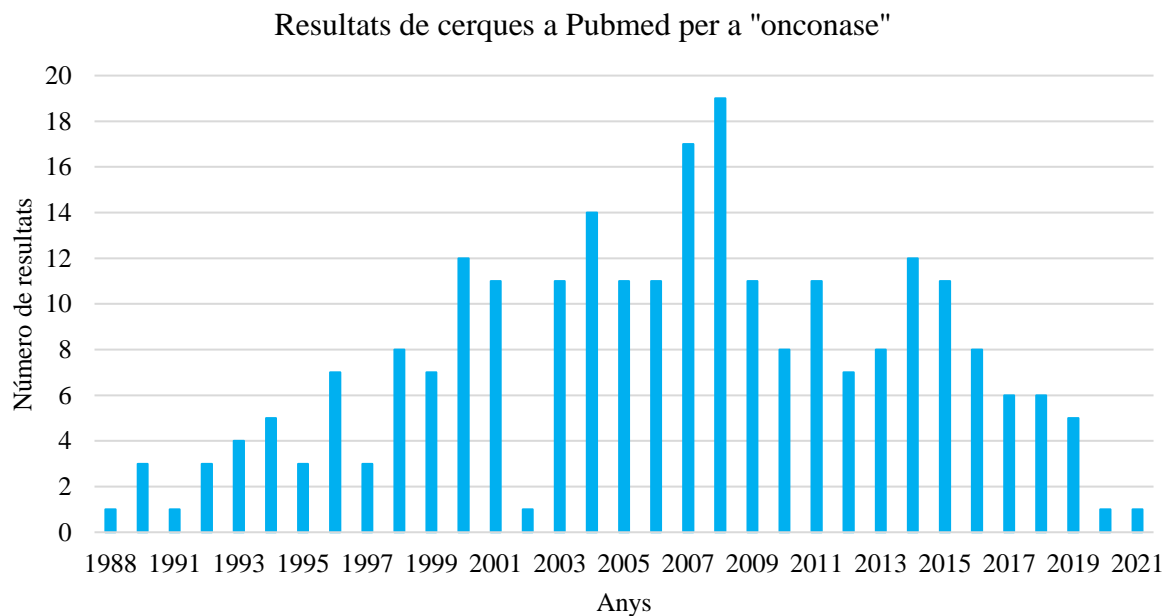


Figura 1 | Nombre de resultats obtinguts per a la cerca de "onconase" a Pubmed, des del 1988 fins el 2021.

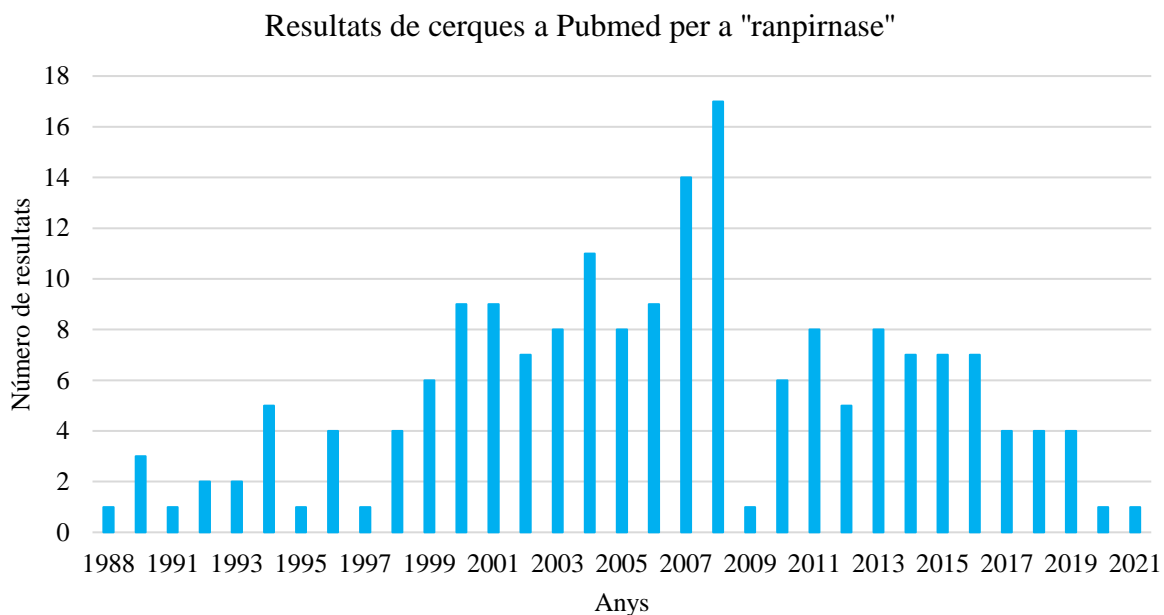


Figura 2 | Nombre de resultats obtinguts per a la cerca de "ranpirnase" a Pubmed, des del 1988 fins el 2021.

2. Objectius

The main goal of this work is to achieve knowledge about how the protein called onconase exerts, both its antiviral and antitumor properties. To this end, the following objectives are proposed:

- To study the process by which onconase is able to interact with tumor cells or virus-infected cells, in order to understand the higher affinity for transformed or infected cells that it shows.
- To analyze its molecular structure and the advantages that it provides to this enzyme over other RNases.
- To know the molecular mechanism that onconase uses, once it is internalized in the affected cells, to carry out its cytotoxic effects.
- To find out what other factors affected by onconase, genes or proteins are involved in decreasing the proliferation of tumor cells or virus-infected cells. To understand how they participate in the cell death or apoptosis processes, beyond a halt in protein synthesis by RNA degradation.
- To determine the antiviral effect that onconase presents against certain viruses (such as human immunodeficiency virus, human papilloma virus and rabies virus).

- To analyze the synergistic effect of onconase in combination with certain drugs (such as tamoxifen, lovastatin, cepharanthine and tumor necrosis factor alpha).

3. Metodologia

Aquest treball és bibliogràfic, de manera que, prèviament, vaig buscar informació sobre l'onconasa, el seu mecanisme molecular i altres propietats d'aquest enzim. La cerca bibliogràfica la vaig iniciar durant els mesos d'octubre i novembre de 2020, aproximadament. A partir d'aquí, vaig elaborar resums dels articles llegits i, durant el mes de desembre, vaig començar a redactar la introducció i els objectius del treball. Durant els mesos de gener i febrer vaig procedir a elaborar la memòria del treball, és a dir, l'apartat de resultats i discussió principalment. A partir del mes de març vaig corregir allò que m'havia revisat la meva tutora, i vaig procedir a dur a terme les últimes revisions. Durant el mes d'abril vaig redactar les conclusions i l'apartat d'ètica, i vaig acabar de repassar tot el treball.

Es van realitzar 6 reunions amb la tutora (aproximadament cada mes, des del novembre fins el maig) en les quals es van comentar aspectes rellevants i necessaris per anar avançant el treball, i es van clarificar aspectes que havien quedat poc entenedors.

Els principals cercadors utilitzats per buscar la informació necessària per a redactar aquest treball han estat *Pubmed*, *Web of science*, *NCBI*, *Protein Data Bank*, *WorldWideScience*, *Termcat* i *OMS* (per a buscar informació sobre algunes malalties). Algunes de les paraules i frases utilitzades en dur a terme la cerca van ser: "onconase", "ranpirnase", "molecular mechanism of onconase", "clathrin dependent endocytosis", "bcl gene", "apoptosis", "lovastatin", "tamoxifen", "papillomavirus", "rabies viruses"...

4. Resultats i discussió

4.1 Estructura molecular

La seqüència d'aminoàcids que presenta l'onconasa es va determinar l'any 1991 (Ardelt *et al.*, 1991), i l'any 1994 es va descobrir la seva estructura tridimensional (Mosimann *et al.*, 1994). Es considera un enzim relativament petit, amb una massa molecular de 11.820 Da, format per 104 aminoàcids, i la seva fórmula molecular és la següent: C₅₂₀ H₈₁₀ N₁₄₂ O₁₅₅ S₉. La zona activa d'aquesta proteïna conté His10, Lys31 i His97, com és característic en les ribonucleases de la

superfamília de la RNasa A. Però l'onconasa, a més, presenta 2 residus en aquesta zona: Lys9 i un residu de piroglutàmic N-terminal (Lee i Raines, 2008).

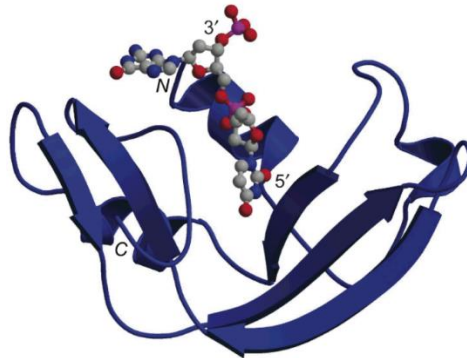


Figura 3 | Diagrama en forma de ribbons de l'estructura tridimensional de l'onconasa formant complex amb l'oligonucleòtid dAdUdGdA (PDB entry 2I5S), en què s'indiquen els extrems 3' i 5' de l'àcid nucleic i els extrems N i C terminals de la proteïna (Lee i Raines, 2008).

Tot i que l'onconasa presenta un 30% d'homologia de seqüència amb la RNasa A, presenta 20 residus menys (l'onconasa conté 104 residus i la RNasa A 124), i altres diferències esmentades a la Taula 2. Presenta una estructura bilobulada, i els lòbuls que la constitueixen estan formats per fulles β . Aquests lòbuls se'ls pot anomenar V1 i V2, i entre mig s'hi troba la zona del centre actiu (Figura 4) (Holloway, Singh, Shogen i Acharya, 2011). Cada lòbul està format per 3 cadenes β , i cada cadena presenta un nombre determinat de residus (Taula 1). Un lòbul conté β_1 , β_3 i β_4 ; i l'altre conté β_2 , β_5 i β_6 . A banda de les cadenes β , l'onconasa també presenta 3 segments en hèlix- α ; α_1 (inclou els residus de 3 a 10), α_2 (inclou els residus de 19 a 23) i α_3 (inclou els residus de 41 a 48) (Mosimann *et al.*, 1994).

Taula 1 | Cadenes que constitueixen cada lòbul de l'onconasa, i residus que formen aquestes cadenes.

| Lòbuls | Cadenes | Residus |
|--------|-----------|----------|
| V1 | β_1 | 33 a 38 |
| | β_3 | 63 a 70 |
| | β_4 | 77 a 84 |
| V2 | β_2 | 55 a 58 |
| | β_5 | 86 a 91 |
| | β_6 | 94 a 101 |

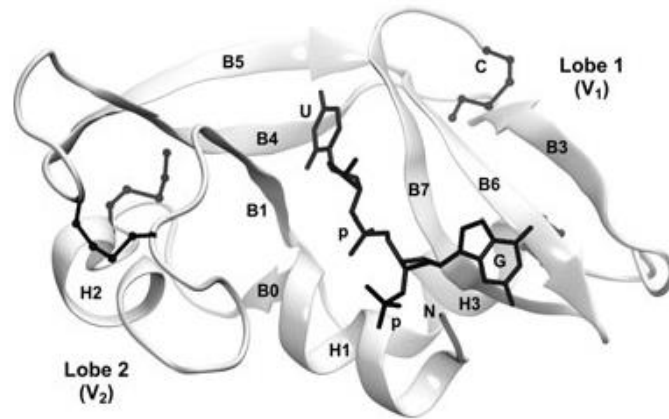


Figura 4 | Representació esquemàtica de l'onconasa, en què s'indiquen les hèlix de H1 a H3, i les cadenes beta de B0 a B7 (B0 és molt petita i per a molts autors, es creu que forma part del final de l'hèlix alfa 1; és per això que no s'anomena a la Taula 1). La zona activa es localitza entre els 2 lòbuls, on hi ha situat el dinucleòtid UPGP (Holloway *et al.*, 2011).

La zona activa és la regió on s'unirà el substrat de la proteïna. L'especificitat de l'onconasa pel seu substrat, és a dir, la preferència per a aquest, pot ser a nivell de seqüència de bases del RNA i depenent del tipus cel·lular pot tenir preferència per diferents RNAs. A nivell de base, té preferència per unir substrats que a l'extrem 5' de la cadena presentin un nucleòtid de guanina. A nivell de cèl·lula, inicialment es va trobar que tenia com a preferència unir-se a tRNAs (Lee i Raines, 2008).

L'estructura molecular que presenta la caracteritza en comparació amb la resta de RNases de la seva mateixa família, ja que la seva estabilitat és superior a les altres proteïnes (presenta una temperatura de desnaturalització d'uns 90°C, mentre que en la RNasa A, la temperatura és d'uns 62°C) (Saxena *et al.*, 2003) degut a què el seu extrem C-terminal presenta una cisteïna, que li permet formar un enllaç per pont disulfur amb una cisteïna interna de la cadena, la qual només es troba en les ribonucleases amfíbies (no es conserva en homòlegs de mamífers). També ajuda a l'estabilitat de l'onconasa els enllaços d'hidrògens presents en el seu extrem N-terminal (Notomista *et al.*, 2000) i l'absència de residus cis-prolina (Arnold, Schulenburg, Schmidt i Ulbrich-Hofmann, 2006), i que els llaços que uneixen els diferents elements d'estructura secundària són més curts que en els altres membres d'aquesta família de proteïnes (Lee i Raines, 2008).

Per últim, cal destacar que un residu de Metionina (Met23) present en la segona hèlix α també contribueix a l'estabilitat de l'enzim (Notomista *et al.*, 2000).

Com a conseqüència de l'elevada estabilitat conformacional, l'onconasa presenta elevada resistència a la proteòlisi; és resistent tant a la pepsina com a la quimotripsina encara que aquestes s'utilitzin en elevada concentració i durant un període de temps elevat (Notomista *et al.*, 2000). A la Taula 2 es presenta un resum de diferents propietats de l'onconasa comparada amb la RNasa A.

Taula 2 | Comparació entre l'onconasa i la RNasa A pel que fa a la preferència de degradació de RNA, el mecanisme catalític i els residus que hi participen, l'eficiència catalítica i l'estabilitat.

| | RNasa A | Onconasa |
|-------------------------------------|--|--|
| Tipus de RNA preferentment degradat | rRNA (Suhasini i Sirdeshmukh, 2006). | tRNA (Suhasini i Sirdeshmukh, 2006). |
| Mecanisme catalític | His12 i His119 regulen el moviment de protons (Thompson i Raines, 1994) que es dona en la catàlisi àcid-base, i Lys41 estabilitza la transició mitjançant la donació d'un hidrogen a un oxigen (Messmore, Fuchs i Raines, 1995). | His10, His97 i Lys31 (homòleg de His12, His119 i de Lys41 de la RNasa) i Lys9 són necessaris per al procés de catàlisi (Lee i Raines, 2003). |
| Eficiència catalítica | Molt eficient; valors k_{cat}/K_m de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kelemen <i>et al.</i> , 1999). | Menys eficient que la RNasa A; en condicions equivalents, valors k_{cat}/K_m de $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Lee i Raines, 2003). |
| Estabilitat | Estabilitat no tant elevada (Lee i Raines, 2008). | Estabilitat elevada gràcies a la cisteïna present en l'extrem C-terminal (Leland, Staniszewski, Kim i Raines, 2000), i als enllaços d'hidrogen presents en l'extrem N-terminal i llaços més curts que connecten els elements d'estructura secundària (Notomista <i>et al.</i> , 2000). |

4.2 Mecanisme molecular com a fàrmac

El mecanisme molecular citotòxic que realitza l'onconasa no es coneix completament, però es sap que es basa, inicialment, en interaccionar amb la cèl·lula tumoral o la cèl·lula infectada per un virus, posteriorment s'interioritza dins d'aquesta per un procés d'endocitosi, i un cop es troba a l'interior, provoca degradació de l'RNA cel·lular i inducció de l'apoptosi. Aquest mecanisme s'esquemmatitza a la Figura 5 i es va comentant en els diferents subapartats d'aquest punt.

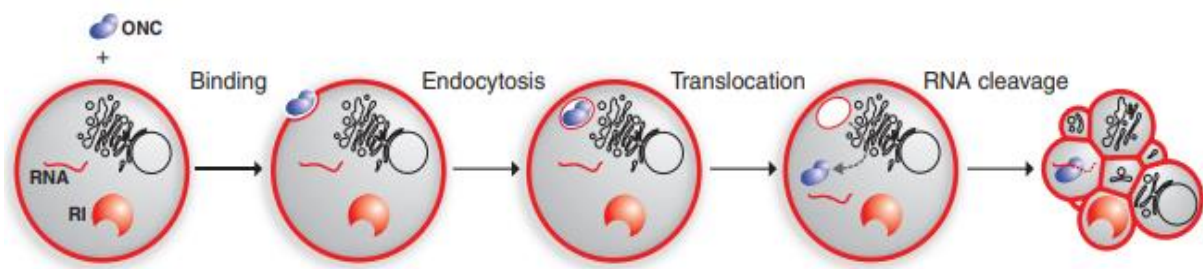


Figura 5 | Mecanisme molecular de l'onconasa; comprèn la unió a la membrana, el procés d'endocitosi, la translocació al citosol i la degradació dels RNAs diana (Turcotte, Lavis i Raines, 2009).

4.2.1 Interacció i internalització dins la cèl·lula

El mecanisme a partir del qual l'onconasa presenta major afinitat cap a les cèl·lules tumorals no es coneix amb exactitud. Inicialment es creia que aquesta interacció es produïa a partir de receptors específics presents en les cèl·lules presentant dues afinitats diferents, amb valors K_d de $6.2 \cdot 10^{-8}$ i $2.5 \cdot 10^{-7}$ (Wu, Mikulski, Ardelt, Rybak i Youle, 1993), tot i que actualment la presència d'aquests receptors és controvertida (Rodríguez *et al.*, 2007). Posteriorment, es va proposar que les atraccions electrostàtiques entre l'onconasa i la membrana cel·lular era el que podia explicar aquesta selectivitat (Ardelt, Shogen i Darzynkiewicz, 2008). L'onconasa és una proteïna altament catiònica, i la superfície cel·lular és altament aniònica, especialment en cèl·lules tumorals, degut a la presència de grups sulfats, fosfats i carboxilats en els lípids i els carbohidrats. Per això és probable que l'onconasa s'uneixi a la superfície de la cèl·lula mitjançant interaccions de Coulomb (Lee i Raines, 2008).

Existeix una correlació entre la càrrega de l'onconasa i la seva citotoxicitat. Així doncs, dependent de la distribució dels residus catiònics que presentin membres de la mateixa família, la citotoxicitat serà més o menys elevada (Turcotte *et al.*, 2009).

Un cop l'onconasa s'ha unit a la superfície de la cèl·lula, es produeix la internalització mitjançant un procés d'endocitosi dependent d'energia (per tant, és necessari ATP durant aquest procés) clatrina dependent (Rodríguez *et al.*, 2007). Les cèl·lules eucariotes presenten dues vies d'endocitosi: clatrina dependent i clatrina independent. Les vesícules formades de clatrina es produeixen a partir de la unió entre proteïnes citosòliques i components de la membrana plasmàtica (Mousavi, Malerod, Berg i Kjekken, 2004).

Durant aquest procés d'endocitosi, s'empaqueta el material dins de vesícules, i és fonamental en neurotransmissors, en la transducció de senyal i en la regulació d'activitats de la membrana plasmàtica (McMahon i Boucrot, 2011). Un cop l'onconasa es troba dins dels endosomes, en algunes ocasions, s'escapa i es trasllada al citosol (tot i que el procés a partir del qual es localitza al citosol no és del tot conegut) (Turcotte *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2007).

4.2.2 Degradació de l'RNA intracel·lular

Quan l'onconasa ja ha interaccionat amb la cèl·lula i s'ha internalitzat, aquesta s'encarrega de degradar l'RNA. Hi ha diferents RNAs que són degradats per l'onconasa:

- RNA ribosòmic o rRNA (Wu *et al.*, 1993).
- RNA de transferència o tRNA (Saxena *et al.*, 2002).
- RNA missatger o mRNA (Juan *et al.*, 1998).
- microRNA i els seus precursors (Zhao, Ardelt, Ardelt, Shogen i Darzynkiewicz, 2008).

En el citosol de les cèl·lules de mamífer hi ha present l'inhibidor de ribonucleases o RI. És una proteïna de 50 KDa que s'uneix a determinats membres de la superfamília de la RNasa A amb una afinitat femtomolar i els torna inactius. Es creu que la funció de l'RI és protegir la cèl·lula de la invasió de ribonucleases, de regular o finalitzar l'activitat de les ribonucleases i de controlar l'estat d'oxidació de la cèl·lula en resposta a factors com l'envelliment i l'estrès oxidatiu. L'afinitat entre la ribonucleasa i la proteïna RI determinarà el nivell de citotoxicitat d'aquest enzim. Per tant, només seran capaces de produir degradació de l'RNA aquelles ribonucleases que puguin evadir l'RI (Dickson, Haigis i Raines, 2005). La constant de dissociació RI/onconasa és uns 7 ordres de magnitud més elevada que la que s'ha descrit per a la RNasa A (Boix *et al.*, 1996).

El trencament de l'RNA per part de l'onconasa (i en comú amb les RNases A) és endonucleolític i es produeix, de manera específica, en l'extrem 3' fosfat d'un residu de pirimidina. Però existeixen certes diferències pel que fa als residus que participen durant el procés catalític (Taula 2). En les RNases, durant el procés catalític són necessaris 2 residus d'Histidina (His12 i His119), els quals s'encarreguen d'organitzar el moviment de protons del mecanisme de catàlisi àcid-base (Thompson i Raines, 1994), i un residu de Lisina (Lys41), que estabilitza l'estat de transició (Messmore *et al.*, 1995). En el cas de l'onconasa, són necessaris 2 residus d'Histidina, His10 i His97, equivalents a His12 i His119 de la RNasa A, i que duen a terme el procés catàlisi àcid-base, així com la Lys31 per a dur a terme el trencament de RNA (Lee i Raines, 2003).

4.2.3 Inducció de l'apoptosi

L'acció citotòxica de l'onconasa no es pot explicar només per una aturada de la síntesi proteica, com a conseqüència de la degradació de RNAs, que indueix el procés d'apoptosi ja que s'ha vist, que també indueix canvis en els nivells de certs RNAs, mRNAs i miRNAs o els seus precursors, que activen, en les cèl·lules afectades, diferents vies de senyalització que acaben afectant múltiples processos (Castro, Ribó, Benito i Vilanova, 2016).

Quan s'han tractat determinades cèl·lules amb onconasa s'ha observat que alguns mRNAs, en lloc de produir-se una disminució dels seus nivells d'expressió gènica, aquests augmenten. Per tant, l'onconasa no només produeix apoptosi a través de la degradació de RNA, sinó que també és capaç de dur a terme una sobre-expressió de RNAs que codifiquen per proteïnes involucrades en el control del cicle cel·lular o de factors de transcripció (Qiao *et al.*, 2012).

Per exemple, en cèl·lules de mesotelioma maligne l'onconasa indueix l'expressió de mRNA que codifica per una interleucina 24 (IL-24) (Altomare *et al.*, 2010), la qual sensibilitza les cèl·lules a la radiació i a altres teràpies convencionals i inhibeix l'angiogènesi (formació de nous vasos sanguinis a partir dels existents) (Sarkar *et al.*, 2007).

Un altre mecanisme de l'onconasa es basa en què pot actuar com a catalitzador intracel·lular per a la formació de RNA d'interferència, que també pot provocar apoptosi depenent del microambient de la cèl·lula (Ardelt, Ardel i Darzynkiewicz, 2003).

La inducció de mort cel·lular via apoptosi per part de l'onconasa implica la modificació de l'expressió d'uns gens de la família Bcl i l'activació de procaspases (Ardelt *et al.*, 2007).

Els gens de la família Bcl, que codifiquen per proteïnes, presenten com a mínim 12 membres, els quals es diferencien entre sí per promoure o inhibir l'apoptosi. Són necessaris per a mantenir la homeòstasi cel·lular, ja que un desequilibri pot produir càncer. S'encarreguen de regular la via intrínseca durant la fase d'iniciació, en què les cèl·lules pateixen estrès o el DNA es troba danyat, iniciant una cascada de senyalització i, produint l'activació de la procaspasa-9. Per altre banda, la via extrínseca no implica els gens Bcl-2, sinó que s'activa a partir de membres de la família de factors de necrosi tumoral (TNF) (Thomas *et al.*, 2013).

Majoritàriament, l'onconasa indueix mort cel·lular activant la via intrínseca d'apoptosi junt amb l'activació de serina-proteases (Ardelt *et al.*, 2007), però en alguns casos, s'ha observat la inducció d'autofàgia que acaba promovent apoptosi independentment de caspases (Michaelis *et al.*, 2007).

Una altra propietat que presenta l'onconasa és la sinèrgia. Això significa que presenta la capacitat d'amplificar la citotoxicitat d'altres fàrmacs, i ho fa a partir de la inhibició de la biosíntesi de factors que promouen la supervivència, o bé a través de l'amplificació d'agents que indueixen apoptosi (Deptala *et al.*, 1998; Halicka *et al.*, 2002).

4.3 Utilització de l'onconasa com a agent antiviral

Quan una cèl·lula es troba sota estrès degut a una infecció viral indueix canvis, com la formació de grànuls d'estrès (agregats citoplasmàtics de proteïnes i RNA) o l'autofàgia (ruta de resposta cel·lular en què s'eliminen cèl·lules danyades mitjançant un procés de reciclatge). Però quan el dany que pateix la cèl·lula durant l'estrès supera la capacitat dels mecanismes de reparació es pot produir apoptosi. Algunes de les estratègies que pot dur a terme l'onconasa sobre virus, a banda de l'activació de l'apoptosi de les cèl·lules infectades, són la inhibició de la replicació viral mitjançant la seva activitat enzimàtica, la regulació del reconeixement i resposta immunitària de l'hoste, la regulació de la formació de grànuls d'estrès i la inducció d'autofàgia (Li i Boix, 2021).

A la Figura 6 s'esquematitza, de manera general, el mecanisme molecular que utilitza l'onconasa com a agent antiviral. Cal indicar, però, que depenent del tipus de virus, aquest

procés pot ser molt més complex, tal com s'explica més endavant per alguns dels virus contra els quals l'onconasa és eficaç.

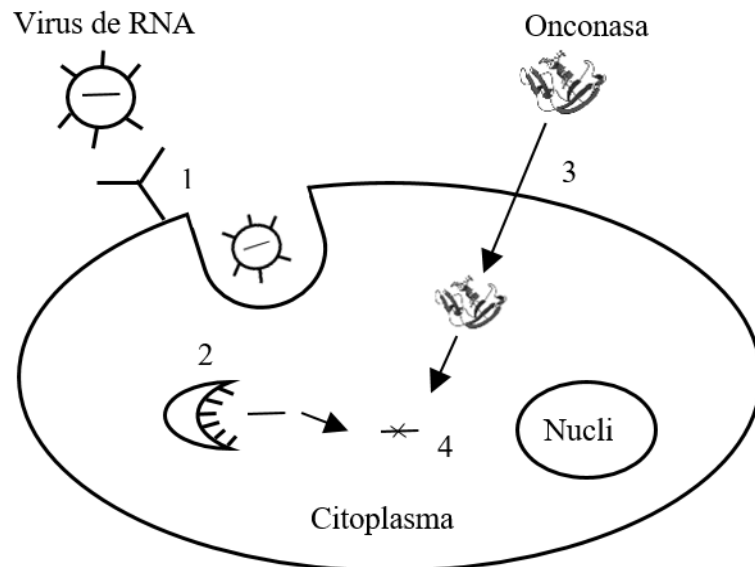


Figura 6 | Procés d'infecció d'un virus de RNA a una cèl·lula eucariota i mecanisme antiviral que utilitza l'onconasa. (1) Reconeixement i fixació del virus, mitjançant receptors específics, a la cèl·lula hoste. Translocació al citoplasma cel·lular mitjançant un procés d'endocitosis. (2) Alliberació de l'RNA del virus al citosol. (3) Internalització de l'onconasa al citoplasma. (4) Degradació de l'RNA viral per part de l'onconasa.

L'onconasa s'ha provat com a agent antiviral, i s'ha vist que presenta eficàcia contra varis virus, com el virus d'immunodeficiència humana o VIH-1, el virus del papil·loma humà o HPV i el virus de la ràbia o RABV.

Saxena *et al.* (2003) van utilitzar un cultiu de cèl·lules de leucèmia H9 humanes CD4 positives i infectades amb VIH-1. En aquest cultiu hi van afegir onconasa a una concentració de $1 \cdot 10^{-7}$ M, i com a conseqüència, es va observar inhibició de la replicació de VIH-1 de més del 90% al cap de 96 hores. Van comprovar que l'efecte citotòxic de l'onconasa era gairebé nul en cèl·lules H9 no infectades. S'ha vist que altres RNases (com la RNasa seminal bovina) també provoquen una disminució en la replicació del virus, però en un grau molt inferior a l'onconasa. Altres, com la RNasa A i la neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN) no provoquen cap efecte sobre la replicació viral de cèl·lules infectades.

VIH-1 és un retrovirus de cadena simple de RNA i es replica mitjançant un intermediari de dsDNA. La transcriptasa inversa és necessària per a passar l'RNA del VIH-1 a DNA, i aquesta necessita un encebador per a produir síntesi de DNA; en el cas del VIH-1, és un tRNA^{Lys}.

L'onconasa, que presenta com a principal diana el tRNA (tot i que en determinades condicions o concentracions també pot escindir altres RNAs, tal com s'ha indicat més amunt) (Suhagini i Sirdeshmukh, 2006), produeix l'escissió del tRNA^{Lys}, de manera que indirectament afecta al cicle viral produint la degradació de l'encebador necessari per a la transcriptasa inversa (Saxena *et al.*, 2003), tal i com s'esquematitza a la Figura 7.

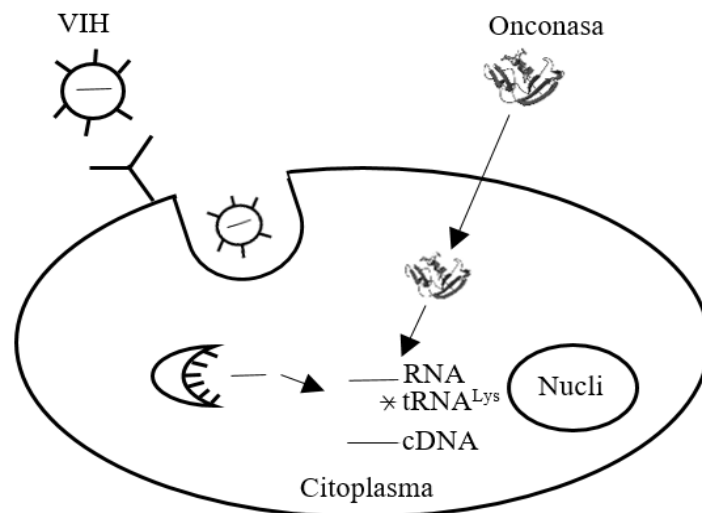


Figura 7 | Procés d'infecció del VIH a una cèl·lula eucariota i mecanisme antiviral que utilitza l'onconasa. En aquest cas, actua escindint l'encebador necessari per a passar l'RNA viral a DNA.

Les infeccions produïdes pel virus del papil·loma humà o HPV també es poden tractar eficaçment per l'onconasa. Es va demostrar en el treball de Squiguera *et al.* (2017), en què es van tractar berrugues urogenitals (produïdes per infeccions de HPV) mitjançant aplicació tòpica de l'onconasa. A més, per a assajar l'eficàcia de l'onconasa *in vitro* contra HPV, es van infectar cèl·lules A-431 (cèl·lules epitelials) amb HPV-11 (un dels tipus de HPV més comuns que provoquen berrugues urogenitals benignes), i cèl·lules RK-13 (cèl·lules de ronyó de conill) amb CRP (virus de papil·loma de conill). Després de 24 hores, es va afegir onconasa a diferents concentracions, i 3 dies després es va procedir a l'anàlisi de RNA. Es va poder concloure, a partir dels resultats obtinguts, que l'onconasa disminueix l'expressió de HPV-11 en cèl·lules cultivades.

En l'estudi de Smith *et al.* (2020) s'analitza l'efecte antiviral de l'onconasa contra el virus de la ràbia (RABV) en 3 tipus de cèl·lules: neuroblastoma de ratolí, cèl·lules renals de hámster nadó i cèl·lules fibroblàstiques primàries de ratpenat. En aquest cas, s'utilitza un extracta produït a partir d'oòcits de *Rana pipiens* que conté onconasa anomenat TMR-001. El virus de

la ràbia provoca una encefalitis (inflamació d'una part més o menys extensa de l'encèfal) aguda i progressiva que afecta als mamífers i pot acabar provocant la mort. Tot i que es pot prevenir mitjançant la vacunació, no existeix cap medicament específic efectiu, probablement degut a la dificultat de distribució d'un fàrmac antiviral al sistema nerviós central (Jochmans i Neyts, 2019). Es va poder concloure que l'onconasa inhibia RABV en cèl·lules neuronals, cèl·lules epitelials i cèl·lules fibroblàstiques primàries, així com la propagació de cèl·lula a cèl·lula en cèl·lules epitelials (Smith *et al.*, 2020).

També s'ha vist en altres estudis que l'onconasa protegeix els ratolins del virus de l'Ebola (Hodge *et al.*, 2016), i mostra activitat antiviral *in vitro* contra algunes famílies de virus com paramixovirus (inclou el virus del xarampió), filoviridae (inclou el virus de l'Ebola) i rhabdovirus (inclou el virus de la ràbia) (Smith *et al.*, 2020). També es considera com a teràpia adjuvant (ajuda o modifica l'acció del medicament principal) per a combatre la grip (produïda per els ortomixovirus), el síndrome respiratori d'Orient Mitjà (produït per un coronavirus anomenat MERS-CoV), el virus de l'hepatitis C, el citomegalovirus i el virus sincitial respiratori (Vert *et al.*, 2017).

Si es compara l'efecte antiviral de l'onconasa, amb altres antivirals, com ara anticossos monoclonals o inhibidors de nucleòsids, tots aquests poden no ser efectius degut a mutacions virals que produeixen resistència (produïdes per errors de les polimerases, és a dir, en ocasions s'equivoquen en introduir la base durant la replicació). L'onconasa, en canvi, ja que presenta com a dianes elements essencials per a la replicació viral i aquests no pateixen mutacions, és molt probable que no generin resistència. Per tant, inhibint o disminuint la velocitat de replicació del virus, es podria donar temps a l'organisme per tal que el sistema immunitari generi una resposta (Hodge *et al.*, 2016).

4.4 Utilització de l'onconasa com a agent antitumoral

L'activitat antitumoral de l'onconasa s'ha demostrat tant en tumors implantats en ratolins models com en tractaments clínics en fase III (Deptala *et al.*, 1998). A més, s'ha observat que aquesta capacitat antitumoral s'amplifica, és a dir, és sinèrgica, amb determinats compostos, alguns dels quals es comenten a continuació. Aquests són el tamoxifè, la lovastatina (Mikulski, Viera i Shogen, 1992), la cefarantina (Ita *et al.*, 2008) i el factor tumoral de necrosis alfa (TNF α) (Deptala *et al.*, 1998), entre d'altres.

En línies cel·lulars de carcinoma ovàric resistents a la quimioteràpia convencional s'està analitzant el fet d'utilitzar la combinació d'onconasa i tamoxifè (medicament que s'encarrega de bloquejar els receptors d'estrògens en cèl·lules cancerígenes) o d'onconasa i lovastatina (inhibeix un enzim que limita la velocitat de síntesi de colesterol) (Mikulski *et al.*, 1992). Es va observar que la lovastatina suprimia la proliferació cel·lular, arrestant les cèl·lules en fase G1 del cicle cel·lular (Jakóbisiak, Bruno, Skierski i Darzynkiewicz, 1991). Es va analitzar la capacitat d'inhibició del creixement cel·lular de l'onconasa de manera individual, i en combinació amb dues formes de lovastatina (lactona i beta-hidroxiàcid), en 3 línies cel·lulars tumorals humanes, i es va determinar que presentaven un efecte sinèrgic anti proliferatiu (Mikulski *et al.*, 1992). Aquest sinergisme probablement és degut als efectes en el metabolisme de RNA, l'onconasa a través de la seva degradació (Ardelt *et al.*, 1991) i la lovastatina a través del transport d'RNA (Tokes i Clawson, 1989).

La cefarantina és un fàrmac aïllat de la planta *Stephania cepharantha* i s'utilitza al Japó per a tractar malalties com alopecia (Morita, Nakamura, Nagamachi, Kishi i Miyachi, 2002), leucopènia causada per radioteràpia (Ohta i Morita, 1990) i malària (Chea *et al.*, 2007), entre d'altres. S'ha observat que l'onconasa i la cefarantina, tot i presentar diferències tant estructurals com mecàniques, indueixen efectes similars, com per exemple la reducció d'estrès oxidatiu (ja que recull oxidants generats durant el metabolisme aeròbic, protegint el DNA de dany oxidatiu) i la inhibició de NFκB (factor de transcripció que es pot activar durant el tractament amb fàrmacs antitumorals, protegint la cèl·lula de l'apoptosi). Per això, la combinació d'aquests 2 fàrmacs permet obtenir un percentatge més elevat de cèl·lules apoptòtiques, que no si s'utilitzen individualment (Ita *et al.*, 2008).

Deptala *et al.* (1998) van estimar la freqüència d'apoptosi de línies cel·lulars humanes de leucèmia (HL-60) tractant-les amb onconasa o amb factor de necrosi tumoral (TNF) individualment, i posteriorment, de manera conjunta. En el tractament amb cada fàrmac administrat de manera individual, s'induïa un baix grau d'apoptosi; en el tractament en què s'incubaven les cèl·lules amb onconasa durant 24 hores, i, posteriorment, se'ls afegia TNF, el grau d'apoptosi era molt més elevat.

Altres compostos antitumorals amb els quals l'onconasa presenta sinèrgia són la vincristina (Rybak *et al.*, 1996), els interferons (Tsai, Hsieh, Ardelt, Darzynkiewicz i Wu, 2002), la radiació ionitzant (Kim *et al.*, 2007) i agents inductors de la diferenciació (Halicka *et al.*, 2000).

A la Taula 3 i Figura 8 s'indiquen els processos induïts per aquests compostos i el tipus de càncer sobre el qual s'han estudiat junt amb l'onconasa.

Taula 3 | Processos que realitzen diferents tipus de components utilitzats com a antitumorals, i tipus de càncers en els quals s'han utilitzat aquests compostos juntament amb onconasa i han presentat major efectivitat.

| Compost | Procés antitumoral | Tipus de càncers en els quals ha mostrat eficàcia juntament amb l'onconasa |
|--------------------------------------|---|---|
| Tamoxifè | Bloqueig de receptors d'estrògens en cèl·lules cancerígenes (Mikulski <i>et al.</i> , 1992). | Carcinoma ovàric resistent a la quimioteràpia convencional (Mikulski <i>et al.</i> , 1992). |
| Lovastatina | Aturada de cèl·lules tumorals en fase G1 del cicle cel·lular (Jakóbisiak <i>et al.</i> , 1991). | Carcinomes pancreàtics i pulmonars (Mikulski <i>et al.</i> , 1992). |
| Cefarantina | Reducció d'estrès oxidatiu i inhibició de NFκB (Ita <i>et al.</i> , 2008). | Leucèmia, limfoma histiomonocític, mieloma múltiple, carcinoma de pròstata i adenocarcinoma de pròstata (Ita <i>et al.</i> , 2008). |
| Vincristina | Inducció de l'activació d'AMPK i fosforilació d'Acetil-CoA carboxilasa (Chen <i>et al.</i> , 2011). | Carcinoma de còlon (Rybak <i>et al.</i> , 1996). |
| Interferons | Modificació de determinades funcions que inhibeixen la síntesi de proteïnes i enzims induïts per factors de creixement (Sancéau, Hiscott, Delattre i Wietzerbin, 2000). | Leucèmia (Sancéau <i>et al.</i> , 2000). |
| Radiació ionitzant | Modificació química i lesions en les cèl·lules de l'organisme (Kim <i>et al.</i> , 2007). | Càncer de pulmó (Kim <i>et al.</i> , 2007). |
| Agents inductors de la diferenciació | Inducció de la diferenciació cel·lular (Halicka <i>et al.</i> , 2000). | Leucèmia i càncer de pròstata (Halicka <i>et al.</i> , 2000). |

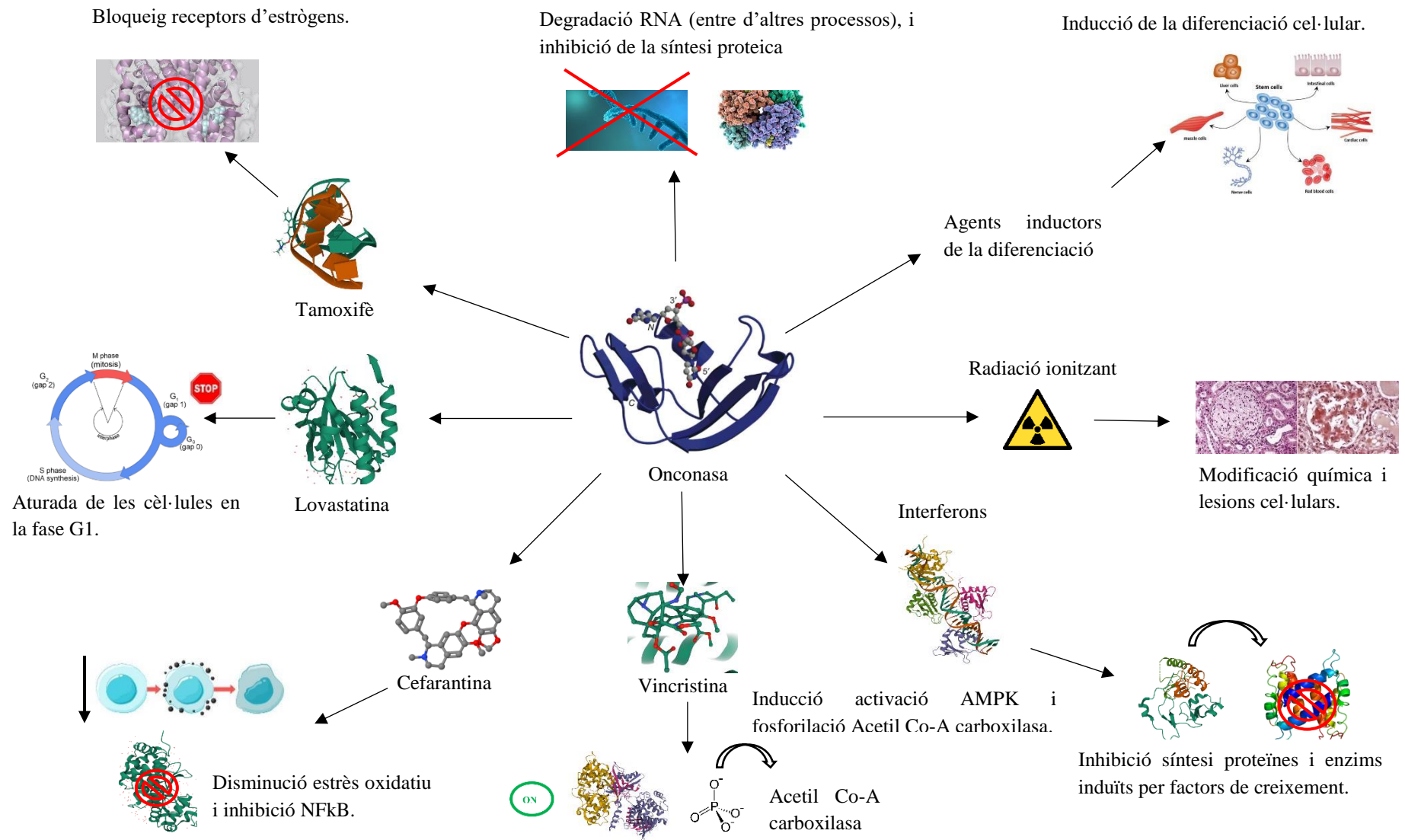


Figura 8 | Efectes de l'onconasa i altres compostos (que presenten sinergisme amb l'onconasa) com a agents antitumorals.

Per últim, és necessari destacar que l'onconasa pot ser molt útil quan es fusiona amb un anticòs que presenta com a diana un antigen específic. Per exemple, en l'estudi de Chang *et al.* (2010) es postula la obtenció d'una nova immunotoxina formada per una onconasa (mutada) i un anticòs específic contra Trop-2 (glicoproteïna de superfície cel·lular que augmenta la seva expressió en càncers epitelials). A partir d'aquesta construcció, l'expressió de l'antigen Trop-2 va disminuir. A la literatura es poden trobar múltiples exemples de proteïnes de fusió i conjugats covalents d'onconasa amb altres proteïnes i compostos, respectivament (Kowalik, Witkowska i Smolewski, 2020). Així mateix, la dimerització de l'onconasa a través de l'intercanvi dels seus extrems N-terminals, com es dona en el cas de la ribonucleasa de semen boví, permet aconseguir un increment de la seva citotoxicitat (Fagagnini *et al.*, 2017). Aquestes diferents estratègies es resumeixen a la Figura 9.

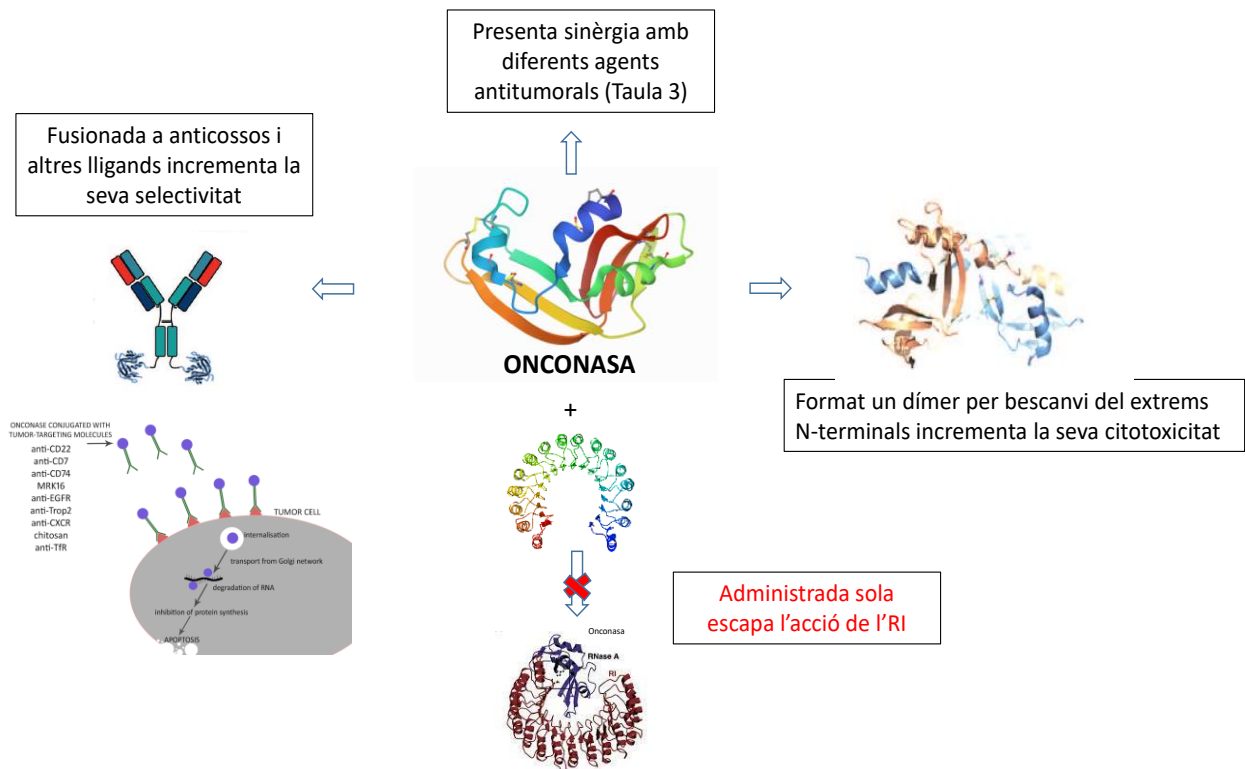


Figura 9 | Modificacions de l'onconasa que permeten dotar-la de noves propietats. Per sí sola s'escapa de l'inhibidor proteic de ribonucleases i això permet que sigui citotòxica. Aquesta propietat s'ha aprofitat per millorar-la com agent antitumoral, ja sigui per dimerització i sobretot per unió a lligands o fusió amb altres proteïnes, aconseguint que presenti major citotoxicitat i selectivitat

5. Ètica i sostenibilitat

Aquest treball és bibliogràfic i és per això que s'ha de tenir en compte que tota la informació extreta per a la seva elaboració ha estat citada correctament en el text i en l'apartat de Bibliografia. De totes les figures que no són d'elaboració pròpia, s'ha citat la font de la qual s'ha extret.

Pel que fa el contingut del treball, com que es tracta d'un fàrmac que s'està utilitzant en assaigs clínics, és necessari que aquests hagin passat pels diferents tipus de comitès ètics d'experimentació en éssers humans, i que estiguin d'acord amb el compliment de la normativa actual. Qualsevol assaig clínic ha de ser aprovat per un comitè expert amb especialistes i han de tenir en compte l'ètica i la salut del pacient. Han de seguir les normes de l'Agència Espanyola del Medicament (en el cas que es dugui a terme a Catalunya) (Generalitat de Catalunya, 2014; <http://ics.gencat.cat/ca/recerca/assajos-clinics/>) i que ha d'estar d'acord amb el *Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos. BOE» núm. 307, de 24 de diciembre de 2015, páginas 121923 a 121964 ; BOE-A-2015-14082* (<https://www.boe.es/boe/dias/2015/12/24/pdfs/BOE-A-2015-14082.pdf>), el qual concorda amb el *REGLAMENTO (UE) No 536/2014 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de abril de 2014 sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE, publicat en el Diario Oficial de la Unión Europea de data 27/05/2014* (<https://www.boe.es/doue/2014/158/L00001-00076.pdf>).

Pel que fa als assaigs duts a terme amb animals, segons el BOE (Boletín Oficial del Estado), han de complir, a nivell espanyol, el *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero BOE núm. 34, de 08 de febrero de 2013, Referencia: BOE-A-2013-1337* (<https://www.boe.es/buscar/pdf/2013/BOE-A-2013-1337-consolidado.pdf>), que està d'acord amb la normativa europea recollida en la *DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, publicada en el Diario Oficial de la Unión Europea en data 20/10/2010* (<https://www.boe.es/doue/2010/276/L00033-00079.pdf>).

Per últim, en aquest treball s'ha tingut en compte la sostenibilitat ja que, pràcticament tota la informació utilitzada s'ha obtingut i s'ha consultat per vies digitals i per tant, no s'ha consumit paper ni s'ha gastat tinta.

6. Conclusions

- Onconase is an enzyme obtained from *Rana pipiens* oocytes, but also it is produced as a recombinant protein.
- It has a particular 3D-structure, different from other members of its family, which gives it advantages such as highly stability and resistance to proteolysis.
- It is used as an antitumor and antiviral drug, and has reached advanced clinical trials to treat different types of cancer.
- Its molecular mechanism of action is not well known, but is based on interacting with the affected cell (infected by a virus or a tumor cell) through different mechanisms, such as interaction with receptors or electrostatic interactions with components of the cell membrane. The electrostatic attraction between this basic protein and the negative charges of the cell membrane seem to play a relevant role. Once introduced in the cell, onconase degrades different types of intracellular RNA and induces apoptosis, which it is not exclusively due to an arrest of protein synthesis.
- It is resistant to the ribonuclease inhibitor present in the cytosol of eukaryotic cells (this inhibitor is not able to inactivate onconase, and therefore the enzyme may perform its function).
- Onconase mainly induces apoptosis through the intrinsic pathway.
- As an antiviral agent, it has been shown to be effective against human immunodeficiency virus, human papilloma virus and rabies virus, among others. Compared to other antiviral compounds, it has the advantage that is not affected by viral mutations, thus it can be very effective to treat viral infections.
- Onconase shows synergy with certain antitumor compounds such as tamoxifen, lovastatin, cepharanthine and tumor necrosis factor alpha, among others.
- Since onconase acts on multiple RNA targets, produces multiple effects on the treated cells that likely avoid the appearance of resistance when used as a drug.

7. Bibliografia

- Altomare, D. A., Rybak, S. M., Pei, J., Maizel, J. V., Cheung, M., Testa, J. R., & Shogen, K. (2010). Onconase responsive genes in human mesothelioma cells: Implications for an RNA damaging therapeutic agent. *BMC Cancer*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-34>
- Ardelt, B., Ardelt, W., & Darzynkiewicz, Z. (2003). Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *2*(1), 22–24. <https://doi.org/10.4161/cc.2.1.232>
- Ardelt, B., Juan, G., Burfeind, P., Salomon, T., Wu, J. M., Hsieh, T. C., Li, X., Sperry, R., Pozarowski, P., Shogen, K., Ardelt, W., Darzynkiewicz, Z. (2007). Onconase, an anti-tumor ribonuclease suppresses intracellular oxidative stress. *International Journal of Oncology*, *31*, 663-669. <https://doi.org/10.3892/ijco.31.3.663>
- Ardelt, W., Mikulski, S. M., & Shogen, K. (1991). Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(1), 245–251. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)52427-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)52427-3)
- Ardelt, W., Shogen, K., & Darzynkiewicz, Z. (2008). Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Current pharmaceutical biotechnology*, *9*(3), 215–225. <https://doi.org/10.2174/138920108784567245>
- Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D., & Ulbrich-Hofmann, R. (2006). Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry*, *45*(11), 3580–3587. <https://doi.org/10.1021/bi0525223>
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V. M., Saxena, S. K., Ardelt, W., Ladner, J., & Youle, R. J. (1996). Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *Journal of molecular biology*, *257*(5), 992–1007. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0218>
- Brand, R. M., Siegel, A., Myerski, A., Metter, E. J., Engstrom, J., Brand, R. E., ... McGowan, I. (2018). Ranpirnase reduces HIV-1 infection and associated inflammatory changes in a human colorectal explant model. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *34*(10), 838–848. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0308>
- Castro, J., Ribó, M., Benito, A., & Vilanova, M. (2016). Approaches to Endow Ribonucleases with Antitumor Activity: Lessons Learned from the Native Cytotoxic Ribonucleases, Anti-cancer Drugs - Nature, Synthesis and Cell. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/65730>
- Chang, C. H., Gupta, P., Michel, R., Loo, M., Wang, Y., Cardillo, T. M., & Goldenberg, D. M. (2010). Ranpirnase (frog RNase) targeted with a humanized, internalizing, anti-Trop-2 antibody has potent cytotoxicity against diverse epithelial cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, *9*(8), 2276–2286. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0338>

- Chea, A., Hout, S., Bun, S. S., Tabatadze, N., Gasquet, M., Azas, N., Elias, R., & Balansard, G. (2007). Antimalarial activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*. *Journal of ethnopharmacology*, *112*(1), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.02.005>
- Chen, M. B., Shen, W. X., Yang, Y., Wu, X. Y., Gu, J. H., & Lu, P. H. (2011). Activation of AMP-activated protein kinase is involved in vincristine-induced cell apoptosis in B16 melanoma cell. *Journal of cellular physiology*, *226*(7), 1915–1925. <https://doi.org/10.1002/jcp.22522>
- Costanzi, J., Sidransky, D., Navon, A., & Goldsweig, H. (2005). Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase. *Cancer investigation*, *23*(7), 643–650. <https://doi.org/10.1080/07357900500283143>
- Deptala, A., Halicka, H. D., Ardelt, B., Ardelt, W., Mikulski, S. M., Shogen, K., & Darzynkiewicz, Z. (1998). Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase. *International Journal of Oncology*, *13*(1), 11–16. <https://doi.org/10.3892/ijo.13.1.11>
- Dickson, K. A., Haigis, M. C., & Raines, R. T. (2005). Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, *80*, 349–374. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(05\)80009-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(05)80009-1)
- Fagagnini, A., Pica, A., Fasoli, S., Montioli, R., Donadelli, M., Cordani, M., Butturini, E., Acquasaliente, L., Picone, D., & Gotte, G. (2017). Onconase dimerization through 3D domain swapping: structural investigations and increase in the apoptotic effect in cancer cells. *The Biochemical journal*, *474*(22), 3767–3781. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170541>
- Halicka, D.H., Pozarowski, P., Ita, M., Ardelt, W.J., Mikulski, S.M., Shogen, K., & Darzynkiewicz, Z. (2002). Enhancement of activation-induced apoptosis of lymphocytes by the cytotoxic ribonuclease onconase (Ranpirnase). *International Journal of Oncology*, *21*, 1245-1250. <https://doi.org/10.3892/ijo.21.6.1245>
- Halicka, H. D., Murakami, T., Papageorgio, C. N., Mittelman, A., Mikulski, S. M., Shogen, K., & Darzynkiewicz, Z. (2000). Induction of differentiation of leukaemic (HL-60) or prostate cancer (LNCaP, JCA-1) cells potentiates apoptosis triggered by onconase. *Cell proliferation*, *33*(6), 407–417. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2000.00186.x>
- Hodge, T., Draper, K., Brasel, T., Freiberg, A., Squiquera, L., Sidransky, D., ... Taxman, D. J. (2016). Antiviral effect of ranpirnase against Ebola virus. *Antiviral Research*, *132*, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.06.009>
- Holloway, D. E., Singh, U. P., Shogen, K., & Acharya, K. R. (2011). Crystal structure of Onconase at 1.1 Å resolution - Insights into substrate binding and collective motion. *FEBS Journal*, *278*(21), 4136–4149. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08320.x>

- Iordanov, M. S., Ryabinina, O. P., Wong, J., Dinh, T. H., Newton, D. L., Rybak, S. M., & Magun, B. E. (2000). Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer research*, 60(7), 1983–1994.
- Ita, M., Halicka, H. D., Tanaka, T., Kurose, A., Ardelt, B., Shogen, K., & Darzynkiewicz, Z. (2008). Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines, *Cancer Biology & Therapy*, 7:7, 1104-1108, <https://doi.org/10.4161/cbt.7.7.6172>
- Jakóbiśiak, M., Bruno, S., Skierski, J. S., & Darzynkiewicz, Z. (1991). Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3628–3632. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3628>
- Jochmans, D., & Neyts, J. (2019). The path towards effective antivirals against rabies. *Vaccine*, 37(33), 4660–4662. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.051>
- Juan, G., Ardelt, B., Li, X., Mikulski, S. M., Shogen, K., Ardelt, W., ... Darzynkiewicz, Z. (1998). G1 arrest of U937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16(INK4A), P21(WAF1/CIP1) and p27(KIP) and decreased pRb phosphorylation. *Leukemia*, 12(8), 1241–1248. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401100>
- Kelemen, B. R., Klink, T. A., Behlke, M. A., Eubanks, S. R., Leland, P. A., & Raines, R. T. (1999). Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic acids research*, 27(18), 3696–3701. <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.3696>
- Kim, D. H., Kim, E. J., Kalota, A., Gewirtz, A. M., Glickson, J., Shogen, K., & Lee, I. (2007). Possible mechanisms of improved radiation response by cytotoxic RNase, Onconase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. *Advances in experimental medicine and biology*, 599, 53–59. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71764-7_8
- Kowalik, M., Witkowska, M., & Smolewski, P. (2020). Ribonucleases and Immunoribonucleases as Potential Modalities of Anticancer Therapy. *Drug and drug abuse (Scientific Report)* <http://dx.doi.org/10.31487/j.DDA.2020.01.04>
- Lee, J. E., & Raines, R. T. (2003). Contribution of active-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity. *Biochemistry*, 42(39), 11443–11450. <https://doi.org/10.1021/bi035147s>
- Lee, J.E., Raines, R.T. (2008). Ribonucleases as Novel Chemotherapeutics. *BioDrugs*, 22, 53–58. <https://doi.org/10.2165/00063030-200822010-00006>
- Leland, P. A., Staniszewski, K. E., Kim, B., & Raines, R. T. (2000). A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease. *FEBS letters*, 477(3), 203–207. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01804-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01804-4)
- Li, J., & Boix, E. (2021). Host Defence RNases as Antiviral Agents against Enveloped Single Stranded RNA Viruses. *Virulence*. Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1871823>

- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>
- Messmore, J. M., Fuchs, D. N., & Raines, R. T. (1995). Ribonuclease a: revealing structure-function relationships with semisynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 117(31), 8057–8060. <https://doi.org/10.1021/ja00136a001>
- Michaelis, M., Cinatl, J., Anand, P., Rothweiler, F., Kotchetkov, R., von Deimling, A., Doerr, H. W., Shogen, K., & Cinatl, J., Jr (2007). Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer letters*, 250(1), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.09.018>
- Mikulski, S., Viera, A., & Shogen, K. (1992). Invitro synergism between a novel amphibian oocytic ribonuclease (onconase(r)) and tamoxifen, lovastatin and Cisplatin, in human ovcar-3 ovarian-carcinoma cell-line. *International journal of oncology*, 1(7), 779–785.
- Morita, K., Nakamura, M., Nagamachi, M., Kishi, T., & Miyachi, Y. (2002). Seventeen cases of alopecia areata: combination of SADBE topical immunotherapy with other therapies. *The Journal of dermatology*, 29(10), 661–664. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2002.tb00199.x>
- Mosimann, S. C., Ardelt, W., & James, M. N. (1994). Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity. *Journal of molecular biology*, 236(4), 1141–1153. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(94)90017-5)
- Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T., & Kjekken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical journal*, 377(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BJ20031000>
- Notomista, E., Catanzano, F., Graziano, G., Dal Piaz, F., Barone, G., D'Alessio, G., & Di Donato, A. (2000). Onconase: an unusually stable protein. *Biochemistry*, 39(30), 8711–8718. <https://doi.org/10.1021/bi000415x>
- Ohta, T., & Morita, K. (1990). *Rinsho hoshasen*. *Clinical radiography*, 35(4), 471–474
- Qiao, M., Zu, L. D., He, X. H., Shen, R. L., Wang, Q. C., & Liu, M. F. (2012). Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.67>
- Rodríguez, M., Torrent, G., Bosch, M., Rayne, F., Dubremetz, J.F., Ribó, M., Benito, A., Vilanova, M., and Beaumelle, B. (2007). Intracellular pathway of onconase that enables its delivery to the cytosol. *Journal of Cell Science* 120(8), 1405–1411. <https://doi.org/10.1242/jcs.03427>
- Rybak, S. M., Pearson, J. W., Fogler, W. E., Volker, K., Spence, S. E., Newton, D. L., Mikulski, S. M., Ardelt, W., Riggs, C. W., Kung, H. F., & Longo, D. L. (1996). Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(11), 747–753. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.11.747>

- Sancéau, J., Hiscott, J., Delattre, O., & Wietzerbin, J. (2000). IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene*, 19(30), 3372–3383. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203670>
- Sarkar, D., Lebedeva, I. V., Gupta, P., Emdad, L., Sauane, M., Dent, P., Curiel, D. T., & Fisher, P. B. (2007). Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7)/IL-24: a 'magic bullet' for cancer therapy?. *Expert opinion on biological therapy*, 7(5), 577–586. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.5.577>
- Saxena, A., Saxena, S. K., & Shogen, K. (2009). Effect of onconase on double-stranded RNA in vitro. *Anticancer Research*, 29(4), 1067–1072.
- Saxena, S. K., Gravell, M., Wu, Y. N., Mikulski, S. M., Shogen, K., Ardelt, W., & Youle, R. J. (1996). Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20783–20788. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20783>
- Saxena, S. K., Shogen, K., & Ardelt, W. (2003). ONCONASE® and Its Therapeutic Potential. *Laboratory Medicine*, 34(5), 380–387. <https://doi.org/10.1309/3td26gxn65gce1bg>
- Saxena, S. K., Sirdeshmukh, R., Ardelt, W., Mikulski, S. M., Shogen, K., & Youle, R. J. (2002). Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 15142–15146. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108115200>
- Smith, T. G., Jackson, F. R., Morgan, C. N., Carson, W. C., Martin, B. E., Gallardo-Romero, N., ... Hutson, C. L. (2020). Antiviral ranpirnase TMR-001 inhibits rabies virus release and cell-to-cell infection in vitro. *Viruses*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/v12020177>
- Squiquera, L., Taxman, D. J., Brendle, S. A., Torres, R., Sulley, J., Hodge, T., ... Sidransky, D. (2017). Ranpirnase eradicates human papillomavirus in cultured cells and heals anogenital warts in a Phase i study. *Antiviral Therapy*, 22(3), 247–255. <https://doi.org/10.3851/IMP3133>
- Suhasini, A. N., & Sirdeshmukh, R. (2006). Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12201–12209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504488200>
- Thomas, S., Quinn, B. A., Das, S. K., Dash, R., Emdad, L., Dasgupta, S., Wang, X. Y., Dent, P., Reed, J. C., Pellecchia, M., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2013). Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(1), 61–75. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.733001>
- Thompson, J. E., & Raines, R. T. (1994). Value of general Acid-base catalysis to ribonuclease a. *Journal of the American Chemical Society*, 116(12), 5467–5468. <https://doi.org/10.1021/ja00091a060>
- Tökés, Z. A., & Clawson, G. A. (1989). Proteolytic activity associated with the nuclear scaffold. The effect of self-digestion on lamins. *The Journal of biological chemistry*, 264(25), 15059–15065.

Tsai, S. Y., Hsieh, T. C., Ardelt, B., Darzynkiewicz, Z., & Wu, J. M. (2002). Combined effects of onconase and IFN-beta on proliferation, macromolecular syntheses and expression of STAT-1 in JCA-1 cancer cells. *International journal of oncology*, 20(5), 891–896.

Turcotte, R. F., Lavis, L. D., & Raines, R. T. (2009). Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *FEBS Journal*, 276(14), 3846–3857. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07098.x>

Vert, A., Castro, J., Ribó, M., Benito, A., & Vilanova, M. (2017). Activating transcription factor 3 is crucial for antitumor activity and to strengthen the antiviral properties of Onconase. *Oncotarget*, 8(7), 11692–11707. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14302>

Wu, Y., Mikulski, S. M., Ardelt, W., Rybak, S. M., & Youle, R. J. (1993). A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 268(14), 10686–10693.

Zhao, H., Ardelt, B., Ardelt, W., Shogen, K., & Darzynkiewicz, Z. (2008). The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA). *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(20), 3258–3261. <https://doi.org/10.4161/cc.7.20.6855>