

LLIURAMENT SELECTIU DE FÀRMACS A CÈL·LULES MARE METASTÀTIQUES

DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmic Corresponent

Il·lustre Sr. Dr. Ramon Mangués Bafalluy

Celebrat el dia 8 de novembre de 2021

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmic Numerari

Excel·lentíssim Sr. Dr. Alfons del Pozo Carrascosa

Barcelona
2021

*L'Acadèmia no es fa solidària de
les opinions que s'exposen en les publicacions,
de les quals és responsable l'autor.*



Generalitat de Catalunya
Departament de Justícia

Amb la col·laboració del Departament de
Justícia de la Generalitat de Catalunya

Dipòsit legal: B-16846-2021
TIRO Y RETIRO

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmic Numerari

Excel·lentíssim Sr. Dr. Alfons del Pozo Carrascosa

**Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

Vull agrair la deferència que ha tingut la Junta de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, en designar-me per a fer la presentació del Dr. Ramon Mangues Bafalluy, en aquest acte solemne i protocol·lari en el transcurs del qual el nou Acadèmic Corresponent llegirà el seu reglamentari discurs d'ingrés.

RAMON MANGUES (Alfarràs, 1957), és Llicenciat (1981) i Doctor en Farmàcia (1982) per la Universitat de Navarra. Accedeix via FIR a l'especialitat de Farmàcia Hospitalària, realitzant la seva Residència a la Clínica Universitària de Navarra on exerceix a continuació com a Farmacèutic Adjunt del seu Servei de Farmàcia (1983-1988), simultaniejant aquesta ocupació amb el treball experimental de la seva Tesi Doctoral i la de Professor Ajudant de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Navarra (1986-1988).

Passa a continuació a formar part del New York University Medical Center, primer com a Becari Postdoctoral (1988-1992) i a continuació com a Investigador Adjunt (Assistant Research Scientist) (1992-1998).

Al seu retorn a Barcelona, s'integra a l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, primer com a Cap de Laboratori, i posteriorment com a Investigador Estabilitzat nivell A del programa

I3 del Sistema Nacional de Salud, a través de l'Institut de Salud Carlos III, assolint a finals de 2005 el càrrec de Professor d'Investigació. Tanmateix, el Professor Mangués ha format part del comitè directiu d'aquesta institució entre 1998 i 2010. Actualment és el cap del Grup de recerca d'oncògenesi i antitumorals i Subdirector de l'àrea d'oncologia.

L'àmbit principal de les seves línies i treballs de recerca es focalitza en el desenvolupament de models de càncer per a l'estudi del mecanisme molecular de les metàstasis, que actualment utilitza en el desenvolupament preclínic de nous medicaments antimetastàtics basats en nanopartícules proteiques que permeten l'alliberació específica de fàrmacs en cèl·lules mare metastàtiques.

És autor de més de 155 publicacions a revistes d'alt índex d'impacte dels àmbits de l'oncologia, la nanomedicina i la biotecnologia, així com de 9 patents, 5 de les quals estan llicenciades a l'spin-off de Sant Pau Nanoligent. Manté una col·laboració estreta en el desenvolupament de nous medicaments amb empreses tals com Pharma Mar, Laboratoris Dr. Esteve o Argon Pharma i ha estat, fins a dia d'avui director de 16 tesis doctorals.

El professor Mangués és membre de la Xarxa Nacional de Nanomedicina (CIBER-BBN), i actua a nivell de la seva Junta Directiva com a coordinador de recerca en medicina translacional. També és membre del Comitè Científic Intern de l'Institut de Recerca Josep Carreras.

Ha estat Investigador Principal i Coordinador de més de 31 Projectes Públics competitiu, entre els que s'inclouen programes de transferència industrial de la Unió Europea, així com programes internacionals amb participació de pymes. El seu grup de recerca pertany a la Infraestructura Europea per a la Medicina Traslacional, a la Plataforma Europea de Nanomedicina i a una Infraestructura Científica Singular anomenada NANBIOSIS, que ha estat reconeguda pel Consell de Política Científica, Tecnològica i Innovació (CPCTI) del Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats (MINECO) per a la recerca en nanomedicina.

Participa a diferents nivells en Projectes Industrials de nombroses

empreses nacionals i internacionals vinculades en l'àmbit de la nanotecnologia i la nanomedicina i és membre del Comitè Científic o del Panell d'Experts que avaluen Projectes de Recerca de diferents Institucions d'àmbit nacional i internacional tals com the Scientific Committee for Clinical Translation de l'Institut National du Cancer (França), l'European Science Foundation, l'Israel Science Foundation, la Swiss National Science Foundation, el Swedish Research Council, la International Union Against Cancer, i la Comisión científico-técnica de Biotecnología de la Agencia Estatal de Investigación de España, entre altres.

No voldria acabar aquesta breu ressenya sense fer esment de que el Dr. Mangués ja té un històric de col·laboració amb la Reial Acadèmia de Catalunya. Així en una de les sessions científiques organitzades per la secció setena vaig tenir el plaer de presentar al Dr. Mangués i de moderar l'interessant col·loqui que va seguir a la seva exposició "Desenvolupament de nanopartícules per a l'entrega dirigida de fàrmacs a cèl·lules metastàtiques" en la que ens va presentar un estat de l'art d'uns dels temes centrals de la seva recerca, i que va ser el punt de partida del malauradament massa llarg procés (això passava el 9 de juny de 2016) que avui conclou amb la seva recepció com a Acadèmic.

Encara que hi hauria molt més a dir i a precisar sobre la trajectòria professional del Dr. Mangués, de la qual he intentat assenyalar exclusivament el que, modestament, he considerat més rellevant, per acabar, vull felicitar-lo en nom propi i en el de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, amb el convenciment de que en tot moment sabrà correspondre a l'honor que li atorga aquesta Docta Corporació, a la que les aportacions del nou membre enriquiran i contribuiran a fer-la més gran, més nova i amb un major prestigi.

Moltes gràcies.

**LLIURAMENT SELECTIU DE FÀRMACS
A CÈL·LULES MARE METASTÀTIQUES**

**Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

Preàmbul

Agraeixo sincerament a tots el membres que componen aquesta Acadèmia, al seu President i a la seva Secretària General, i especialment als Srs. Acadèmics Drs. Alfonso del Pozo Carrascosa, Joan Uriach Marsal i Maria Antònia Mangues que van proposar-me com a Acadèmic corresponent de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya i a aquesta distingida Institució per acceptar la meva candidatura. Aquest reconeixement suposa un gran honor, que accepto amb humilitat i gratitud, en un marc tan emblemàtic com la seu de la Farmàcia de l'antic Hospital de la Santa Creu, ara seu de la RAFC.

Agraeixo també i molt especialment al Professor Dr. Alfons del Pozo la seva generosa presentació de la meva trajectòria professional i de la meva persona en relació a la meva elecció com a membre d'aquesta Acadèmia.

Vull dedicar les primeres paraules d'aquest discurs als meus pares, Josep i Irene, que malauradament no poden estar avui aquí amb nosaltres. Descansin en pau!. A ells dec haver assolit el privilegi de poder dedicar-me a la recerca. La seva visió i els seus sacrificis personals van permetre oferir als seus fills la possibilitat d'accedir a la Universitat en un entorn que dificultava enormement aquesta via d'accés al coneixement.

El meu pare va ser un pagès mutant d'Alfarràs, a la comarca del Segrià. Ens recordava de manera persistent la seva visió que l'esforç i la generació de coneixement són les úniques vies de progrés sostenible i ens demostrava en el dia a dia la seva voluntat ferma de complir el seu somni de fer possible el nostre accés a l'estudi en les millors Institucions. De fet, l'estudi ha estat una prioritat absoluta, quasi sagrada, dins la nostra família.

La meva mare va estar dedicada completament a assegurar el benestar de la família i a la cura dels fills. La seva empatia prioritzava sempre donar resposta a les necessitats dels altres abans que les pròpies. L'Alzheimer va trastocat el seu paper; per tenir el privilegi d'assumir nosaltres la seva cura. De la seva base moral, i sense tenir la pretensió d'assemblar-me a ella, deriva, probablement, la meva necessitat d'aplicar el coneixement a la resolució dels problemes de salut de les persones per a augmentar el seu benestar.

Tot i així, la persona que ha fet possible mantenir la meva trajectòria científica ha estat la Dra. Adela Zabalegui, la meva parella, a la que admiro i a qui vaig tenir la sort de conèixer a la Universitat de Navarra. Ella ha estat la persona que m'ha ajudat a afrontar els reptes monumentals que exigeix la dedicació a la recerca, i a qui veig com una digna representant d'una família increïblement cohesionada, acollidora i empàtica. Portem ja més de trenta anys de complicitat i de compromís amb la cultura de l'esforç. A Nova York tots dos vam fer la nostra revolució silenciosa, aprenent a fer ciència i a aplicar-la en el progrés de les respectives àrees de coneixement: la infermeria i la farmàcia.

Vull agrair al nostre estimat fill Òscar, i a la seva parella Paula, la seva capacitat d'adaptar-se als canvis en l'entorn que ens ha tocat viure, alhora que compartir els valors de la família i de l'esforç com a millors instruments per fer efectiu el seu pla de vida. Desitjo i auguro que el seu precoç assoliment de criteri propi, l'autonomia en la presa de decisions i la capacitat analítica i comunicativa continuarà impulsant, tant la seva vida personal com la professional.

Als meus germans, agraeixo la seva complicitat i el plaer de compartir discussions i la presa de decisions col·legiades. Tots quatre hem acon-

seguit doctorar-nos i especialitzar-nos, una demostració que a través de l'estudi és possible que membres de la classe treballadora passin a ser professionals altament especialitzats en una sola generació. Vull agrair, però, a la meva germana gran, l'Antònia, membre numerari d'aquesta Reial Acadèmia, que ens obrís el camí cap a la Universitat; sense la demostració inequívoca de la seva vàlua i solvència en l'estudi, jo no hagués tingut accés a una mobilitat social ascendent. Per la visió de mon pare i la intel·ligència i tenacitat de l'Antònia, els meus germans Irene i Josep, s'han guanyat a cop d'esforç i compromís el ser professionals reconeguts en els seus camps d'expertesa, la farmàcia i les telecomunicacions.

No vull oblidar-me dels amics del meu poble, el Lluís i el Rufo en l'època grisa de la infància i l'adolescència, dels de la Universitat, el Juanjo i el Vicenç, en l'època gloriosa de Pamplona, quan encara teníem poques responsabilitats, moltes celebracions, i un fort sentiment de pertinença al grup.

Als meus mestres de la Clínica Universitària de Navarra, els Professors Joaquín Giráldez i Antoni Brugarolas, pel seu entusiasme i dedicació, i per donar-me l'oportunitat de iniciar-me en la Farmàcia Clínica i l'ús racional de medicaments, quan cursava la Residència en Farmàcia Hospitalària. I també pel seu compromís amb la recerca i la direcció de la meva tesi doctoral sobre farmacocinètica intra-arterial de cisplatí en pacients amb osteosarcoma i en models animals, finançada per un projecte del Fondo de Investigaciones Sanitarias. Gràcies a la interacció amb els pacients, en aquesta Institució, vaig assumir el compromís de desenvolupar la farmàcia molecular, fent recerca bàsica orientada a la clínica, sobre els mecanismes d'acció dels fàrmacs, amb l'objectiu de donar esperança als malalts alhora que d'intentar resoldre els problemes de la terapèutica oncològica.

Durant aquest període, vaig fer una estada a l'Istituto Mario Negri de Milà, per aprendre cromatografia líquida aplicada a la determinació de fàrmacs en teixits, entrant en contacte amb investigadors d'aquest Centre que començaven a aprendre clonatge molecular seguint el manual de Tom Maniatis (1982). A la meva tornada, mentre preparava una comunicació a un Congrés sobre terapèutica amb compostos de platí a la biblioteca de la Universidad de Navarra, va caure a les

meves mans un volum de *Methods in Enzymology* dedicat a ADN Recombinant (Wu 1979), que va acabar de definir el camí que volia seguir en recerca.

Vull agrair molt sincerament al meu mestre en recerca, el Professor Àngel Pellicer, que em donés l'oportunitat d'aprendre enginyeria genètica en el seu laboratori del New York University Medical Center, punter en l'estudi dels mecanismes de tumorigènesi per oncogens ras. Va ser una experiència transformadora, de quasi 10 anys, primerament amb ajuts de mobilitat del FIS i NATO i després amb fons d'agències americanes, en la que vaig generar models transgènics dels oncogens ras, per estudiar el seu mecanisme d'oncogènesi i de desregulació de les vies de proliferació i apoptosi, emprant tècniques de biologia cel·lular i molecular que incloïa l'anàlisi d'ADN, RNA i proteïnes. Ell em va transmetre la passió per la recerca, la perseverança, el rigor metodològic i la necessitat d'estar al dia en els avenços assolits en la nostra àrea d'interès i en incorporar les noves tecnologies.

Agraeixo al Dr. Joaquim Bonal, Director del Servei de Farmàcia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Director Científic del seu Institut de Recerca, l'oportunitat d'incorporar-me com a investigador a aquesta Institució i a la Sra. Montserrat Grau, Gerent de facto de l'Institut de Recerca, el seu ajut per establir-me aconseguint un contracte Miguel Servet de l'Institut de Salut Carlos III, així com al Dr. Bonal, al Dr. Manel Trias, Cap de Cirurgia, i al Dr. Miquel Rutllant, Director Mèdic de l'Hospital de Sant Pau, per nomenar-me Cap del Grup d'Oncogènesi i Antitumorals (GOA). El nostre grup ha crescut durant els seus 25 anys d'existència gràcies a tenir la capacitat de desenvolupar noves estratègies de teràpia oncològica.

Vull agrair la dedicació de les 36 persones que han treballat o que treballen al GOA desenvolupant models animals que repliquen el creixement tumoral i la generació de metàstasis en els llocs clínicament rellevants en diversos tipus tumorals. Aquests models han estat eines essencials en l'estudi dels mecanismes de disseminació metastàtica i en el desenvolupament preclínic de fàrmacs antitumorals. Vull agrair especialment, sense poder ser exhaustiu, a les persones que han fet contribucions més significatives al Grup, com són les Dres. o Drs. Isolda Casanova, Ugutz Unzueta, Miquel Àngel Pavón, Virtudes Cés-

pedes, Lourdes Farré, Matilde Parreño, Patricia Álamo, Víctor Pellarès, Aïda Falgàs, Irene Arroyo i Lorena Alba. Durant més de dues dècades hem desenvolupat línies de recerca en Inhibidors de ciclooxigenasa, d'adhesions focals o del receptor del factor de creixement epidèrmic. Més recentment, una jugada mestra del destí va fer possible establir una estreta col·laboració amb el grup del Prof. Antonio Villaverde i de la Dra. Esther Vázquez, de la Universitat Autònoma de Barcelona. Vam fixar l'objectiu comú d'emprar la nanotecnologia per assolir el lliurament dirigit de fàrmacs, aplicat al tractament de tumors sòlids i neoplàsies hematològiques, que descriuré més endavant amb major detall. Per consolidar aquesta incursió en una nova àrea del coneixement biomèdic ha estat essencial la col·laboració amb els Serveis de Cirurgia, Hematologia, Anatomia Patològica, Farmàcia, Otorinolaringologia, Radioteràpia Oncològica i Oncologia Mèdica del nostre Hospital, especialment amb els Drs. Alberto Gallardo, Jordi Sierra, Manel Trias, Francesc Sancho, Vicenç Artigas, Miquel Quer, Xavier León, Agustí Barnadas, Antonio López-Pousa, Josep Balart i David Paez.

Finalitzat aquest preàmbul, passo a exposar el tema científic del discurs sobre "LLIURAMENT DIRIGIT DE FÀRMACS A CÈL·LULES MARE METASTÀTIQUES", introduint, sense entrar en el detall, el progrés en la tecnologia i en el descobriment dels mecanismes d'oncogènesi que ha permès millorar el tractament del càncer, fent un èmfasi especial en aquelles troballes que recolzen les hipòtesis sobre les que el nostre grup ha treballat per tal de fer una contribució al lliurament dirigit de fàrmacs.

AVENÇOS EN LA COMPRESIÓ MECANÍSTICA DEL CÀNCER

El progrés tecnològic assolit durant el segle passat i durant aquestes dues dècades del segle XXI ha permès identificar les alteracions en l'ADN dels pacients oncològics i estudiar-ne les seves conseqüències funcionals en cultius cel·lulars i en models animals, que representen un salt qualitatiu en el descobriment dels mecanismes de tumorigènesi i metastagènesi. A més a més, la seqüenciació de nova generació

i altres tecnologies òmiques, amb elevada sensibilitat i especificitat, han permès identificar noves anomalies genètiques i epigenètiques, augmentant la precisió en la definició dels mecanismes d'oncogènesi en cada tumor. Aquests avenços estan facilitant el desenvolupament de fàrmacs efectius i específics que tenen com a diana cada una d'aquestes alteracions, així com la detecció anticipada del desenvolupament de resistència als tractaments clàssics i actuals i l'estudi del seu mecanisme (McKenzie AJ 2019).

D'altra banda, una de les teories, recolzada per nombrosos treballs previs, que està tenint més impacte en la comprensió del càncer i de la terapèutica oncològica, postula que només un subgrup de les cèl·lules tumorals (denominades cèl·lules mare tumorals, CMTs) són responsables del seu creixement, no sent-ho les cèl·lules tumorals diferenciades derivades de les CMTs (Reya 2001, Kreso 2014). D'aquesta teoria es desprèn que, per a ser efectius, els fàrmacs antitumorals han de ser capaços d'eliminar les CMTs (Reya 2001).

AVENÇOS EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER

La quimioteràpia actual utilitza fàrmacs de baixa massa molecular que inhibeixen la proliferació de les cèl·lules tumorals. Per a ser efectiva cal utilitzar la seva dosi màxima tolerada, fet que indueix una elevada toxicitat en teixits no tumorals amb alta taxa proliferativa, donant lloc a efectes adversos com ara la mielosupressió o la toxicitat gastrointestinal, i presentant, per tant, un baix índex terapèutic (Hong 2010).

El coneixement de les mutacions oncogèniques ha permès iniciar la teràpia racional basada en el desenvolupament de fàrmacs amb diana definida, que actuen inhibint la senyalització proliferativa i anti-apoptòtica de proteïnes oncogèniques que mantenen el creixement del tumor. El desenvolupament d'estratègies de cribratge d'alta capacitat ha facilitat la ràpida identificació de compostos de baixa massa molecular que actuen com a inhibidors d'aquestes dianes proteïques, que són la base per al posterior desenvolupament de fàrmacs amb òptimes propietats farmacocinètiques (Bialkowska 2012). D'aquesta manera s'han introduït al mercat nombrosos fàr-

macs obtinguts per síntesi química. També s'han incorporat a la teràpia oncològica i els anticossos monoclonals, obtinguts mitjançant biotecnologia, que inhibeixen específicament les proteïnes diana.

Ambdues aproximacions han millorat significativament la teràpia oncològica en alguns tipus tumorals, però, inesperadament, la teràpia molecular amb diana definida beneficia només a un percentatge reduït de pacients, ja que la resposta tumoral en la majoria dels casos no incrementa la supervivència del malalt degut al ràpid desenvolupament de resistència cel·lular al tractament per mutació gènica, o per activació de mecanismes de compensació o de vies de senyalització alternatives que mantenen el seu creixement (Fojo 2010, Lackner 2012, Chandralapaty 2012, Huang 2014). D'altra banda, els fàrmacs amb diana definida desenvolupen toxicitats inesperades en cèl·lules no tumorals, que no estan relacionades amb la proteïna diana, limitant la seva dosificació (Dy 2013). Per aquests motius, persisteix la necessitat de desenvolupar aproximacions terapèutiques alternatives que milloren aquests resultats.

La nanomedicina, definida com l'ús de compostos d'una mida en el rang entre 10 i 200 nm, millora la farmacocinètica dels fàrmacs de baixa massa molecular reduint la filtració renal i el metabolisme hepàtic, i augmentant la seva vida mitjana en sang. Aquestes característiques permeten, en teoria, augmentar l'efecte terapèutic mitjançant un adreçament passiu. Aquest tipus d'adreçament es basa en la seva acumulació en teixit tumoral com a conseqüència de l'efecte de permeabilitat i retenció de partícules que presenten els tumors, a l'hora que reduir la seva toxicitat sistèmica (Das 2009). No obstant, malgrat aquesta promesa, la captació de les nanomedicines desenvolupades fins ara arriba només al 0.7% de la dosi administrada (Wilhelm S 2016).

Queda, per tant, encara pendent la millora de la captació tumoral de les nanomedicines, que podria aconseguir-se si fóssim capaços d'entregar el fàrmac selectivament al tumor mitjançant un adreçament actiu. Aquesta selectivitat en l'entrega del fàrmac es basa en la introducció d'un lligand d'un receptor expressat en la membrana de la cèl·lula tumoral diana que augmenta la seva internalització cel·lular, i com a conseqüència la seva captació en el tumor. Malgrat aquest tipus

d'aproximació, els intents d'adreçament actiu no s'havien fet encara efectius. Creiem que la formació d'una corona proteica que recobreix la superfície de la nanopartícula just després de ser injectada en el torrent sanguini és responsable de la pèrdua de capacitat d'adreçament *in vivo*, que demostren tenir en cultiu cel·lular, una troballa que afecta a les nanopartícules no proteiques (polimèriques, inorgàniques, dendrímers, liposomes, quantum dots) (Salvati 2013, Cai 2018).

DESENVOLUPAMENT D'UNA NANOMEDICINA QUE PREVÉ L'APARICIÓ DE METÀSTASIS

Com he mencionat abans, l'entrada del Grup d'Oncogènesi i Antitumorals de l'Institut de Recerca de l'Hospital de Sant Pau el 2008 en la xarxa d'excel·lència CIBER del Instituto de Salud Carlos III, en l'àrea de Nanomedicina, ens va permetre establir una estreta col·laboració amb el grup de Nanobiotecnologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, liderat pel Professor Antonio Villaverde i la Dra. Esther Vázquez, una col·laboració que continua més viva que mai. La complementarietat en l'expertesa d'ambdós grups, va oferir-nos l'oportunitat de combinar l'enginyeria de proteïnes amb el desenvolupament preclínic de fàrmacs en una àrea frontera, com és el lliurament dirigit de fàrmacs a cèl·lules mare metastàtiques (CMMs), les cèl·lules responsables de l'inici i manteniment de les metàstasis.

Aquest treball en marxa vol donar resposta a una necessitat clínica no coberta, com és el control de la disseminació metastàtica, la primera causa de mort per càncer (Riihimäki 2016). L'objectiu és desenvolupar una nanomedicina, en forma de nanoconjugat (conjugat fàrmac-nanopartícula proteica obtingut per síntesi química) capaç de prevenir l'aparició de metàstasis. Aquest efecte s'aconsegueix assolint l'eliminació selectiva de les CMMs, un subgrup de cèl·lules mare tumorals (CMTs) que a més d'auto-replicar-se i diferenciar-se mostren capacitats de tràfic cel·lular, com són la invasió o la intravasació (Stegg 2016, Brabletz 2005, Sleeman 2010, Oskarsson 2014).

Per aconseguir efecte antimetastàtic, vam proposar eliminar selectivament les CMMs, mitjançant l'adreçament de la nanomedicina al receptor de quimiocines CXCR4 en un model animal de càncer colo-

rectal (CCR), ja que s'havia demostrat prèviament que les cèl·lules tumorals de CCR CXCR4+ són CMMs en tenir capacitat iniciadora de metastasis (Zhang 2012, Wang 2014). També recolzaven la proposta els treballs en pacients amb CCR que havien demostrat una associació entre la sobre-expressió de CXCR4 en el tumor i l'augment de metastasis i recidiva tumoral, així com la reducció de la supervivència dels malalts (Kim 2005, 2006; Schimanski 2005).

El nostre propòsit era, doncs, aconseguir l'adreçament actiu de la nanomedicina que produís el lliurament selectiu del fàrmac a CMMs, les cèl·lules responsables de la iniciació i manteniment del càncer, explotant la sobre-expressió del receptor CXCR4 en la seva membrana (cèl·lules CXCR4+), en comparació a l'expressió del receptor en teixits normals. La interacció de la nanomedicina amb el receptor induiria la seva internalització selectiva en la cèl·lula tumoral, que seguiria amb el lliurament del fàrmac que transporta, augmentant molt significativament la seva concentració en el citosol cel·lular. Esperàvem que l'increment de la concentració del fàrmac induís la mort selectiva de les cèl·lules diana CXCR4+ en el tumor primari i en les lesions metastàtiques amb la conseqüent inducció d'efecte antimetastàtic.

A diferència de l'elevada captació del fàrmac en el tumor, en teixits normals es produeix una reducció significativa o una manca completa de captació de la nanomedicina i, per tant, del fàrmac que transporta. Com a conseqüència, en el rang de dosificació en el que la nanomedicina demostra un potent efecte antimetastàtic, no indueix toxicitat o efectes adversos, a diferència del que succeeix amb la teràpia clàssica. Cal remarcar que aquesta estratègia dirigida selectivament a cèl·lules tumorals a través d'un receptor, no persegueix la seva mort per inhibició de la senyalització a partir del receptor sinó, utilitzar el receptor per lliurar el fàrmac selectivament al citosol de les cèl·lules diana, per a que sigui el fàrmac lliurat el que indueixi la seva mort (Unzueta 2015).

Sobre aquesta base, hem produït concretament la nanomedicina T22-GFP-H6-FdU, un nanoconjugat generat per la unió covalent de Floxuridina (un agent genotòxic utilitzat en el tractament de metastasis hepàtiques en CCR (Shi 2015)), a una proteïna de fusió. Aquesta proteïna es genera per enginyeria genètica, incorporant en un únic

polipèptid un lligand peptídic capaç d'interaccionar amb el receptor CXCR4, la seqüència de la proteïna verda fluorescent que permet el seguiment de la seva biodistribució després de ser administrada en animals. També incorpora un domini policatiónic a l'extrem C-terminal que li confereix als monòmers proteics la capacitat d'auto-acoblar-se per formar una nanopartícula estable en el torrent sanguini. El nanoconjugat derivat d'aquesta nanopartícula manté l'estabilitat en sang, evitant el seu aclariment renal i augmentant la seva vida mitjana (Unzueta 2012, Céspedes 2014).

Gràcies a la capacitat del nanoconjugat d'emetre fluorescència hem demostrat una captació del 85% de la dosi administrada en el tumor i la seva internalització selectiva en cèl·lules CXCR4+ del tumor primari i lesions metastàtiques en models animals de CCR, així com un lliurament selectiu de Floxuridina a les CMMs CXCR4+, que és capaç d'induir, com esperàvem, la seva eliminació selectiva. Pensem, que a diferència de les nanomedicines no-proteiques, quan el nostre nanoconjugat proteic s'injecta en sang, no es recobreix d'una corona proteica, motiu pel que manté la capacitat d'internalitzar selectivament en cèl·lules CXCR4+ tumorals *in vivo*, com observem també *in vitro*, en cèl·lules en cultiu (Céspedes 2018).

Després de l'administració intravenosa repetida del nanoconjugat, i en contrast a l'efecte del fàrmac lliure (no conjugat), hem aconseguit induir un potent efecte preventiu i de regressió de les metastasis establertes sense toxicitat sistèmica. A diferència del fàrmac sol, el nanoconjugat s'acumula i internalitza en cèl·lules CXCR4+ generant dany a l'ADN seguit d'apoptosi, que condueix a l'eliminació selectiva d'aquestes cèl·lules. Hem demostrat també que el tractament amb el nanoconjugat redueix la capacitat de les cèl·lules, obtingudes a partir de tumors de CCR CXCR4+ tractats, de reiniciar el càncer i la formació d'èmbols tumorals CXCR4+ capaços d'intravasos en els vasos peri-tumorals del còlon (Céspedes 2018).

L'administració repetida del nanoconjugat, tant en models animals derivats de línies cel·lulars com de tumors de pacients prevé completament el desenvolupament de metastasis en la majoria dels animals tractats, mentre que en la resta dels animals observem una reducció del número i de la mida de lesions metastàtiques en el fetge, el peri-

toneu o en el pulmó, en comparació a l'efecte de l'administració de fàrmac no conjugat. A més a més, les metàstasis amb més expressió del receptor CXCR4, com són les peritoneals, responen més al tractament que les metàstasis amb menys expressió de CXCR4, com les localitzades en els ganglis limfàtics i tenen una reducció del nombre de cèl·lules CXCR4 al final del tractament més important. Tot aquest potent efecte antitumoral s'aconsegueix sense acumulació o toxicitat en teixits normals pel fàrmac que està unit al nanoconjugat. T22-GFP-H6-FdU indueix també un major efecte de regressió de metàstasis establertes que el fàrmac lliure, amb una biodistribució o toxicitat indetectable en teixits no tumorals.

En resum, aquesta nova aproximació que aconsegueix el lliurament dirigit de fàrmacs obté un potent efecte antimetastàtic, mitjançant l'eliminació selectiva de les cèl·lules mare metastàtiques CXCR4+, validant les CMMs com a diana terapèutica en clínica i, per tant, els desenvolupament de fàrmacs dirigits selectivament a CMMs per aconseguir el control de la disseminació metastàtica. Com a conseqüència, aquesta nova aproximació terapèutica aconsegueix augmentar considerablement l'índex terapèutic del fàrmac explotant l'elevada sobreexpressió del receptor CXCR4 en les cèl·lules mare metastàtiques CXCR4 diana, en comparació a l'expressió del receptor en cèl·lules no-tumorals (Céspedes 2018).

TRANSLACIÓ CLÍNICA DEL NANOCONJUGAT ANTIMETASTÀTIC

Creiem que la prevenció de l'aparició de les metàstasis obtinguda pel nostre nanoconjugat en models animals de CCR l'identifica com el primer medicament que assoleix un efecte antimetastàtic selectiu, fet que recolza la necessitat de modificar el desenvolupament de fàrmacs en oncologia, per a canviar l'enfoc actual en el control del tumor primari cap al del control de les metàstasis (Steed 2008, Weber 2013, Steeg, 2016), un nou abordatge que pot tenir un major impacte clínic en ser les metàstasis les responsables de la major part de morts en pacients oncològics (Mehlen 2006, Spano 2012, Riihimäki 2016).

Com a conseqüència del treball conjunt aquí descrit i dels resultats

previs obtinguts entre el grup del Prof. Antonio Villaverde i de la Dra. Esther Vázquez, de la UAB i del nostre grup, i amb la col·laboració de les Unitats de Transferència Industrial de la UAB, Sant Pau i el CIBER, hem generat cinc patents que protegeixen la propietat intel·lectual i la constitució de Nanoligent, una nova empresa biotecnològica, de la que n'és Administrador i President el Dr. Manuel Rodríguez Mariscal, i n'és Directora Executiva la Dra. Montserrat Cano, que està obrint camí cap a la translació clínica i la transferència industrial d'aquests resultats.

En aquest sentit, els resultats obtinguts en models animals de CCR descrits en aquest discurs, ha permès obtenir finançament públic i privat per dur a terme els estudis de preclínica regulatòria, que esperem que ens possibiliti realitzar assajos clínics en humans en el termini de dos anys. També volem incorporar a aquesta estratègia terapèutica un augment de la precisió en la teràpia, ja en l'assaig clínic fase I, seleccionant com a candidats a tractament amb el nanoconjugat aquells pacients que tinguin un tumor amb elevada sobre-expressió del receptor CXCR4. Reclutarem, doncs, en teoria, pacients que tinguin una elevada probabilitat de respondre al tractament, i que a més ens permetrà fer el seguiment de la seva resposta de les metàstasis, quantificant el percentatge de cèl·lules tumorals CXCR4+ que romanen en les lisions metastàtiques al llarg del temps. Seguint aquest procediment esperem assolir medicina de precisió, que incorpora la nanotecnologia.

En base a les troballes obtingudes en models animals, ens hem fixat com a objectiu final en clínica, la utilització del nanoconjugat en el tractament neoadjuvant del càncer colorectal per a inhibir la disseminació metastàtica en estadis primerencs i en pacients amb malaltia local o en pacients amb alt risc de metàstasis, però sense metàstasis clínicament evidents, un objectiu ja proposat el 2012 (Stegg 2012, 2016; Weber 2013).

És important assenyalar que tenim la possibilitat d'utilitzar la mateixa tecnologia per a desenvolupar abordatges terapèutics similars que aconseguixin el control de la disseminació metastàtica en almenys vint-i-tres tipus tumorals addicionals pels que s'ha demostrat també una associació entre cèl·lules tumorals CXCR4+ i augment de metàstasis i mal pronòstic (Balkwill 2004, Croker 2008, Kucia 2005,

Hermann 2007). De fet, la intensa col·laboració entre el grup de la UAB i del GOA, a Sant Pau, ha generat ja resultats d'efecte antitumoral en models animals de leucèmia mieloide aguda i de limfoma difús de cèl·lula gran B, utilitzant nanoconjugats o proteïnes de fusió polipeptídiques que incorporen agents antitumorals, específics per a cada tipus tumoral, obrint així també la porta a la seva translació clínica. Finalment, en el nostre laboratori han finalitzat recentment experiments en animals que demostren que aquest tipus d'aproximació terapèutica bloqueja també la disseminació metastàtica en carcinoma de cap i coll o d'endometri.

En el futur proper volem, també, utilitzar aquest tipus de nanomedicines per iniciar experiments en models animals de CCR que intenten investigar i resoldre nous problemes terapèutics, avaluant concretament la seva efectivitat en el tractament de la recidiva tumoral, tenint en compte que la sobre-expressió de CXCR4 s'associa amb resistència a quimioteràpia en CCR (Dessein 2010, Touil 2014, Chatterjee 2014, Huang 2016, Yu 2017). L'objectiu és ara eliminar les CMMs dorments, no proliferatives, per augmentar la taxa de curació i prolongar la supervivència dels malalts, un repte monumental si es considera la demostrada plasticitat de les cèl·lules tumorals. Així, doncs, tant les CMTs com les CMMs són plàstiques, com ho són també les cèl·lules tumorals diferenciades, que tenen capacitat de des-diferenciar-se i generar noves CMTs o CMMs. Aquests processos determinen el desenvolupament de resistència en la major part de tractaments utilitzats fins ara (Cabrera 2015, Batlle 2017, Doherty 2016).

En resum, creiem que el nostre resultat d'obtenir un elevat efecte antitumoral sense toxicitat sistèmica, mitjançant el lliurament selectiu del fàrmac a CMMs, actualitza el somni de la “bala màgica” que va concebre Paul Ehrlich. El Prof. Ehrlich va postular primer la teoria de la cadena lateral (side chain), que va ser la base per al descobriment dels quimioreceptors i de la seva unió específica a lligands o anticossos. Anys més tard, va iniciar la cerca de compostos químics amb alta afinitat per agents patògens o toxines proposant que aquesta alta afinitat els faria eficaços per tractar la malaltia que provocaven, utilitzant dosis que serien innòcues per al malalt. Com a conseqüència d'aquesta teoria i del seu esforç en el cribratge d'una sèrie de compostos obtinguts per síntesi química, el 1910 va complir el seu somni

identificant el diamido-dioxi-arsenobenzol (comercialitzat com a Salversan) com a fàrmac efectiu per el tractament del *Treponema pallidum*, l'agent causal de la sífilis (Winau 2004)

EL FUTUR DE LA RECERCA

Vull aprofitar l'oportunitat que em brinda tenir una audiència científica distingida per parlar sobre el futur de la recerca en el nostre entorn. Malauradament, des de la crisi del 2008 ha baixat considerablement la inversió en recerca, tant a Catalunya com a l'Estat. La actual pandèmia de COVID-19 no ha ajudat a canviar aquest panorama, un fet que s'ha traduït, especialment, en una dificultat afegida per als joves investigadors i investigadores a l'hora d'incorporar-se al nostre sistema de recerca. Cal revertir aquesta situació, si considerem que la inversió en recerca, desenvolupament i innovació està directament relacionada amb el progrés dels pobles (Georghiou 2015). Necessitem més recursos per a que els investigadors novells que hagin demostrat imaginació, tenacitat, domini metodològic i capacitat deductiva puguin plantejar hipòtesis que els portin a solucionar problemes clínics no resolts, duent a terme investigació original i obrint noves àrees de treball.

La globalització, la digitalització i l'acceleració del món actual porta associada una crisi d'idees, que a part de permetre, malhauradament, als poc estudiosos i ignorants del mètode científic, la difusió de notícies falses, ens permet també accés ràpid a informació veraç i contrastada alhora que genera oportunitats per la innovació i la creació de nous paradigmes. La passió pel coneixement, la col·laboració entre disciplines i l'emoció del descobriment tenen un paper essencial per a resoldre els nous reptes que confrontem dins i fora de l'àrea biomèdica, alhora que ens serveix per destriar el que és cert del que no ho és.

En acabar aquest discurs, vull transmetre que darrera l'esforç pel desenvolupament de nous models animals per l'estudi dels mecanismes de metastasis i del seu ús en el desenvolupament de noves aproximacions terapèutiques hi ha una vida dedicada a la ciència, plena de reptes i de sentit, un privilegi que no pensava poder assolir. Per això vull agrair de nou a cadascun dels membres de la meva adorable família,

els que hi son i els que no hi son, als meus mestres i als investigadors amb qui he tingut la sort de col·laborar, les oportunitats que m'han ofert d'afrontar nous reptes, així com de compartir la passió per la recerca i l'ambició de transformar la societat a través del coneixement.

Confesso tenir la sensació d'haver viscut i de viure intensament i de contribuir modestament a l'avenç de la ciència, intentant solucionar problemes clínics no resolts i generar noves preguntes pendents de ser resoltes, tant pel nostre grup, com per a les següents generacions d'investigadors, en benefici dels pacients.

Moltes gràcies per la seva atenció.

BIBLIOGRAFIA

Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 2004, 14:171-79.

Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* Oct 2017, 23(10):1124-34.

Bialkowska AB, Yang VW. High-throughput screening strategies for targeted identification of therapeutic compounds in colorectal cancer. *Future Oncol.* Mar 2012, 8(3):259-72.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Migrating cancer stem cells-an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005, 5:744-49.

Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells.* Jan 2015, 7(1):27-36.

Cai R, Chen C. The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine. *Adv Mater.* Dec 2018:e1805740.

Céspedes MV, Unzueta U, Tatkiewicz W, Sánchez-Chardi A, Conchillo-Solé O, Álamo P, Xu Z, Casanova I, Corchero JL, Pesarrodonna M, Cedano J, Daura X, Ratera I, Veciana J, Ferrer-Miralles N, Vazquez E, Villaverde A, Manges R. *In vivo* architectonic stability of fully de novo designed protein-only nanoparticles. *ACS Nano*. May 2014, 8(5):4166-76.

Céspedes MV, Unzueta U, Aviñó A, Gallardo A, Álamo P, Sala R, Casanova I, Manges MA, Lopez-Pousa A, Eritja R, Villaverde A, Vázquez E, Manges R. Selective depletion of metastatic stem cells as therapy for human colorectal cancer. *EMBO Mol Med* 10: e8772, 2018.

Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med*. 2008, 12 374-90.

Chandarlapaty S. Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. *Cancer Discov*. Apr 2012, 2(4):311-9.

Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res*. 2014, 124:31-82.

Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009, 6:285-304.

Dessein AF, Stechly L, Jonckheere N, Dumont P, Monté D, Leteurtre E, Truant S, Pruvot FR, Figeac M, Hebbar M, Lecellier CH, Lesuffleur T, Dessein R, Grard G, Dejonghe MJ, de Launoit Y, Furuichi Y, Prévost G, Porchet N, Gerspach C, Huet G. Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res*. Jun 2010, 70(11):4644-54.

Doherty MR, Smigiel JM, Junk DJ, Jackson MW. Cancer Stem Cell Plasticity Drives Therapeutic Resistance. *Cancers (Basel)*. Jan 2016, 8(1). pii: E8.

Dy GK, Adjei AA. Understanding, recognizing, and managing toxi-

cities of targeted anticancer therapies. *CA Cancer J Clin.* Aug 2013, 63(4):249-79.

Fojo T, Parkinson DR. Biologically targeted cancer therapy and marginal benefits: are we making too much of too little or are we achieving too little by giving too much? *Clin Cancer Res.* Dec 2010, 16(24):5972-80.

Georghiou L. Value of Research. Policy Paper by the Research, Innovation, and Science Policy Experts (RISE). European Commission. Directorate-General for Research and Innovation. Brussels, June, 2015. ISBN: 978-92-79-50185-2.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1:313-23.

Hong WK, Hait WN. *Holland Frei Cancer Medicine* Eight Edition, People's Medical Publishing House, Connecticut, USA, 2010, pp. 2021.

Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci.* Jan 2014, 35(1):41-50.

Huang WS, Hsieh MC, Huang CY, Kuo YH1, Tung SY, Shen CH, Hsieh YY, Teng CC, Lee KF, Chen TC, Lee KC, Kuo HC. The Association of CXCR4 Mediated Signaling Pathway with Oxaliplatin-Resistant Human Colorectal Cancer Cells. *PLoS One.* Sep 2016, 11(9):e0159927.

Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol.* 2005, 23:2744-53.

Kim J, Mori T, Chen SL, Amersi FF, Martinez SR, Kuo C, Turner RR, Ye X, Bilchik AJ, Morton DL, Hoon DS. Chemokine receptor

CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg.* 2006, 244:113-20.

Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* Mar 2014, 14(3):275-91.

Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* 2005, 23:879-94.

Lackner MR, Wilson TR, Settleman J. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol.* Aug 2012, 8(8):999-1014.

Maniatis T, Fritsch, EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp. 545.

McKenzie AJ, H Dilks H, Jones SF, Burris H 3rd. Should next-generation sequencing tests be performed on all cancer patients? *Expert Rev Mol Diagn.* Feb 2019, 19(2):89-93.

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:449-58.

Oskarsson T, Batlle E, Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell.* 2014, 14:306-21.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* Nov 2001, 414(6859):105-11.

Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K (2016) Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep* 6: 29765.

Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Bombelli FB, Hristov DR, Kelly PM, Åberg C, Mahon E, Dawson KA. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a

biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol.* 2013 Feb, 8(2):137-43.

Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gönner U, Wilsberg V, Junginger T, Berger MR, Galle PR, Moehler M. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11:1743-50.

Shi L, Zhao J, Lu Q, Chen X, Wang H, Jiang Y, Wu J, Ji M, Xu B, Chen L, Jiang J, Wu C. Initial hepatic artery infusion and systemic chemotherapy for asymptomatic colorectal cancer with un-resectable liver metastasis. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Jan 15;8(1):1000-8.

Sleeman J, Steeg PS. Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur J Cancer.* 2010, 46:1177-80.

Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012, 22:234-249.

Steeg PS, Theodorescu D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008, 5: 206-219.

Steeg PS. The right trials. *Nature.* 2012, 485: S58-S59.

Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2016, 4: 201-218.

Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, Dessein AF, Vandomme J, Monté D, Stechly L, Skrypek N, Langlois C, Grard G, Millet G, Leteurtre E, Dumont P, Truant S, Pruvot FR, Hebbar M, Fan F, Ellis LM, Formstecher P, Van Seuning I, Gespach C, Polakowska R, Huet G. Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin Cancer Res.* Feb 2014, 20(4):837-46.

Unzueta U, Céspedes MV, Ferrer-Miralles N, Casanova I, Cedano J, Corchero JL, Domingo-Espín J, Villaverde A, Mangues R, Vázquez E. Intracellular CXCR4(+) cell targeting with T22-empowered protein-only nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012, 7:4533-44.

Unzueta U, Céspedes MV, Vázquez E, Ferrer-Miralles N, Manges R, Villaverde A. Towards protein-based viral mimetics for cancer therapies. *Trends Biotechnol.* 2015 May;33(5):253-8.

Wang TB, Hu BG, Liu DW, Shi HP, Dong WG. The influence of lentivirus-mediated CXCR4 RNA interference on hepatic metastasis of colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2014, 44: 1861-1869.

Weber GF. Why does cancer therapy lack effective anti-metastasis drugs? *Cancer Lett.* 2013, 2: 207-211.

Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, Chan WCW. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Review Materials*, May 2016, 1:1-12.

Winau F, Westphal O, Winau R. Paul Ehrlich-in search of the magic bullet. *Microbes Infect.* 2004 Jul, 6(8):786-9.

Wu R. Recombinant DNA. *Methods in Enzymology.* 1979, 68:1-555. doi: 10.1016/0076-6879(79)68001-1.

Yu X, Shi W, Zhang Y, Wang X, Sun S, Song Z, Liu M, Zeng Q, Cui S, Qu X. CXCL12/CXCR4 axis induced miR-125b promotes invasion and confers 5-fluorouracil resistance through enhancing autophagy in colorectal cancer. *Sci Rep.* Feb 2017, 7:42226.

Zhang SS, Han ZP, Jing YY, Tao SF, Li TJ, Wang H, Wang Y, Li R, Yang Y, Zhao X, Xu XD, Yu ED, Rui YC, Liu HJ, Zhang L, Wei LX. CD133+ CXCR4+ colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med.* 2012, 10:8.

