



"Construcción, expresión y caracterización de Diabodies anti-antígeno Tn."

Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular

PEDECIBA

Universidad de la República

Lic. Claudia Schvartzman Di Segni

Orientador: Dr. Eduardo Osinaga

Co-orientador: Dr. Pablo Oppezzo

Laboratorio de Glicobiología e Inmunología tumoral

Institut Pasteur de Montevideo

17 de diciembre de 2015

Resumen

En el Uruguay el cáncer es la segunda causa de muerte, situándose por debajo de enfermedades cardiovasculares. La utilización de anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos asociados a tumor es una excelente herramienta diagnóstica en técnicas no invasivas de imagenología molecular como el SPECT y PET. Los Diabodies, compuestos por un dímero de scFv de 55kDa tienen un alto clearance sanguíneo (vida media en sangre de entre 3 a 7 hs), una rápida captación y alta retención tumoral. Estas características los sitúan como moléculas ideales para estudios de imagenología permitiendo la visualización de los tumores pocas horas después de la inyección de los mismos y la racionalización del radioisótopo utilizado.

El antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) es un antígeno carbohidrato asociado a tumor ampliamente caracterizado que se expresa en diferentes tipos de carcinomas y constituye un excelente blanco diagnóstico. El anticuerpo monoclonal murino IgM 83D4 con reconocimiento a Tn ha sido ampliamente caracterizado, generándose a partir de él anticuerpos quiméricos IgG Chi-Tn así como scFv-83D4. En este trabajo nos propusimos la generación de Diabodies anti Tn a partir de la secuencia del AcMo 83D4 con fines diagnósticos.

Para ello se generaron construcciones génicas de Diabodies anti-Tn a partir de las secuencias de las regiones variables de 83D4 y se evaluaron sistemas de expresión heteróloga procariotas y eucariotas.

A nivel procariota en *E. coli*, se evaluó el efecto de la temperatura, medio de cultivo, inductor, co-expresión de chaperonas y métodos de resolubilización de cuerpos de inclusión, así como la fusión con MBP en el espacio periplásmico. Por su parte, se generaron líneas estables de células S2 de *Drosophila* que expresan el Diabody Tn y se evaluaron inductores y tiempos de expresión. El sistema que mostró mejor rendimiento de proteína dimérica pura fue el eucariota, seleccionándose como método de producción de esta proteína.

Se caracterizó el reconocimiento del Diabody expresado por el antígeno Tn in vitro mediante ELISA, BiaCore e Inmunofluorescencia indirecta. A partir de estos ensayos se determinó que el Diabody Tn reconoce de forma específica el antígeno Tn, mostrando sin embargo una rápida disociación, poniendo en evidencia la estrecha relación entre estructura y funcionalidad.

Este trabajo permitió ahondar en el conocimiento de plataformas de expresión de fragmentos de anticuerpos abriendo perspectivas en cuanto al desarrollo de otros fragmentos de anticuerpos anti-Tn con fines imagenológicos que puedan ser evaluados en modelos *in vivo*.

Índice

Resumen	2
Agradecimientos	6
Introducción	7
Cáncer	7
Características del Cáncer.....	7
Terapia antitumoral.....	11
Inmunoterapia antitumoral	12
Inmunoterapia pasiva	12
Inmunoterapia activa	12
Anticuerpos	15
Estructura.....	15
Anticuerpos monoclonales	18
Anticuerpos monoclonales en terapia antitumoral	19
Fragmentos de anticuerpos generados por ingeniería genética.....	23
Fv, scFv, Fab y dominios variables simples	24
Diseños multivalentes.....	25
Diabodies	27
Inmunotoxinas.....	30
Exotoxina A (PE).....	30
Farmacocinética y biodistribución de anticuerpos y derivados.	32
Anticuerpos en diagnóstico de cáncer.	33
Expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes.	36
Sistemas Procariotas <i>E. coli</i>	36
Sistemas eucariotas – Células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Glicosilación de proteínas.....	38
Antígenos de O-glicosilación incompleta y cáncer.....	40
Antígeno Tn y cáncer.....	41
Antecedentes.....	44
Objetivos	47
Objetivos generales	47
Objetivos Específicos	47
Materiales y Métodos	48
Antígeno Tn	48

Secuencias	48
Anticuerpos.....	50
Anticuerpo Monoclonal Chi-Tn	50
Líneas celulares tumorales	51
Sistemas de expresión proteica procariota	51
Vectores	51
Reconstitución de pET28a-DbTn y pET28a-TnT	52
Amplificación y purificación de plásmidos	52
Digestión enzimática.....	52
Microorganismos.....	53
Evaluación de la expresión proteica citoplasmática	54
Expresión proteica en cuerpos de inclusión.....	54
Renaturalización de proteínas expresadas en cuerpos de inclusión.....	55
Renaturalización por dilución.....	55
Renaturalización por diálisis sucesivas	55
Renaturalización en columna.....	56
Expresión proteica en periplasma.....	56
Subclonado a vector pMALp2E.....	56
Expresión proteica y purificación de fracción periplásmica	56
Cromatografía de Afinidad IMAC	57
Sistemas de expresión proteica Eucariota	57
Vectores	57
Reconstitución, amplificación y purificación de los plásmidos pUC57 ^{kan} DbTn y pUC57 ^{kan} DbTnT.....	58
Sub clonado del gen DbTn y DbTnT al plásmido de expresión pT350.....	58
Líneas celulares	60
Generación de una línea celular estable S2-DbTn	60
Co-transfección de células S2	60
Cinética de inducción.....	61
Expresión proteica.....	61
Cromatografía de afinidad StrepTrap	61
Caracterización de las proteínas expresadas.....	62
SDS- PAGE y Western Blot.	62
Cromatografía de exclusión molecular	62
Espectrometría de masa	63
ELISA.....	63
Resonancia plasmónica de superficie (SPR).....	64
Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	65

Resultados	66
Construcción de genes de Diabodies Tn.	66
Expresión y purificación de Diabodies anti-Tn	67
Sistema de expresión procariota.....	67
Expresión citoplasmática en <i>E. coli</i>	67
Resolubilización de cuerpos de inclusión.....	70
Expresión en periplasma	73
Sistema de expresión eucariota	76
Vectores	76
Cinética de Inducción.....	77
Expresión y purificación de DbTn.....	78
Caracterización funcional de Diabodies Tn	80
Estabilidad del dímero DbTn	80
ELISA.....	81
Resonancia plasmónica de superficie (SPR)	82
Inmunofluorescencia indirecta	84
Discusión	86
Construcción de Diabodies anti antígeno Tn.	86
Sistemas de expresión.....	88
Expresión en <i>E. coli</i>	88
Expresión en cuerpos de inclusión	89
Expresión en Periplasma.....	91
Expresión en células de <i>Drosophila</i>	92
Caracterización de Diabody Tn.....	93
Conclusiones	97
Referencias bibliográficas	98
Anexos	113
1. Secuencias de genes Diabody anti antígeno Tn	113
2. Optimización de codones	116
Expresión en <i>E. coli</i>	116
Expresión en <i>Drosophila S2</i>	117
3. Espectrometría de masa	118
DbTn fracción soluble <i>E. coli</i>	118
DbTnT fracción soluble <i>E. coli</i>	119
DbTn expresado en <i>Drosophila</i>	121

Agradecimientos

A todos aquellos que de una forma u otra participaron de este trabajo, académica y anímicamente, en particular:

A mi familia por la dedicación, el apoyo y el cariño incondicional. A mis padres, hermanos, cuñados, tíos y sobretodo a mis sobrinos por su dulzura.

A mis amigas por los consejos, la paciencia, el cariño y los momentos compartidos los alegres y los otros.

A Eduardo por su contribución en mi formación, por confiarme el desafío de este proyecto, su motivación y positivismo.

A Pablo por aceptar ser parte de este trabajo, permitirme trabajar en su laboratorio, y su ayuda en el diseño experimental.

A Otto Pristch por su participación en la gestación del proyecto, sus consejos que ayudaron en el desarrollo del mismo y su guía como evaluador externo

A UPR por la ayuda, la paciencia y buena onda. Particularmente a Mariana Pegazzano, Agustín Correa, Claudia Ortega y Cecilia Abreu quienes participaron en distintas etapas y sin los cuales no hubiera sido posible el desarrollo del presente trabajo.

A los compañeros de OMG e Inmunoteam los que están y los que estuvieron, con quienes fue un placer compartir durante estos años el día a día dentro y fuera del laboratorio.

A Lorena Tomé por su ayuda en la expresión en *Drosophila*, sus consejos y motivación.

A UBP particularmente Federico Carrión quien colaboró con los ensayos de BiaCore.

A UByPA por los análisis de espectrometría de masa.

A Teresa Freire por cederme los péptidos biotinilados facilitados por la Dra. Sylvie Bay.

Al laboratorio Imunité et Cancer del Institut Curie de París, particularmente el grupo Transfert que me recibió como pasante.

A CSIC, PEDECIBA, CAP UdelAR y ECOS Sud por el apoyo económico.

Introducción

Cáncer

Durante el desarrollo normal y a lo largo de la vida adulta, intrincados sistemas de regulación génica mantienen el balance entre renovación celular y muerte, el cual determina el tamaño corporal adulto y la tasa de crecimiento en alcanzar ese tamaño (Lodish 2008). En algunos tejidos la proliferación celular ocurre como una estrategia de continuo recambio, sin embargo ocasionalmente se generan células que no responden a los mecanismos de control del crecimiento celular, proliferando de forma descontrolada dando origen a tumores o neoplasmas. Un tumor que no es capaz de crecer indefinidamente se denomina benigno, mientras que los que adquieren capacidad de seguir creciendo y son progresivamente invasivos conforman tumores malignos. El término cáncer es utilizado específicamente para este último tipo de tumores (Owen et al. 2013). Los tumores pueden generarse por alteración génica como consecuencia de factores ambientales (carcinógenos, radiación UV, virus) o por factores intrínsecos tales como errores en el copiado y reparación de genes, mecanismos epigenéticos de regulación génica o determinados por herencia de una dotación dada (Lodish 2008). Raramente una única mutación lleva al comienzo de un tumor, de esta forma una progresión tumoral puede ser descrita en forma simplificada como una sucesión de expansiones clonales, donde cada una está desencadenada por la adquisición de un genotipo que confiere una ventaja selectiva a dicho sub-clon, permitiendo el crecimiento y eventual dominancia en forma local en determinado ambiente tisular (Hanahan & Weinberg 2011).

Características del Cáncer

Hanahan y Weinberg enumeraron diez características (“hallmarks”) del cáncer que colectivamente promueven y sustentan el crecimiento maligno, las que se esquematizan en la figura 1 y se detallarán brevemente.

En primer lugar la proliferación crónica se genera a partir de la capacidad de las células tumorales de mantener **señales de proliferación sostenidas**. Esto puede lograrse mediante la producción autócrina de factores de crecimiento o la activación del estroma normal que lo rodea, por sobreexpresión o alteración de los receptores de estos ligandos, o modificaciones en componentes de la cascada de señalización (Bhowmick et al. 2004; Davies & Samuels 2010; Hanahan & Weinberg 2011).

Además de generar y mantener señales de estimulación del crecimiento, las células tumorales deben evadir los programas de regulación que limitan el crecimiento y la proliferación. Las

proteínas RB (Retinoblastoma) y TP53 son dos ejemplos de genes supresores de tumores que pueden estar afectados en células tumorales (Hanahan & Weinberg 2011).

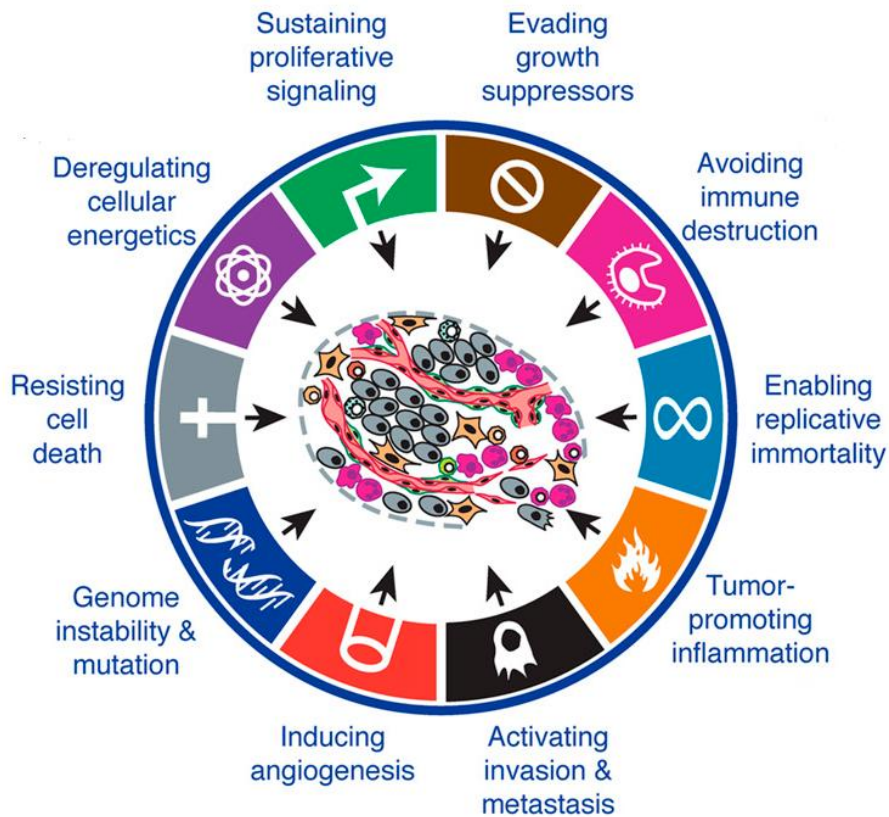


Figura 1. Características del cáncer. Señalización proliferativa sostenida, evasión de inhibidores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, inducción de angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, desregulación del metabolismo celular, promoción de la inflamación, evasión de la destrucción inmune e inestabilidad genómica. Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Las células tumorales desarrollan asimismo estrategias que limitan o evaden la apoptosis, confiriéndoles así **resistencia a la muerte celular**. Estas incluyen la pérdida de la función del gen supresor de tumores TP53, la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de señales de supervivencia (Igf1/2), regulación en menos factores pro-apoptóticos (Bax, Blm, Puma) o interfiriendo en las vías de muerte celular (Hanahan & Weinberg 2011).

El **potencial replicativo ilimitado** es necesario para la formación de tumores macroscópicos. Las células normales presentan dos procesos que lo limitan: la senescencia y crisis, éste último involucra la muerte celular y es provocado por la erosión de los telómeros. En más del 90% de los tumores, se reactiva la expresión de la enzima telomerasa, la cual rescata el acortamiento de los telómeros y permite a las células tumorales superar el proceso de crisis, pudiendo replicarse ilimitadamente (Blasco 2005; Weinberg 2014).

Al igual que los tejidos normales, las células malignas requieren sustento de nutrientes, oxígeno y eliminación de residuos metabólicos de forma sostenida. La activación de la **angiogénesis**

promueve que la vasculatura quiescente genere nuevos vasos para mantener el crecimiento neoplásico. Tanto células tumorales como estromales del microambiente tumoral secretan factores de crecimiento y citoquinas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-A), el cual promueve este proceso (Nagy et al. 2010; Hanahan & Weinberg 2011).

Eventualmente, tumores primarios generan células que invaden tejidos adyacentes y viajan a sitios distantes donde pueden establecer tumores secundarios (Hanahan & Weinberg 2000). Una secuencia de pasos discretos denominados cascada **invasión-metástasis** describe el proceso que comienza con invasión local, intravasación de células a vasos sanguíneos o linfáticos cercanos, tránsito a través de éstos seguido de escape hacia el parénquima de tejidos distales. Allí forman pequeños nódulos o micrometástasis, las cuales darán lugar a tumores macroscópicos siendo este último paso denominado colonización (Talmadge & Fidler 2010; Hanahan & Weinberg 2011).

La proliferación crónica y descontrolada que es esencial en las neoplasias implica adicionalmente un reajuste en el **metabolismo energético** de las células tumorales (Hanahan & Weinberg 2000). Se ha descrito que esta reprogramación afecta el metabolismo de la glucosa con sobreexpresión de transportadores de glucosa como GLUT1. Esta característica ha sido utilizada como método de diagnóstico en técnicas de imagenología como PET empleando un análogo de la glucosa radiomarcado (Jones & Thompson 2009).

Pueden destacarse tres tipos de **inflamación** relacionada a los procesos tumorales. La causada por factores ambientales o la dieta que pueden aumentar el índice de desarrollar cáncer (infecciones persistentes de *Helicobacter pylori* o el material particulado del humo de tabaco); la generada por las propias células tumorales dando como resultado el reclutamiento de células inmunes que producen a su vez citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno con propiedades mutagénicas. Finalmente, un tercer tipo de inflamación es el generado como respuesta al tratamiento anti-tumoral (Grivennikov et al. 2010).

El sistema inmune no solo protege contra el desarrollo del cáncer sino que también modela el carácter del tumor emergente. La teoría denominada "inmunoedición del cáncer" permite comprender el rol del sistema inmune en este proceso y está compuesta de tres fases: eliminación, equilibrio y **escape** (Schreiber et al. 2011). Eliminación es la fase donde el sistema inmune innato y adaptativo de forma conjunta detectan y destruyen células tumorales antes que sean clínicamente visibles (Mittal et al. 2014). Durante la fase de equilibrio, el sistema inmune mantiene al tumor en un estado quiescente. Dada la presión inmune constante, variantes tumorales pueden evolucionar para evadir el reconocimiento del mismo. Finalmente, en la fase de escape el sistema inmune ya no es capaz de contener a las células tumorales que comienzan a causar efectos clínicamente detectables. (Mittal et al. 2014; Schreiber et al. 2011).

La adquisición de varias de las características descritas anteriormente depende de la sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas por **inestabilidad genómica**. Células

tumorales generalmente muestran una tasa de mutación elevada, lo que puede estar generado por daño en genes “caretakers”, implicados en el mantenimiento del ADN los que actúan como genes supresores de tumores. Los defectos en estos genes puede estar en la detección del daño del ADN para activar mecanismos involucrados en la reparación del ADN y/o inactivación de moléculas mutagénicas (Negrini et al. 2010).

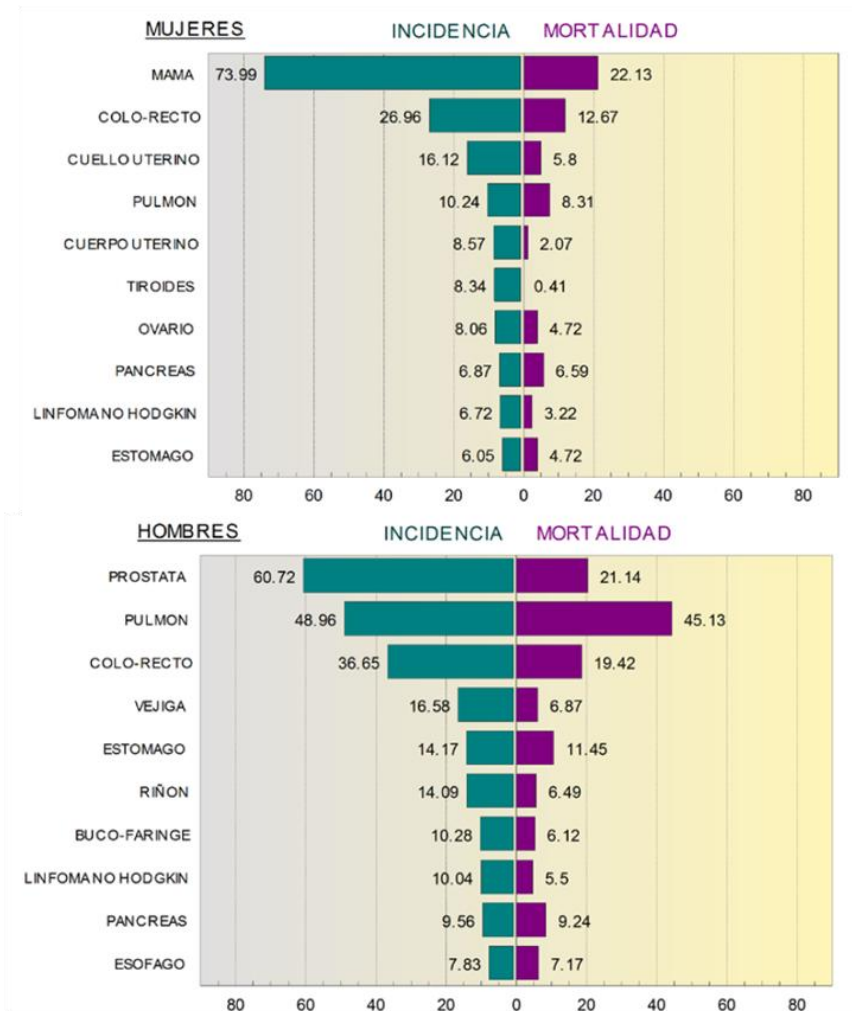


Figura 2. Distribución porcentual de la incidencia y mortalidad en los principales sitios en hombres y mujeres en el Uruguay en el período comprendido entre 2006-2010. Adaptado de comisión honoraria de lucha contra el cáncer (2014).

En el Uruguay, el cáncer es la segunda causa de muerte, situándose por debajo de enfermedades cardiovasculares.(Comisión honoraria de lucha contra el cáncer 2014). La incidencia de esta patología es coincidente con países del primer mundo, donde el aumento en las expectativas de vida es proporcional a la incidencia de enfermedades degenerativas como el cáncer (Depinho 2000; Linley et al. 2011). Sin embargo, la mortalidad causada por los tipos de cáncer más comunes (pulmón, próstata y colorectal) ha disminuido principalmente como resultado de una detección más temprana de la enfermedad y de progresos significativos en los tratamientos (Edwards et al.

2014). La incidencia y mortalidad en nuestro país en hombres y mujeres de los tipos de cáncer más predominantes se detallan en la figura 2.

Terapia antitumoral

Las estrategias terapéuticas convencionales sistémicas como la quimioterapia y la administración de dosis controladas de radioterapia en conjunto con cirugía logran de forma efectiva reducir sino eliminar tumores en muchos tipos de neoplasias (Weinberg 2014).

Entre el 50 y 60% de todos los pacientes oncológicos son tratados con radioterapia, y este régimen puede ser en combinación con quimioterapia y/o cirugía. La radiación ionizante induce daños en el ADN en forma de roturas simple o doble cadena generando en las células reconocimiento del daño, activación de los sistemas de control del ciclo celular (checkpoints), reparación del daño y/o inducción de apoptosis (Coffelt & Visser 2015; Liauw et al. 2013). A nivel tumoral esto lleva a la redistribución de las células del tumor a fases radiosensibles del ciclo celular (G₂/M), la reoxigenación de áreas hipóxicas, la reparación de daño sub letal del ADN y la repoblación de las células tumorales existentes. Actualmente, se ha incorporado como mecanismo de muerte celular la respuesta a radioterapia proveniente del sistema inmune, resultando en memoria inmunológica y en efectos sistémicos ventajosos (Golden & Apetoh 2015).

Por su parte la quimioterapia, involucra un amplio grupo de drogas citotóxicas que pueden eliminar células tumorales por inhibición de la replicación del ADN, dañándolo químicamente, inhibiendo la función de enzimas cruciales para su síntesis o previniendo la mitosis (Coffelt & Visser 2015). Adicionalmente, la terapia hormonal está dirigida a interferir con las señales de crecimiento a través de receptores hormonales en células tumorales (Lesterhuis et al. 2011).

Sin embargo, tanto la radiación ionizante como algunos compuestos químicos utilizados son a su vez carcinogénicos y por tanto si bien son capaces de producir remisiones clínicas, también pueden llegar a generar nuevos tumores como consecuencia de su efecto mutagénico (Weinberg 2014).

En los últimos años se ha buscado el desarrollo de terapias con toxicidad reducida mediante la identificación de moléculas específicas y de agentes terapéuticos dirigidos a las mismas.

En la denominada terapia dirigida ("Targeted therapy") se busca inhibir vías relacionadas a la carcinogénesis o el crecimiento tumoral, bloqueando enzimas específicas y factores de crecimiento involucrados en la proliferación celular, modificando la función de proteínas que regulan la expresión génica u otras funciones celulares en lugar de interferir con todas las células de crecimiento rápido (Joo et al. 2013). Esta estrategia puede subdividirse a su vez en las que utilizan anticuerpos monoclonales contra blancos de membrana celular (que se detallará más adelante) y en moléculas pequeñas (menores a 800Da) que pueden penetrar en la membrana celular e interferir o inhibir vías de señalización. La mayoría de estas últimas son inhibidores de

proteínas tirosin-quinazas por ejemplo, erlotinib es un inhibidor de EGFR y vemurafenib inhibe BRAF una serin-treonin quinasa entre otros (Coffelt & Visser 2015; Joo et al. 2013).

Inmunoterapia antitumoral

La inmunoterapia busca generar la activación o potenciar la respuesta inmune antitumoral para eliminar selectivamente células tumorales. Las estrategias pueden ser clasificadas genéricamente como pasivas o activas, según si el efecto antitumoral es intrínseco del agente terapéutico o es capaz de activar el sistema inmune del paciente (Galluzzi et al. 2014). Alternativamente se pueden clasificar de acuerdo a si son específicas de antígeno tumoral o no. En la figura 3 se esquematizan las principales estrategias inmunoterapéuticas en evaluación y uso clínico.

Inmunoterapia pasiva

La principal inmunoterapia pasiva en uso clínico consiste en la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos a tumor. El mecanismo de acción puede ser intrínseco dependiendo de la molécula blanco o si el anticuerpo es conjugado a drogas citotóxicas. Esta estrategia será desarrollada en el apartado correspondiente a anticuerpos monoclonales.

Inmunoterapia activa

Entre las inmunoterapias que cuentan con aprobación para su uso en la clínica se encuentra las basadas en células dendríticas. El tratamiento consiste en el aislamiento de monocitos circulantes del paciente o donantes, su amplificación, diferenciación, maduración y cargado de antígenos tumorales para luego ser transferidos nuevamente al paciente donde las mismas desencadenaran una respuesta antígeno dependiente (Galluzzi et al. 2014). La FDA aprobó en 2010 el uso de Sipuleucel T para cáncer de próstata metastásico refractario a castración, en la cual las células dendríticas generadas a partir del paciente son cargadas con una proteína recombinante formada por el antígeno fosfatasa ácida prostática (PAP) fusionada al factor de crecimiento GM-CSF (Higano et al. 2010).

Otra de las estrategias que han llegado a la clínica es el uso de citoquinas inmunoactivadoras. El interferón de tipo I tiene efectos tanto antiangiogénicos, antiproliferativos como proapoptóticos, aumenta la presentación cruzada de antígenos y promueve una respuesta de tipo Th1 potenciando la citotoxicidad mediada por células. La FDA ha aprobado las formas INF- α 2a (Roferón-A), IFN- α 2b (Intron A) E IFN- α 2C (Tarhini et al. 2012; Paquette et al. 1998). Su uso en terapia está indicado para "hairy cell leukemia (HCL)", sarcoma de Kaposi, linfoma folicular, mieloma múltiple, melanoma y neoplasmas intraepiteliales cervicales. A su vez está aprobado para leucemia mieloide crónica cromosoma Filadelfia positiva y para el tratamiento de melanoma (Galluzzi et al. 2014)

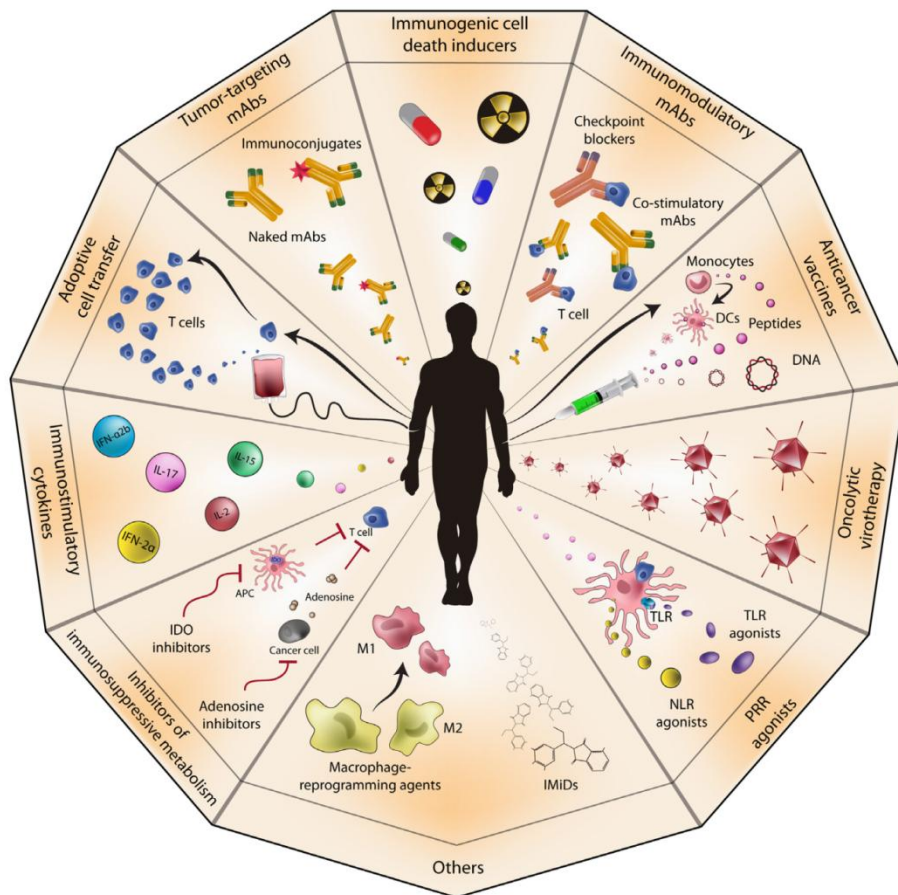


Figura 3. Estrategias inmunoterapéuticas. Comprenden anticuerpos monoclonales dirigidos a tumor o inmunomoduladores, vacunas antitumorales basadas en células dendríticas, virus oncolíticos, agonistas de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), citoquinas inmunoestimuladoras, inductores de muerte celular inmunogénica, inhibidores del metabolismo inmunosupresor y transferencia adoptiva de células. (1-MT 1 metilriptófano, IMiD droga inmunomoduladora) (Galluzzi et al. 2014).

Por su parte, la terapia con IL-2 como aldesleukin está aprobada como agente terapéutico en melanoma metastásico y carcinoma renal (Sim et al. 2014). Esta citoquina está implicada en la inducción de la proliferación, supervivencia y adquisición de funciones efectoras en linfocitos T CD8+ y Natural Killer (Moriggi et al. 1999).

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) recombinante también está reglamentado para el tratamiento de sarcoma y melanoma (Deroose et al. 2011). Sin embargo, en este caso TNF- α no es utilizado como un agente inmunoestimulador sino en combinación con un agente alquilante (melphalan) para incrementar la concentración de la droga y por tanto aumentar su citotoxicidad (van Horsen et al. 2006; Galluzzi et al. 2014).

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) pertenecientes a la inmunidad innata reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o a patógenos (PAMPs). Tras su activación, promueven una potente respuesta pro inflamatoria mediada por secreción de citoquinas inmunoestimuladoras, contribuyendo a la maduración de células dendríticas, así como la activación de macrófagos y linfocitos Natural Killer (Palm & Medzhitov 2009). Tres agonistas de

TLR están aprobados por la FDA para su uso terapéutico, una variante atenuada de *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette-Guérin (BCG), que actúa como agonista del TLR₂/TLR₄ usado como agente en cáncer de vejiga invasivo no muscular de medio y alto riesgo (Kawai et al. 2013). El monofosforil lípido A (MPL), un activador vía TLR₂/TLR₄ derivado de LPS de *Salmonella minnesota* se utiliza como adyuvante en la vacuna Cervarix de prevención de los serotipos 16 y 18 de HPV (Vacchelli et al. 2013). Finalmente, Imiquimod, un derivado de imidazoquinolona activa la señalización vía TLR₇ y se utiliza en el tratamiento de keratosis actínica y carcinoma de células basales superficiales (Holcmann et al. 2012; Vacchelli et al. 2013).

Algunas quimioterapias convencionales como radiación y ciertas drogas pueden generar muerte celular inmunogénica (ICD) produciendo DAMPs que desencadenan procesos proinflamatorios y por tanto una respuesta inmune anti-tumoral con memoria inmunológica. La exposición pre-apoptótica de la proteína calreticulina en la membrana celular, la secreción activa de ATP o la liberación post-apoptosis de la proteína HMGB₁ son ejemplos de DAMPs (Kroemer et al. 2013; Vacchelli et al. 2014).

Los anticuerpos monoclonales inmunomoduladores operan interaccionado con componentes celulares o solubles del sistema inmune, por lo que son diseñados para generar una respuesta inmune. El detalle de las estrategias desarrolladas será tratado en el apartado correspondiente a anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) tienen una dualidad en estructura y función. Por un lado proveen un set de receptores policlonales presentes en la membrana de los linfocitos B con una gran diversidad de reconocimiento de ligandos. Esta diversidad les permite a las Igs reconocer casi un número ilimitado de antígenos propios y no propios, desde compuestos orgánicos hasta moléculas sintéticas que no estuvieron presentes durante el desarrollo evolutivo del sistema inmune. Por otra parte, proveen al sistema inmune de un set de moléculas solubles efectoras que pueden activar el sistema complemento (CDC), neutralizar, promover la fagocitosis, promover la citotoxicidad celular (ADCC) a través de la interacción con receptores Fc en la superficie de granulocitos, monocitos, Natural Killer, plaquetas y otros componentes de la respuesta inmune (Paul W 2008).

Estructura

Las inmunoglobulinas tienen una estructura común de cuatro cadenas polipeptídicas, consistiendo en dos cadenas idénticas livianas (L) de 25kDa y de dos cadenas idénticas pesadas (H) de 50kDa (Owen et al. 2013). Una cadena liviana se encuentra unida a una pesada por enlaces disulfuro y por interacciones no covalentes como enlaces de hidrógeno y uniones hidrofóbicas. De forma análoga este heterodímero se une a otro igual, formando así la estructura básica de cuatro cadenas, un dímero de dímeros que se detalla en la figura 4 (Owen et al. 2013).

Considerando la secuencia aminoacídica de la cadena liviana se distinguen dos regiones; el extremo amino terminal de 110 aminoácidos es extremadamente variable, mientras que el extremo carboxilo terminal está conservado. De esta forma, la región N-terminal se denomina región variable de la cadena liviana VL y la C-terminal región constante VC, la que puede ser clasificada a su vez en dos tipos principales: kappa o lambda. De forma análoga, la cadena pesada puede ser subdividida según su variabilidad en región variable de la cadena pesada (VH) y región constante (CH) de la cual se han descrito cinco tipos distintos (α , γ , ϵ , μ , y δ). A modo de ejemplo C δ contiene tres dominios denominados CH1-3. Cada subtipo de región constante CH determina un isotipo de inmunoglobulina y le confiere a la molécula funciones efectoras particulares que están mediadas por la interacción de esta región con el receptor de Fc (FcRs) en células del sistema inmune (Natural Killer, neutrófilos, monocitos, células dendríticas y eosinófilos) y con el receptor neonatal FcRn, que protege de la degradación en la circulación prolongando la vida media (Shuptrine et al. 2012). Es en la cadena pesada CH donde se encuentran además los dominios de membrana y cola citoplasmática denominadas M1 y M2. A través del proceso de Splicing alternativo se determina si la inmunoglobulina mantiene esta región para actuar como receptor de membrana en linfocitos B, o si son secretadas (Paul W 2008).

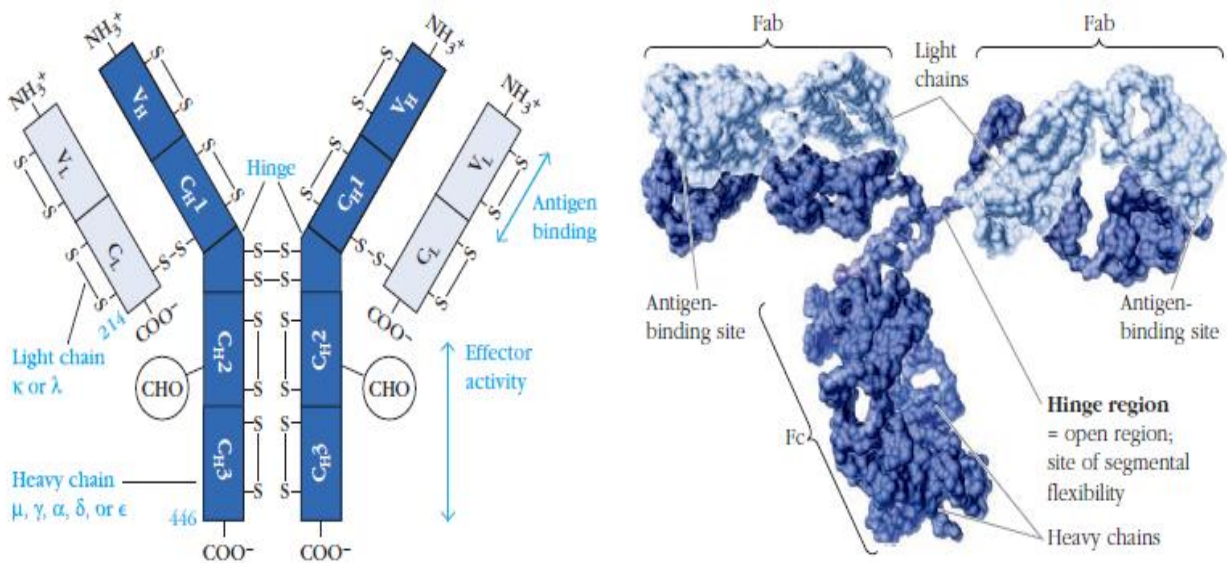


Figura 4 Estructura de inmunoglobulinas. Esquema y representación tridimensional de una inmunoglobulina de isotipo IgG. Se representa la cadena pesada en azul, la liviana en celeste. Los dominios constantes se denotan CH1-3 en la cadena pesada y CL en la liviana. Los dominios variables VH para la cadena pesada y VL en la liviana. CHO refiere a sitios de glicosilación. Fab, dominio de unión al antígeno formado por la interacción de VH y VL y los dominios CL-CH1 y Fc a la región efectora compuesta por la asociación de los dominios CH2-CH2 y CH3-CH3 (Owen et al. 2013)

Es en las regiones variables que puede rastrearse las diferencias en especificidad de los diferentes anticuerpos. Las secuencias de las regiones variables pueden a su vez ser subdivididas entre regiones de hipervariabilidad denominadas determinantes de complementariedad (CDR) y las regiones flanqueantes a éstas denominadas regiones framework (FR). Cada dominio variable presenta tres CDRs siendo la conformación espacial conjunta de los CDRs de las cadenas pesadas y livianas los que constituyen el sitio de unión al antígeno (Owen et al. 2013).

Desde el punto de vista de estructura terciaria y cuaternaria, las cadenas de las inmunoglobulinas presentan un plegamiento conservado de tipo inmunoglobulina (Ig) de 110 aminoácidos. Cada dominio inmunoglobulina consiste en un "sándwich" de dos hojas beta antiparalelas conectadas por loops de longitudes variables. Las dos hojas β están estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y por un enlace disulfuro conservado entre las láminas orientado perpendicular a cada hoja. Otra característica compartida entre los dominios inmunoglobulina es un residuo de triptófano conservado en la proximidad del enlace desulfuro (Feige et al. 2010)

Los anticuerpos presentan dos tipos de estos dominios V y C (los que corresponden a los dominios variables y constantes descritos anteriormente). El dominio de tipo C es más compacto y presenta siete bandas antiparalelas distribuidas en tres bandas en la primera hoja y cuatro en la segunda. Cada banda está denominada en orden alfabético comenzando del extremo N-terminal como A hasta el carboxilo terminal G. Las cadenas laterales que quedan en el sándwich entre las dos hojas, tienden a ser no polares, siendo este core hidrofóbico el que mantiene la estabilidad de la

estructura (Paul W 2008). Por su parte el dominio inmunoglobulina de tipo V, tiene dos bandas adicionales en la primera hoja, creando una distribución de cinco y cuatro bandas (abcc'c'' defg). La estabilidad del dominio resulta del empaquetamiento enriquecido por la presencia de residuos hidrofóbicos. Los dominios H y L variables se mantienen unidos principalmente por interacciones no covalentes entre las caras internas de las hojas β , las que están esquematizadas en la figura 5 (Paul W 2008).

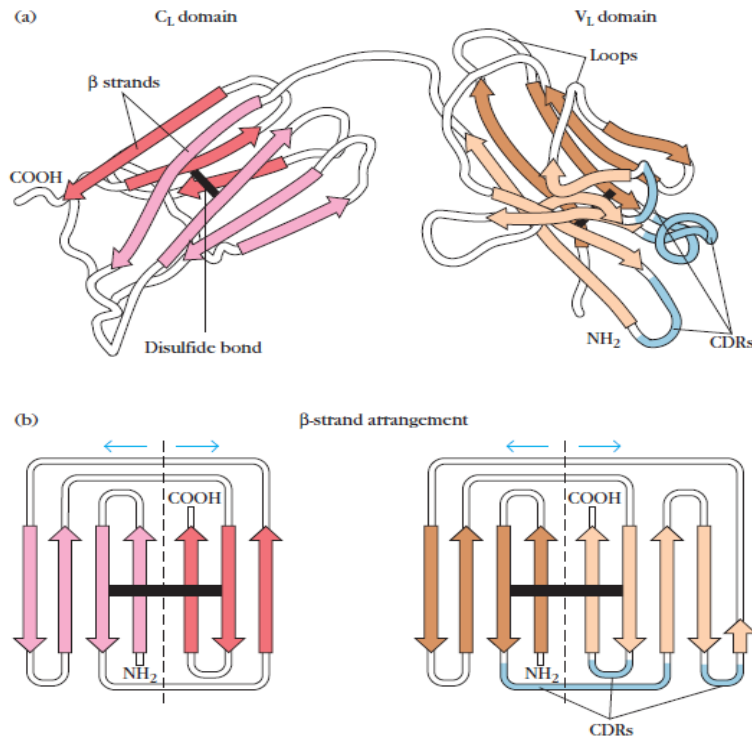


Figura 5 Estructura del dominio inmunoglobulina de la cadena liviana.

Se esquematiza la estructura de los dominios inmunoglobulina variable y constante. Las bandas que componen cada hoja se muestran del mismo color. Los tres loops que corresponden a las regiones CDR de VL se esquematizan en azul (Owen et al. 2013).

Los CDRs de las regiones variables se encuentran localizadas en los loops que conectan las hojas β , mientras que las regiones conservadas de estos dominios (Framework) corresponde a las hojas β antiparalelas. De esa forma, hay una estrecha conexión entre estructura y función, ya que el dominio inmunoglobulina permite mantener una estructura básica o "backbone" mientras que otras regiones como los loops pueden ser altamente variables sin afectar la estabilidad (Owen et al. 2013). Se esquematiza en la figura 5 la estructura del dominio inmunoglobulina de una cadena liviana, VC y VL.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos que se generan en una respuesta inmune natural o luego de inmunizaciones son una mezcla de inmunoglobulinas de diferentes especificidades y afinidades por el antígeno. El uso de este tipo de suero policlonal a nivel experimental o en la clínica tiene como desventaja su baja reproducibilidad, su limitado volumen y la generación de respuestas inespecíficas (Murphy et al. 2008).

Kohler y Milstein desarrollaron un método para producir anticuerpos monoclonales fusionando un linfocito B activado con una célula de mieloma, generando así una célula híbrida que denominaron hibridoma. Esta célula tiene la propiedad de ser inmortal como el mieloma y a su vez de secretar anticuerpos monoclonales producidos por el linfocito B de origen (Kohler & Milstein 1975). Sin embargo los hibridomas presentan una gran limitante para su uso en terapia, la imposibilidad de generar anticuerpos monoclonales humanos. Las inmunoglobulinas producidas de origen murino poseen varios efectos secundarios que impiden su uso en la clínica. Presentan corta vida media en sangre, baja eficiencia en activación de ADCC siendo el mayor impedimento la generación de una respuesta inmune contra los propios anticuerpos murinos denominada HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) (Dimitrov & Marks 2009). Para resolver este problema los anticuerpos murinos han sido manipulados genéticamente para progresivamente reemplazar las secuencias de contenido murino por las homólogas humanas (Kashmiri et al. 2005). La primer estrategia generada fue la producción por ingeniería genética de anticuerpos quiméricos conteniendo las regiones variables de reconocimiento al antígeno murinas y las regiones constantes humanas (sufijo ximab) (Morrison et al. 1984). Posteriormente se desarrollaron anticuerpos humanizados, donde se conserva solamente las regiones CDR murinas y el resto de las secuencias corresponden a secuencias de origen humano (sufijo xumab) (Jones et al. 1986). Finalmente, la generación de forma monoclonal de anticuerpos humanos (sufijo umab) fue desarrollada tanto a partir de phage display empleando librerías de linfocitos con selección antígeno específica así como por el desarrollo de ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulinas humanos (McCafferty et al. 1990; Brüggemann et al. 1989; Brüggemann et al. 2014). El desarrollo de anticuerpos humanizados y humanos en terapia ha minimizado la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos, sin embargo, pacientes tratados con estos anticuerpos humanos aún pueden desarrollar una respuesta inmune denominada HAHA, (human anti-human antibodies) (Chan & Carter 2010).

Anticuerpos monoclonales en terapia antitumoral

Los anticuerpos monoclonales son la estrategia de inmunoterapia más caracterizada y empleada en la clínica (Galluzzi et al. 2014). Éstos pueden ser dirigidos a una gran variedad de antígenos expresados en las superficie de células tumorales, a factores solubles del microambiente tumoral o a moléculas moduladoras del sistema inmune (Bakema & Egmond 2014). Tal como se mencionó en el apartado de inmunoterapia, el mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos dependerá de la molécula a la que son dirigidos, pudiendo ser una terapia pasiva cuando el anticuerpo por si mismo promueve la muerte de la célula tumoral o una estrategia terapéutica activa, cuando la administración del anticuerpo genera activación o potenciación del sistema inmune que en última instancia generará mecanismos de citotoxicidad sobre las células tumorales (Galluzzi et al. 2014).

El mecanismo de acción puede ser directo (a través del bloqueo de actividad agonista de un receptor de crecimiento, inducción de apoptosis o el direccionamiento de drogas o agentes citotóxicos); mediada por el sistema inmune (activación del sistema complemento CDC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ADCC, fagocitosis, modulación de la respuesta inmune), o mediante la inhibición de componentes de la vasculatura tumoral o del estroma (Scott et al. 2012). Esquemáticamente estos mecanismos se observan en la figura 6 y se detallarán brevemente a continuación.

Muerte celular directa

Los anticuerpos pueden ser utilizados para bloquear de forma selectiva receptores de crecimiento o pueden actuar como agonistas de receptores que generen inducción de apoptosis (Weiner et al. 2010). Tal es el caso de anticuerpos dirigidos a miembros de la familia de receptores tirosinquinasa del factor de crecimiento epidérmico EGFR (también conocido como HER o ErbB) que están frecuentemente sobre-expresados en tumores sólidos. Cetuximab es un anticuerpo quimérico IgG1 dirigido a EGFR indicado para cáncer de colon, cabeza y cuello. Se ha evidenciado que su mecanismo de acción es prevenir la unión del ligando y la dimerización del receptor, un paso crucial en el inicio de la señalización mediada por EGFR (Li et al. 2005). Por su parte, Panitumumab un anticuerpo humano IgG2 producido a partir de ratones transgénicos con el mismo blanco que Cetuximab es utilizado para cáncer colorectal (Weiner et al. 2010).

A diferencia de EGFR, HER2 no tiene ligando conocido y los anticuerpos generados con reconocimiento al mismo actúan inhibiendo su homo o heterodimerización e internalización. Trastuzumab, un anticuerpo humanizado IgG1 dirigido a esta molécula es usado en el tratamiento de carcinoma de mama y gástrico que exhibe amplificación y sobreexpresión de HER2 (Hudis 2007). Por otra parte se ha desarrollado Pertuzumab un anticuerpo humanizado IgG2 que se une a

un epítotope diferente a HER2 e inhibe estéricamente la dimerización del mismo (Franklin et al. 2004).

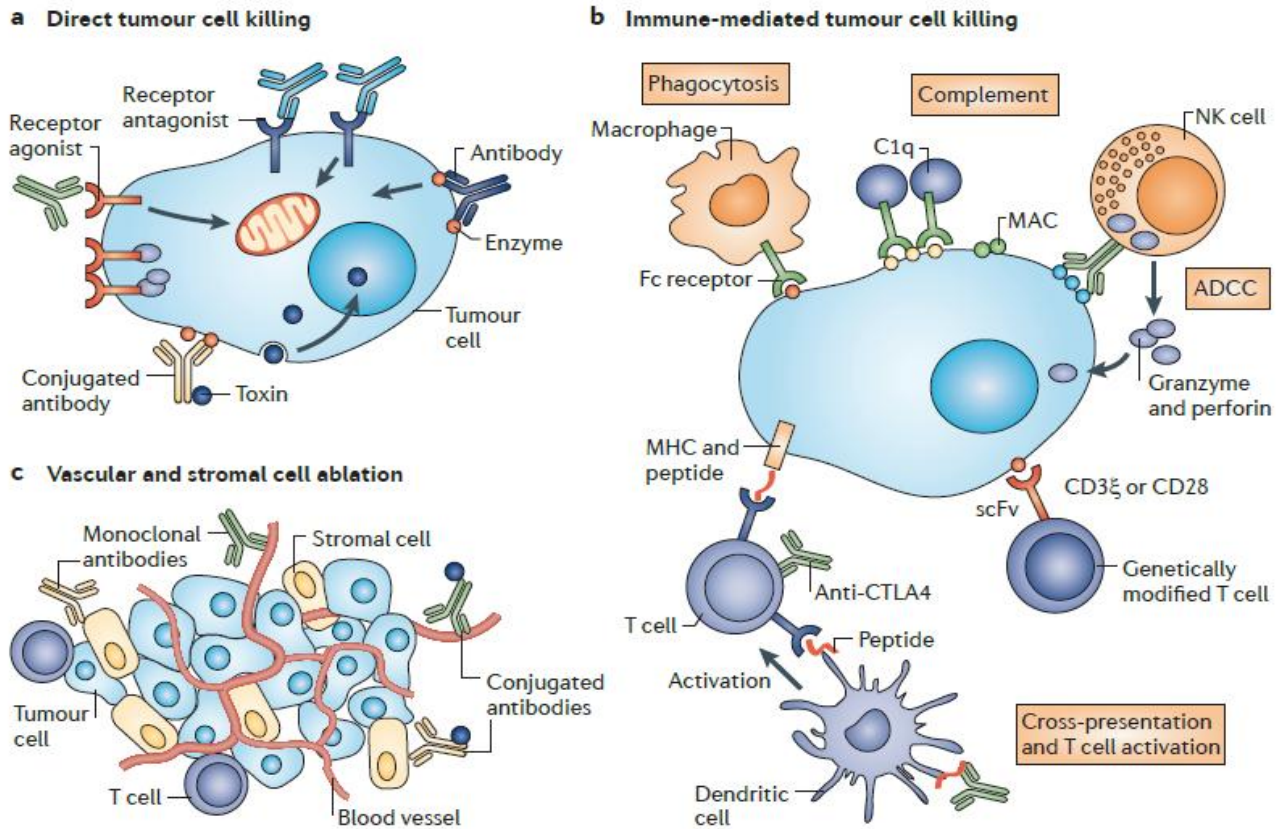


Figura 6. Mecanismos de acción de anticuerpos monoclonales en terapia anti tumoral. A. Muerte celular directa, B. mecanismos mediados por el sistema inmune y C. inhibición de la vasculatura y el estroma celular. (Scott et al. 2012)

Alternativamente, anticuerpos desnudos pueden inducir efectos directos en las células tumorales, desencadenando cascadas de señalización intracelular que pueden detener el ciclo celular y en algunos casos activar la muerte celular programada (Glennie et al. 2007). A modo de ejemplo el anticuerpo Rituximab, para el tratamiento de cánceres hematológicos como linfomas no-Hodgking o Leucemia linfoide crónica con blanco en CD20, actúa en parte induciendo apoptosis luego de la unión a linfocitos B (Pérez-Callejo et al. 2015).

Los anticuerpos pueden ser usados para dirigir drogas hacia las células tumorales. De esta forma se combina el potencial citotóxico de drogas con la alta especificidad de los anticuerpos, aumentando la concentración de las mismas en el sitio en el que se requiere su actividad, con disminución de los efectos colaterales. A diferencia del uso de anticuerpos desnudos, los antígenos

para estos conjugados pueden ser expresados a menores concentraciones, ya que un pequeño número de moléculas pueden resultar en la muerte de la célula blanco, siendo necesario en todos los casos la internalización del anticuerpo luego de su unión a la célula blanco (Weiner 2015). Dos conjugados droga-anticuerpo están aprobados para su uso en la clínica. Una versión modificada de trastuzumab, Ado-trastuzumab o T-DM1, compuesto por trastuzumab conjugado a un derivado de maitansina (DM1), es un agente despolimerizador de microtúbulos que es indicado para pacientes HER2 positivos con cáncer de mama (Lewis Phillips et al. 2008). Brentuximab vedotin por su parte, es un anticuerpo IgG1 quimérico dirigido a CD30 modificado covalentemente con el antagonista de microtúbulos monometil auristatin E (MMAE). El linker utilizado para unir ambas moléculas contiene un sitio de clivaje para catepsina B, por lo que la droga es liberada únicamente en endosomas y lisosomas de células de linfoma CD30 positivas luego de su internalización. Esta molécula está aprobada para su uso en linfomas de Hodgkin avanzados (Sliwkowski & Mellman 2013; Okeley et al. 2010).

De forma análoga a los conjugados droga anticuerpo, la unión de anticuerpos a radionucleídos es una estrategia utilizada en la radioinmunoterapia (RIT) (Steiner & Neri, 2011). Esta alternativa debe considerar el posible daño a tejido normal causado por el radioisótopo cuando el agente está en la circulación, su incorporación al tejido normal, el posible daño a órganos sensibles como médula ósea, hígado y riñón (Weiner 2015). Dos radioinmunoconjugados han sido aprobados por la FDA como agentes terapéuticos para linfoma. ⁹⁰Y-Ibritumomab tiuxetan, un anticuerpo IgG2 murino dirigido a CD20 utilizándose actualmente en terapia a linfomas no-Hodking e ¹³¹I-tositumomab ambos dirigidos a la molécula CD20 (Sliwkowski & Mellman 2013).

Muerte celular mediada por el sistema inmune.

Varios estudios han demostrado la importancia de las interacciones entre la región Fc y los receptores FcγR para los efectos antitumorales in vivo de varios anticuerpos en modelos murinos y ensayos clínicos. De hecho, la mayoría de los anticuerpos aprobados por la FDA para su uso en clínica son de isotipo IgG1, capaces de interactuar con dichos receptores. Los anticuerpos monoclonales pueden desencadenar la muerte celular mediada por el sistema inmune por la inducción de fagocitosis, la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), así como potenciando las respuestas inmunes por bloqueo de moléculas inmunomoduladoras (Sliwkowski & Mellman 2013).

El sistema complemento, parte del sistema inmune innato consiste en una cascada proteolítica de más de 30 proteínas séricas, que lleva a la formación del complejo de ataque de membrana (MAC), la liberación de anafilatoxinas y opsoninas resultando en lisis celular (Dunkelberger & Song 2010).

La habilidad de un anticuerpo dado para fijar complemento e inducir CDC depende en parte de la concentración del antígeno, la orientación de éste en la membrana celular y si este antígeno está presente en la superficie como monómero o polímero, así como el isotipo del anticuerpo y las características de la célula blanco, si expresan moléculas neutralizantes de complemento o no (Weiner 2015). Este tipo de citotoxicidad se hace relevante en cánceres hematológico donde las células están expuestas a las proteínas del complemento en el suero (Pawluczkwyc et al. 2009). Rituximab, dirigido como se mencionó anteriormente a CD20, no es internalizado de aumentando la probabilidad de la activación del complemento mediante la formación de complejos Rituximab-receptor (Weiner 2011). Ofatumumab otro anticuerpo anti-CD20 IgG1 humano dirigido a un epítipo distinto, ha mostrado activar el complemento con mayor avidez que Rituximab lisando células con niveles menores de CD20 (Teeling et al. 2012).

El dominio Fc de los anticuerpos puede activar la citotoxicidad celular, a través de interacciones con los receptores FcγR presentes en las células inmunes (Natural Killer, macrófagos y granulocitos). Células efectoras a través de los receptores Fcγ, reconocen así una célula blanco cubierta de anticuerpos y promueven la lisis a mediante la liberación de granzimas y perforinas. (Weiner 2015). Ensayos in vivo han mostrado que tanto Trastuzumab, Rituximab y Cetuximab presentan este mecanismo de acción. De hecho el FcγR puede ser un factor importante en la eficacia clínica de ciertos anticuerpos terapéuticos. Ensayos clínicos han mostrado que pacientes que presentan ciertos polimorfismos de FcγR presentan una respuesta mayor al tratamiento con Rituximab en linfoma no Hodgking (NHL) (Weng & Levy 2003), a Cetuximab en pacientes con cáncer colorectal metastásico (Bibeau et al. 2009) y a Trastuzumab en pacientes con cáncer de mama metastásico (Musolino et al. 2008).

A diferencia de los anticuerpos mencionados anteriormente que son dirigidos a moléculas asociadas a tumor, se han diseñado anticuerpos que interaccionan y alteran la función de componentes solubles o celulares del sistema inmune con el fin de generar o reinstalar una respuesta antitumoral (Galluzzi et al. 2014). Esto se puede llevar a cabo mediante la inhibición de receptores inmunosupresores expresados en linfocitos activados, conocidos como puntos de control inmunes ("immune-checkpoints") como CTLA4, PD-1, o la familia de receptores KIR o sus ligandos (por ejemplo PDL-1 y PD-L2) (Cheng et al. 2013; Sharma & Allison 2015). Bajo condiciones fisiológicas, estos puntos de control actúan para evitar la hiperactivación de linfocitos T, con posible daño a tejido normal y enfermedades autoinmunes. De esta forma, la activación de linfocitos T está dada por un balance entre señales de co-estimulación y de co-inhibición necesarias para generar una respuesta inmune adecuada (Shih et al. 2014).

La FDA ha aprobado dos anticuerpos que inhiben puntos de control inmunes. Ipilimumab, una IgG1 humana tiene como blanco la molécula CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4)

evitando la interacción entre CTLA₄ con B7 (CD86), evadiendo este punto de control y por tanto amplificando las respuestas mediadas por los linfocitos T. El bloqueo de CTLA₄ induce muerte en linfocitos T regulatorios, potenciando aún más la respuesta antitumoral. Este anticuerpo es indicado para melanoma metastásico no resecable (Shih et al. 2014; Sliwkowski & Mellman 2013). Por su parte, PD-1 (Programmed death 1) también es una molécula co-inhibitoria que participa en las respuestas inflamatorias en tejidos periféricos. PD-1 se expresa en linfocitos T activados y principalmente en linfocitos Treg. Su interacción con ligandos PD-L1 o PD-L2 presentes a nivel tumoral, promueve la inhibición de quinasas relacionadas a la activación del linfocito T, por tanto disminuyendo su acción efectora. Dos anticuerpos dirigidos a PD-1 han sido aprobados por la FDA recientemente, Pembrolizumab (IgG₄ humanizado) para el tratamiento de melanoma no resecable que no responden a otras terapias y Nivolumab (IgG₄ humano) también para el tratamiento de melanoma y más recientemente para pacientes con cáncer de pulmón metastásico escamoso a células no pequeñas (NSCLC) que no responden a cisplatino. Cabe destacar que para potenciar su acción neutralizante, Pembrolizumab ha sido modificado en su región Fc para minimizar ADCC y CDC (Borch et al. 2015; Moreno & Ribas 2015).

Inhibición de componentes del estroma y vasculatura

Como se mencionó, la angiogénesis es un proceso clave en el desarrollo tumoral el cual está regulado por la familia del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF y sus receptores. Bevacizumab es un anticuerpo humanizado IgG₁ que bloquea el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) y por tanto altera o enlentece la formación de vasculatura que irriga al tumor (Ferrara et al. 2004). Bevacizumab está indicado para cáncer de colon metastásico y cáncer de pulmón, glioblastoma y renal (Falk et al. 2015). Si bien este es el único caso de un anticuerpo dirigido a una proteína soluble, este tipo de estrategias es común en enfermedades inflamatorias donde múltiples agentes han sido aprobados con blanco en citoquinas como TFN- α (Chan & Carter 2010).

Fragmentos de anticuerpos generados por ingeniería genética

El tamaño de los anticuerpos y sus derivados es un parámetro importante tanto en la farmacocinética como biodistribución, ya sea con finalidad terapéutica o diagnóstica. La administración terapéutica o diagnóstica requiere un balance entre la retención prolongada en el sitio blanco y el lento clearance sanguíneo que puede llevar a la acumulación hepática y una alta exposición de radiación en otros tejidos (Holliger & Hudson 2005).

Las inmunoglobulinas IgG pueden ser clivadas a sus dominios constitutivos por proteólisis enzimática (papaína o pepsina) a los fragmentos Fab (antigen-binding fragments) y la región constante Fc. Mediante ingeniería genética los dominios de las cadenas pesadas y livianas pueden ser combinados en una variedad de formatos de tamaño, estructura y valencia de diferentes características y aplicaciones.

Fv, scFv, Fab y dominios variables simples

El fragmento Fv, consistente en las regiones variables pesadas y livianas presenta el sitio de reconocimiento completo hacia el antígeno de menor tamaño (ver figura 7). Si bien ha sido generado de forma recombinante, la estrategia utilizada para expresarlo de forma estable consiste en unir ambas cadenas con un linker peptídico largo y flexible, constituyendo la molécula denominada Fv de cadena simple, **scFv** (single-chain Fv) (Huston et al. 1988; Bird et al. 1988). Alternativamente, también se han generado fragmentos Fab, los cuales contienen además de la región Fv, los dominios CH₁ y CL (ver figura 7) (Skerra & Plückthun 1988). Tanto los Fv como los scFvs usualmente mantienen la afinidad y especificidad al antígeno monovalente del anticuerpo parental, mientras que muestran penetrancia en el tejido con una farmacocinética más rápida respecto al anticuerpo completo (Fv) (Holliger & Hudson 2005).

La observación de que el dominio VH por si solo es capaz de reconocer al antígeno, dado su pequeño tamaño (15Kda) y su potencial de ser blanco de epítopes crípticos lo posicionó como una interesante herramienta terapéutica, (figura 7). Sin embargo, en estos fragmentos denominados dAb (single domain antibodies) la afinidad del anticuerpo parental es raramente mantenida, tienen baja solubilidad y alta tendencia a la agregación debido a la cantidad de residuos hidrofóbicos presentes en la interfase de unión con la cadena VL faltante (Holliger & Hudson 2005; Ward et al. 1989). Algunas estrategias han sido desarrolladas para resolver estos problemas, como la incorporación de mutaciones para minimizar la interfase hidrofóbica, o la selección de variantes más solubles a través de librerías de phage display (Dottorini et al. 2004).

Más recientemente se describieron dominios de tipo variable (V-like) de alta afinidad en camélidos (VhH) y peces cartilagosos (V-NAR). Las inmunoglobulinas de los camélidos y tiburones están compuestas únicamente de dos cadenas pesadas, y en el caso de los camélidos no presentan el primer dominio constante CH₁, la región de unión al antígeno se compone entonces de un único dominio de 130 aminoácidos (15kDa) análogo a la región VH (Pain et al. 2015). La expresión recombinante de esta cadena conforma el fragmento de unión a antígeno natural más pequeño, denominado VhH en camélidos, V-NAR en tiburones, anticuerpo de dominio simple (sdAb) o de forma genérica nanobody. A pesar de su pequeño tamaño, los VhH de camélidos se unen a sus antígenos con una alta afinidad (en el orden nanomolar) y especificidad (Dumoulin et al.

2002). La región CDR3 de estos anticuerpos posee la capacidad de formar largas extensiones o loops que pueden entrar en cavidades de antígenos como por ejemplo el sitio activo de enzimas. A diferencia de las VH de ratón, los dominios VhH de camélidos y V-NAR de tiburón son en general solubles y pueden ser producidos in vitro con relativa facilidad (Wesolowski et al. 2009).

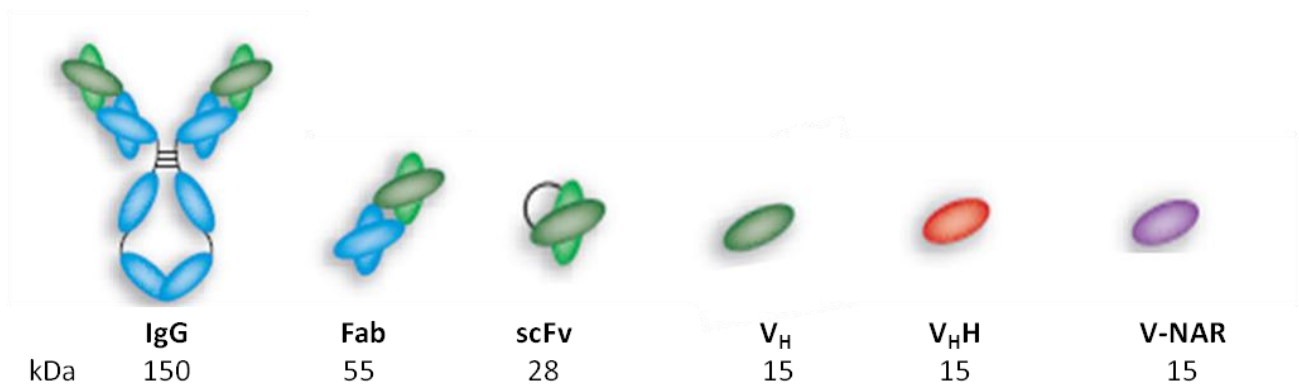


Figura 7. Estructura de fragmentos de anticuerpos recombinantes monovalentes. Se esquematiza estructura de una inmunoglobulina IgG a modo de referencia, Fab, scFv y VH, VhH corresponde a la región variable de inmunoglobulina de camélido mientras que V-NAR al dominio variable de inmunoglobulina de tiburón. Adaptado de Holliger & Hudson 2005.

Diseños multivalentes

En condiciones fisiológicas en suero y en los tejidos, incluso las moléculas de alta afinidad monovalentes presentan interacciones de rápida disociación con tiempos cortos de retención en el antígeno blanco. Para muchas aplicaciones, es deseable modificar fragmentos monovalentes a moléculas multivalentes, mejorando así la avidéz, reduciendo la tasa de disociación de la célula o superficie a la que esté dirigida y potenciando la biodistribución (Holliger & Hudson 2005).

Los formatos de anticuerpos multiméricos recombinantes es basta y pueden ser divididos según mantengan una estructura tipo IgG clásica o no (Cuesta et al. 2010).

En las moléculas análogas a IgG o "IgG-like" la estrategia más común es la generación de proteínas de fusión en donde los fragmentos de anticuerpos se fusionan a dominios constantes de cadena pesada (CH) o liviana (CL) de inmunoglobulina, o proteínas no relacionadas de dimerización (Figura 8) (Nuñez-Prado et al. 2015).

El fragmento scFv-Fc de 100-105 KDa se genera por fusión de un scFv con una región IgG CH (dominios CH₂ y CH₃) unidos por la región bisagra, representados en la figura 8. Estas moléculas también denominadas adhesinas, mostraron tener un alto poder neutralizante en infecciones virales (Johnson et al. 2009).

Los minibodies (80KDa) por su parte, están compuestos de la fusión de un scFv al extremo C-terminal de un dominio IgG1 CH₃ humano y se esquematiza en la figura 8 (Hu et al. 1996). Este

formato ha mostrado tener potencial como agente en imagenología en tomografía de emisión de positrones y tomografía computada (PET/CT) para diagnóstico de cáncer (Tavaré et al. 2014). En terapia, el potencial de minibodies ha sido mostrado en linfoma cutáneo a células T, mediante un modelo de terapia génica (Han et al. 2012).

Otras moléculas tipo minibody han sido generadas conectando fragmentos scFv a través de un pequeño linker a un CH₃ de IgG₁, denominado pequeña inmunoproteína (SIP) (Li et al. 1997) o por fusión del scFv a una fosfatasa alcalina bacteriana (Furuta et al. 1998). Más aún, el minibody ha sido modificado a un formato trimérico biespecífico denominado tribi-minibody de 115KDa (Shahied et al. 2004).

Los dominios IgM CH₂ así como el dominio CH₂ de IgE también han sido utilizados como módulos de homodimerización para la generación de proteínas de fusión biespecíficas (Seifert et al. 2012). Además de las secuencias típicas de inmunoglobulinas, otras proteínas con capacidad de dimerización pueden ser incorporadas. En el ZIP miniantibody de 64kDa, dos fragmentos scFv son unidos mediante dominios tipo cremallera de Leucina Fos o Jun, que genera una estructura análoga a la región Fc denomina (Pack & Plueckthun 1992; Cuesta et al. 2010).

Adicionalmente se han generado construcciones que no son estructuralmente relacionadas a la IgG parental, conformando el segundo grupo de anticuerpos multiméricos de distintas propiedades según su valencia y tamaño.

Si se modifica el largo del linker que une los dominios variables de un scFv se previene la interacción intramolecular forzando la formación una estructura dimérica denominada **Diabody** de 55kDa (Holliger et al. 1993). Más aún, los diabodies pueden ser biespecíficos, presentando afinidad a dos antígenos distintos o estar formados por un tándem de scFv (scDb). Estas modalidades serán descritas en detalle en el apartado siguiente.

Si se reduce aún más el linker entre los dos dominios (VH-VL) de un scFv resulta en la formación de estructuras triméricas (triabodies) de 80kDa o tetraméricas (tetraabodies) de 110 kDa como se aprecia en la figura 8 (Todorovska et al. 2001).

Los dominios variables simples también han sido empleados para generar anticuerpos multivalentes de varios formatos por ejemplo moléculas bifuncionales se han producido por el clonado en tándem de dos VhH nanobodies (Conrath et al. 2001).

Dominios de oligomerización no relacionados a inmunoglobulinas han sido usados para generar anticuerpos multivalentes de distintos formatos. La fusión de un scFv al factor de necrosis tumoral alfa TNF- α (citoquina que es trimérica) genera moléculas de fusión homotriméricas con tres sitios de unión al antígeno de 135 kDa y mantiene además la actividad de la citoquina, aumentando el potencial anti-tumoral (Balza et al. 2006). La ribonucleasa denominada Barnasa de 12 kDa y su inhibidor barstar de 10kDa forman complejos que han sido utilizados para generar anticuerpos

estables tri o tetravalentes (Deyev et al. 2003). De forma análoga scFvs también han sido fusionados a dominios derivados de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, el cual forma trímeros, conformando así trimeribodies de 110 kDa (Cuesta et al. 2009).

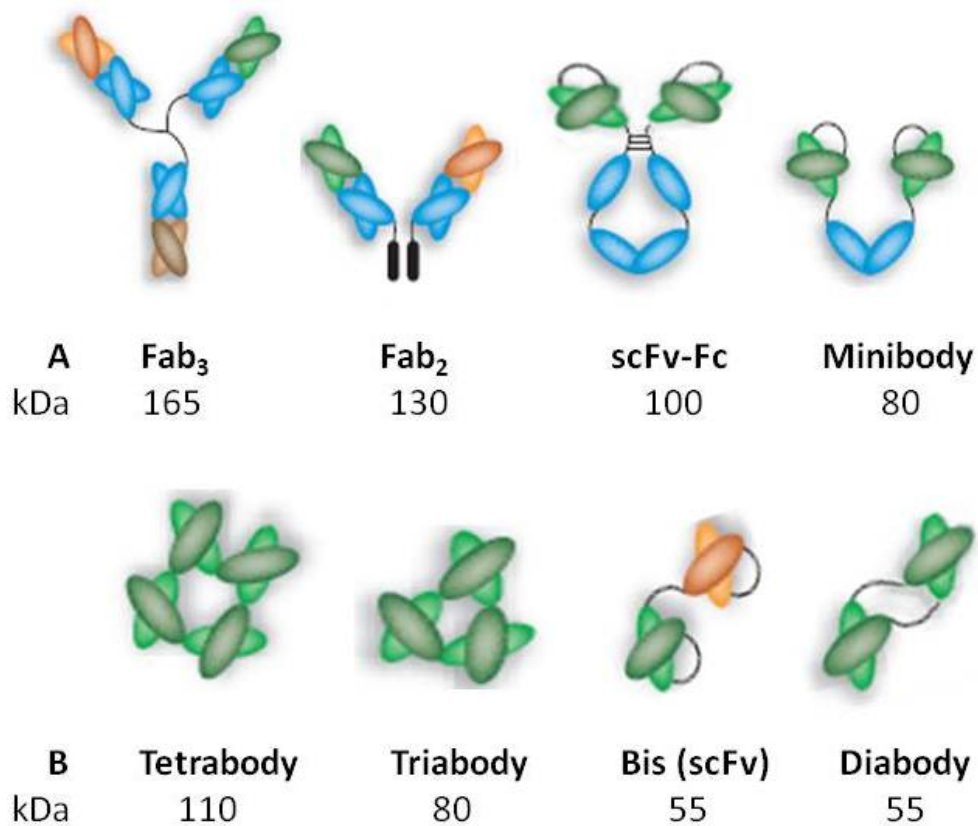


Figura 8 Fragmentos de anticuerpos multivalentes. A. Moléculas IgG-like, Fab₃ triespecífica, Fab₂ biespecífica, scFv-Fc y Minibody bivalentes monoespecíficos. B. Fragmentos no IgG-like Tetrabody tetravalente, triabody trivalente, Bis (scFv) bivalente biespecífico y Diabody bivalente monoespecífico. Adaptado de (Holliger & Hudson 2005).

Diabodies

Como se mencionó anteriormente, una de las limitantes que presentan las moléculas scFv es la monovalencia. Incluso cuando la afinidad de unión es alta, la disociación ocurre rápidamente, limitando los tiempos de retención con el antígeno especialmente en condiciones de no-equilibrio como en un ambiente fisiológico (Holliger & Hudson 2005). La estructura de un scFv como ya se describió consiste en los dominios VH y VL unidos mediante un linker peptídico de residuos hidrofílicos que no interfieren con las regiones variables que no son blanco de proteasas. Generalmente se eligen Serina y Glicina en un formato Ser₄Gly. Si la longitud del linker es entre tres y doce residuos los dominios variables no son capaces de plegarse en un dominio Fv funcional, sino que se asocian con una segunda molécula de scFv para formar un dímero, en el cual la interacción entre VH y VL es intercatenaria, conformando así un Diabody de 55kDa (Holliger et al.,

1993). Se ha observado que la reducción del linker por debajo de dos aminoácidos promueve la formación de trímeros o tetrámeros. El tipo de multímero dependerá de la conformación de la construcción (VH-VL vs VL-VH), las características de los aminoácidos en la interface, y las interacciones entre las de los dominios V particular de cada anticuerpo (Todorovska et al. 2001). Alternativamente a la construcción clásica de los diabodies como un homodímero de cadenas de scFv, los denominados single-chain diabodies (scDb de 57kDa) son moléculas donde los polipéptidos que forman el diabody están unidos por un linker flexible adicional (Kipriyanov et al. 1999) En el presente trabajo de tesis, este formato de Diabody será denominado Diabody en Tándem. Adicionalmente, pueden expresarse dos moléculas scFv en tándem, al incluirse en este caso un linker corto entre ambos dominios (Figura 9), el que se denomina (scFv)₂.

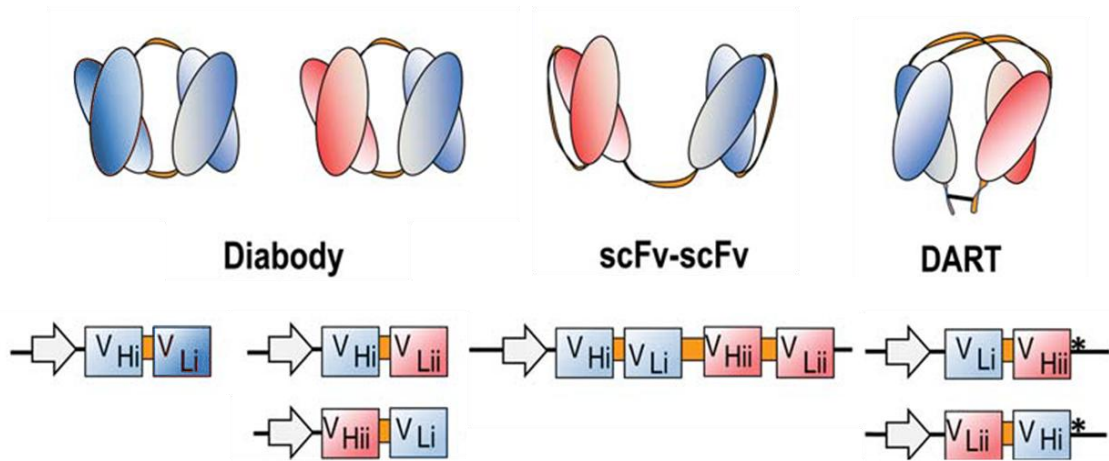


Figura 9 Formatos de Diabodies. Diabody mono y biespecífico, scFv-doble o Diabody en tándem y DART. Se esquematiza la estructura y la construcción génica, se denota i o ii la especificidad de reconocimiento (azul-rojo), en anaranjado el linker y con asterisco la adición de cisteínas que conforman enlace disulfuro intercatenario. Adaptado de (Weidle et al. 2013).

Los diabodies bivalentes pueden ser estabilizados mediante enlaces disulfuro. De esta forma se evita la disociación y re asociación de un dominio variable con otro de otra molécula, lo que puede promover agregados en un proceso denominado intercambio de dominio (Johnson et al. 2010). El enlace incorporado debe estar en regiones framework conservadas, distantes de los CDRs de forma de no interferir con la región de reconocimiento antigénica y la distancia entre la región VH y VL debe ser pequeña para permitir la formación del enlace sin modificar la conformación general. A modo de ejemplo, dos posiciones localizadas en la interface entre VH y VL se han descrito (considerando la numeración de aminoácidos según Kabat), en las posición 44 del framework 2 (FR2) de VH y la posición 100 del FR4 de VL pueden incorporarse cisteínas, generando entonces dos enlaces intercatenarios en la molécula dimérica. Alternativamente, la

estabilización de las dos cadenas mediante incorporación de un enlace disulfuro puede ser incorporado en el extremo C-terminal, por lo que el enlace une de forma covalente dos dominios que no interactúan entre sí (ver figura). Este tipo de construcción se utilizó en diabodies biespecíficos denominados DART (dual-affinity-re-targeting molecules) (Johnson et al. 2010).

Adicionalmente, los diabodies presentan la capacidad de ser biespecíficos, si se diseñan cadenas VHA-VLB y VHB-VLA expresados en la misma célula, la formación de heterodímeros generará una molécula con reconocimiento por los antígenos A y B (Holliger et al. 1993). Diabodies biespecíficos y su análogo (scFv)₂ han sido desarrollados para varias aplicaciones, incluyendo el reclutamiento de linfocitos T y Natural Killer a células tumorales. Esta variante ha sido denominada BiTE (Bispecific T cell engager) por potenciador Biespecífico de linfocitos T (Wolf et al. 2005). Estas construcciones redirigen linfocitos T a través de la molécula CD3 a células tumorales a través del reconocimiento de un antígeno tumoral específico. Induciendo la formación de una sinapsis transitoria entre ambas células, resultando en la activación, proliferación y lisis de la célula tumoral (Zugmaier et al. 2015). Varios estudios han mostrado la capacidad de estas moléculas en el reclutamiento de linfocitos efectores en ensayos preclínicos. De hecho, ensayos clínicos con la molécula anti-CD3_anti-CD19 denominada Blinatumomab reveló una alta respuesta en diferentes neoplasias B (Frankel & Baeuerle 2013). Blinatumomab obtuvo una aprobación acelerada por la FDA en 2014 para el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) y se convirtió en el primer fragmento de anticuerpo biespecífico terapéutico en uso clínico. Cabe destacar, que dado el alto clearance sanguíneo que presentan moléculas de este tamaño, el modo de aplicación es de forma continua mediante una bomba portátil que mantiene la dosis sanguínea constante en el paciente. (Zugmaier et al. 2015).

Tres moléculas de tipo BiTE están siendo evaluadas en ensayos clínicos dirigidas a tumores sólidos, una dirigida a la molécula de adhesión EpCAM, otra al antígeno carcinoembrionario CEA y finalmente un diabody dirigido al antígeno específico de membrana de próstata PSMA (Frankel & Baeuerle 2013).

Adicionalmente, dímeros de diabodies pueden ser generados si se acorta el linker entre scDBs, el resultante tándem diabody o TandAb [sc(Fv)₂]₂ de 115kDa es un anticuerpo dimérico tetravalente mono o biespecífico (Völkel et al. 2001). Estas moléculas tetravalentes con mayor avidéz y vida media en sangre respecto a los diabodies, pueden ser adecuadas para estrategias terapéuticas mediadas con radionucleídos (Goel et al. 2000). Un diabody TandAb biespecífico anti-CD16_anti-CD30 mostró ser eficiente en el reclutamiento de linfocitos NK y lisis de células CD30 malignas. Esta molécula denominada AFM13 ha sido evaluada en ensayos clínicos de fase I para Linfoma no-Hodking (Rothe et al. 2015).

Los Diabodies han mostrado poseer potencial en la generación de fusiones anticuerpo-citoquinas también denominadas "inmuno-citoquinas". Varias citoquinas como GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-10, IL-

15, IL-18 e INF- α han sido utilizadas con blanco en componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y tenasina, que son altamente expresados en la vasculatura tumoral (Nuñez-Prado et al. 2015). Varias inmunocitoquinas están siendo evaluadas en ensayos clínicos. A modo de ejemplo, L19-IL2, un diabody anti fibronectina fusionado a dos moléculas de IL-2, ha sido evaluado en ensayos clínicos fase II para pacientes con carcinoma metastásico renal y para el tratamiento de melanoma (List & Neri 2013).

Inmunotoxinas

Así como los anticuerpos pueden ser ligados a drogas en los conjugados droga-anticuerpos descritos anteriormente, los fragmentos de anticuerpos también han sido utilizados con este fin. Particularmente, las inmunotoxinas combinan la alta potencia de dominios enzimáticos provenientes de plantas o bacterias con la especificidad dada por los fragmentos derivados.

Las inmunotoxinas tienen varias propiedades que no presentan los anticuerpos conjugados a drogas. En primer lugar, el mecanismo de acción de las inmunotoxinas tiene un rol no solapante con otras drogas quimioterapéuticas permitiendo su combinación. Adicionalmente, las inmunotoxinas no se basan en la replicación para actuar (como inhibidores de tubulina), por lo que pueden eliminar células quiescentes que presenten el marcador utilizado de reconocimiento. Más aún, dado que los linker peptídicos que unen las toxinas al anticuerpo requieren acción de proteasas intracelulares específicas, se reduce el efecto de citotoxicidad que pueden presentar algunos conjugados químicos (Alewine et al. 2015).

Las toxinas más utilizadas son la diftérica de *Corynebacterium diphtheria*, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* de origen bacteriano y las toxinas vegetales ricina de *Ricinus communis* y la saporina proveniente de *Saponaria officinalis* (Shapira & Benhar 2010). El mecanismo de acción de todas ellas es la inhibición de la síntesis proteica, para la cual es necesaria la internalización de la misma en la célula blanco. Tanto la toxina diftérica como exotoxina A catalizan la ribosilación del factor de elongación 2 eF2 en el residuo de diftamina, una histidina modificada inhibiendo la elongación del péptido en síntesis. Por su parte las toxinas de plantas como la Ricina inactivan ribosomas vía actividad glicosidasa, hidrolizando el enlace N-glicosídico de un residuo de adenina en el ARN 28s ribosomal (Wayne et al. 2014).

Exotoxina A (PE)

Esta toxina de *Pseudomonas aeruginosa* está compuesta por 638 aminoácidos (69kDa) que son procesados mediante remoción de 25 residuos N-terminal antes de su secreción como una proteína de 613 aminoácidos (66kDa) (Weldon & Pastan 2011). La versión de exotoxina A más utilizada en el diseño de inmunotoxinas, es una proteína de 38 kDa conocida como PE38 la cual tiene deletado el dominio Ia (1- 250) y una porción del dominio Ib (365-380).

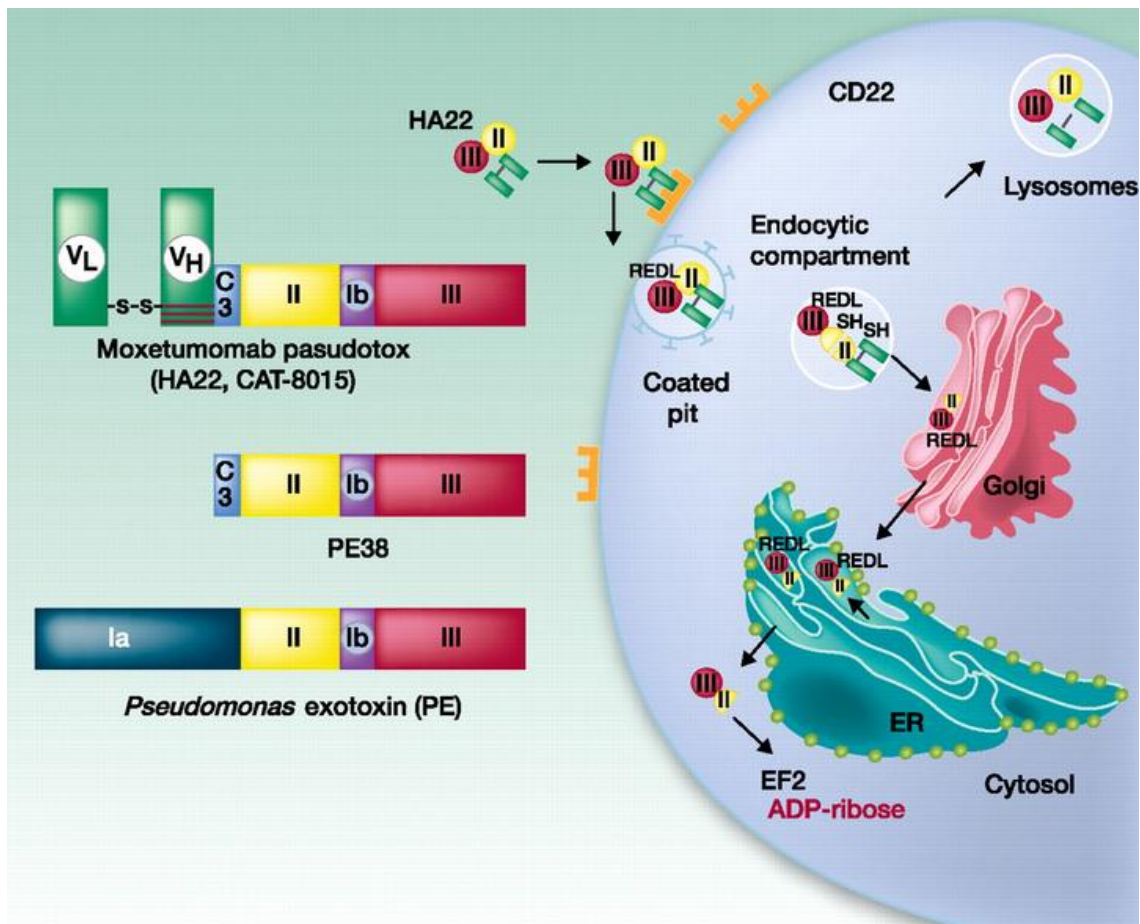


Figura 10. Mecanismo de acción de un inmunotoxina anti CD22(Kreitman & Pastan 2011).

Las inmunotoxinas más activas son aquellas que se dirigen a antígenos que son eficientemente internalizados (Du et al. 2008). En el compartimiento endocítico, PE se cliva en un sitio furina del dominio II y adicionalmente se reduce un enlace disulfuro formado por cisteínas en las posiciones 265 y 287 (Weldon & Pastan 2011). En el caso de inmunotoxinas de fusión es en este paso en el que la porción de anticuerpo expresado N-terminal se disocia del dominio catalítico. El fragmento C-terminal compuesto por el dominio III y una porción del dominio II, es luego transportado, al retículo endoplásmico desde donde es translocado al citosol. Una vez en el citosol se encarga de modificar de forma irreversible el factor de elongación EF2. El residuo ribosilado, está conservado en eucariotas y arquea pero no en procariontes, generando la inhibición de la síntesis proteica e inducción de apoptosis. Este proceso está esquematizado en la figura 10 para una inmunotoxina con blanco en CD22 (Kreitman & Pastan 2011).

Varias inmunotoxinas con blancos en cáncer hematológicos han sido evaluadas en ensayos clínicos. BL22 es un Fv estabilizado con un enlace disulfuro con blanco en CD22 fusionado a PE38. Esta inmunotoxina fue evaluada en ensayos clínicos fase I y II en pacientes con "Hairy cell leukemia" (HCL), donde un 81% de los pacientes mostró una tasa de respuesta objetiva (ORR) de 81% y un 61% una respuesta completa (CRs), mientras que en la fase II se obtuvo un ORR del 73% y CR de 47%. Para mejorar la actividad, se generó una segunda inmunotoxina de mayor afinidad a

CD22 mediante "phage display", por mutación de tres residuos en el VH CDR₃ potenciando la afinidad 15 veces y la citotoxicidad 50. Esta inmunotoxina denominada Moxetumomab Pasudotox o HA22 fue evaluada en ensayos fase I para pacientes de HCL refractario a quimioterapia, y mostró una respuesta del 86% y un 46% de pacientes logró remisión completa a dosis menores de la droga. Basados en estos resultados, esta molécula está siendo evaluada en ensayos clínicos fase III. Adicionalmente se ha evaluado fase I para leucemia linfoblástica aguda en niños. Una respuesta completa del 25% fue reportada para pacientes pediátricos, mostrando actividad en el 67% de los pacientes Evaluaciones en fase II están en desarrollo y para adultos con ALL fase I y II. (Kreitman & Pastan 2011; Alewine et al. 2015).

En relación a inmunotoxinas dirigidas a tumores sólidos, SS1P conformada por PE38 y SS1 anti mesotelina (MSLN) ha llegado a evaluaciones clínicas de fase I y II (Kreitman et al. 2009). Estos ejemplos muestran que el uso de inmunotoxinas en la clínica puede conformar un tratamiento con resultados durables. Sin embargo, el conocimiento del mecanismo de acción, evaluación de la toxicidad y desarrollo de estrategias de administración que minimicen la respuesta de anticuerpos neutralizantes y efectos colaterales son necesarias para generar un fino equilibrio entre respuesta y toxicidad

Farmacocinética y biodistribución de anticuerpos y derivados.

La farmacocinética y biodistribución de los anticuerpos y fragmentos derivados son parámetros importantes en el uso de los mismos con finalidad terapéutica o diagnóstica. Se requiere un balance entre la retención en el sitio blanco y el clearance sanguíneo para minimizar efectos colaterales no deseados como la acumulación hepática o una alta exposición en caso de radioconjugados en otros tejidos (Holliger & Hudson 2005). El tamaño es uno de los factores determinantes, los anticuerpos IgG de 150 kDa, muestran una larga vida media en circulación sanguínea (mayor a 10 días) y presentan una lenta captación en tumores sólidos. La larga vida media de las IgG es explicada no sólo por su tamaño, sino por la interacción de las regiones Fc de forma pH dependiente con el receptor FcRn en el endotelio vascular, hígado y otros tejidos. La unión IgG con FcRn evita la degradación lisosomal a través de reciclaje y transcitosis hacia la membrana y posterior liberación al espacio extracelular (Challa et al. 2014). Este parámetro puede ser modulado aún más introduciendo mutaciones en la región Fc modificando así la interacción con el receptor FcRn; mutaciones que potencien la unión al mismo pueden ser utilizadas para prolongar la vida media de anticuerpos terapéuticos, o contrariamente, para reducir estas interacciones y acelerar el clearance sanguíneo (Wu 2014). De esta forma, fragmentos que no contienen Fc no son protegidos del transporte al compartimento lisosomal y son subsecuentemente degradados los fragmentos pequeños como los scFv de 30kDa, son eliminados

rápidamente de la circulación a nivel renal (Wu 2014). Moléculas mayores a 50-60kDa (por encima del umbral de clearance rena), son removidas por el hígado, y la tasa está controlada por la presencia o ausencia del dominio Fc. Los fragmentos de tamaños intermedios como los diabodies y minibodies presentan una tasa de clearance sanguíneo de corta vida media (entre 6 y 7 horas). Esta característica se hace importante en moléculas radiomarcadas, ya que se limita la exposición de la médula ósea (Holliger & Hudson 2005). La localización y penetrancia tumoral depende además de otros parámetros como la afinidad y la avidéz. De esta forma, moléculas multivalentes presentarán mejor retención tumoral que sus contrapartes monovalentes. Para tumores sólidos, se debe tener en cuenta además la penetrancia a través de la vasculatura y la dispersión contra la presión intersticial. IgGs de 150 kDa específicas de tumor pueden infiltrar los tumores solamente de forma lenta y no uniforme en su distribución final mientras que los diabodies tienen como característica una rápida absorción tisular y una alta retención en el blanco dada su bivalencia (Cuesta et al. 2010).

Otros atributos como baja inmunogenicidad, que permita repetición de dosis, ausencia de funciones efectoras asociadas, estabilidad en suero así como un diseño simple de fácil expresión son importantes en el contexto del uso de fragmentos de anticuerpos con fines diagnósticos o terapéuticos (Wu 2014)

Anticuerpos en diagnóstico de cáncer.

A nivel diagnóstico, la imagenología nuclear es la modalidad más común no invasiva en cáncer. La misma consiste en la utilización de radiomarcadores que se concentran en tejido tumoral, generando una señal para la visualización de tumores. Esta técnica no invasiva, permite cuantificar específicamente el blanco molecular a nivel de cuerpo entero y permite además seguir los cambios de la biología del tumor en función del tiempo por ejemplo a lo largo de un tratamiento (Knowles & Wu 2012). Dependiendo el tipo de emisor radioactivo las imágenes nucleares pueden ser clasificadas como SPECT (single photon emission computed tomography) o PET (positrón emission tomography) (Kaur et al. 2012). El PET presenta ventajas inherentes sobre el SPECT en términos de sensibilidad y resolución, aportando información cuantitativa sobre la distribución de la actividad en el tiempo. El éxito de esta herramienta depende de generar imágenes de alto contraste entre células tumorales y tejido normal. Para ello los distintos radioisótopos son unidos a moléculas con blanco en células tumorales, siendo los anticuerpos y los fragmentos derivados una de las estrategias utilizadas con este fin (Wu & Olafsen 2008).

Varias de las características que han promovido el desarrollo de los anticuerpos como estrategias terapéuticas también se aplican a nivel de agentes imagenológicos en diagnóstico. La capacidad de generar moléculas de alta especificidad por componentes asociados a tumor y que no

interaccionen con tejido normal, la afinidad o la baja inmunogenicidad. Sin embargo, es deseable con fines diagnósticos que el compuesto sea inerte, es decir que no interaccione con la célula blanco ni genere modificaciones funcionales como la activación celular, inducción de apoptosis o reclutamiento de efectores inmunes. Una alternativa a los efectos generados por el Fc, es el uso de fragmentos que no presenten este dominio o lo incluyan con modificaciones (Wu 2014).

La farmacocinética es otro de los puntos donde terapia y diagnóstico requieren diferentes estrategias. La presencia de un agente en concentraciones significativas en sangre tiene efectos beneficiosos a nivel terapéutico, por el contrario, en diagnóstico esto genera imágenes de pobre contraste o implica un aumento en el tiempo entre administración y toma de imagen. Los fragmentos de anticuerpos retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo parental, exhiben como se describió en el apartado anterior vidas medias más cortas respecto a anticuerpos enteros. Esta característica puede mejorar los protocolos que requiere entre 5-7 días de separación entre la administración de los anticuerpos enteros y la generación de imágenes. Otras características que deben cumplir anticuerpos o sus fragmentos para ser buenos agentes imagenológicos son una buena retención tumoral (dada por la valencia), estabilidad en suero, ausencia de glicosilación e incorporación de sitios de conjugación para los radionucleídos (por ejemplo cisteínas terminales). Según lo expuesto anteriormente, la elección del radionucleído está dictado tanto por la técnica de detección así como las características farmacocinéticas de la molécula a la cual será ligada (Holliger & Hudson 2005).

En la técnica de SPECT se utilizan emisores de fotones simples (rayos gamma). Si bien esta técnica es entre 10 y 100 veces menos sensible que el PET tiene un menor costo y da la posibilidad de usar varias sondas simultáneamente (Kaur et al. 2012). El radioisótopo más utilizado ha sido ^{99m}Tc , con una vida media de 6hs. Arcitumomab, un fragmento Fab contra el antígeno carcinoembrionario CEA marcado con ^{99m}Tc compone un agente imagenológico para cáncer de colon (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)). Emisores gama de vida media mayor como ^{111}In (2,8 días), ^{131}I (8,0 días) y ^{177}Lu (6,7 días) son utilizados para anticuerpos enteros, por ejemplo, satumomab pentetide un anticuerpo contra la glicoproteína asociada a tumor TAG-72 para cáncer colorectal y capromab pandetide anti-PSMA marcado con ^{111}In para pacientes con cáncer de próstata metastásico están aprobados por la FDA (Keane et al. 2006).

Por su parte la técnica PET se basa en la detección de positrones por decaimiento nuclear. Si bien ^{18}F es uno de los conjugados más utilizados, diferentes emisores de positrones están actualmente en investigación para anticuerpos radiomarcados en inmuno-PET. Agrupados de acuerdo a sus vidas medias, los emisores de positrones con vida media más corta incluyen al ^{68}Ga (1,1 hs) y ^{18}F (1,8 hs); los de vida media intermedia corresponden a ^{64}Cu (12,7 hs), ^{86}Y (14,7 hs) y ^{76}Br (16,2 hs); y los de vida media larga, como el ^{89}Zr (78,4 hs) y ^{124}I (100,3 hs) (Kaur et al. 2012).

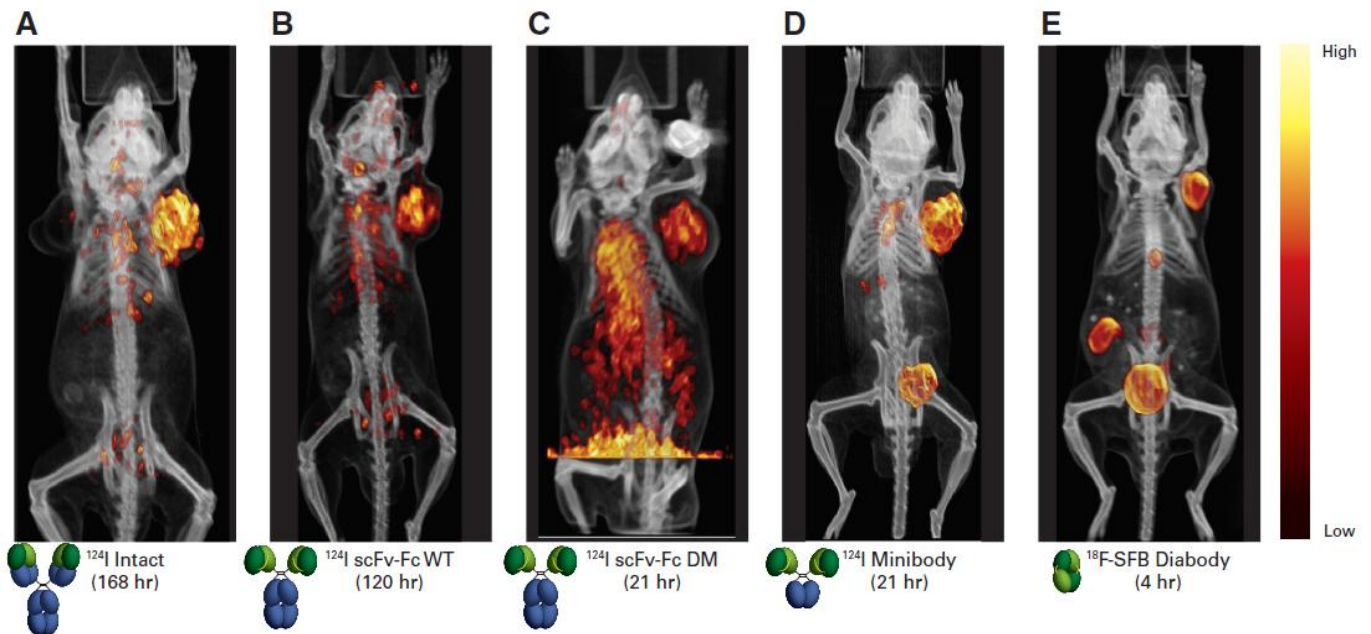


Figura 11 Micro PET/CT de ratones con tumores generados por xenotransplante de la línea LAPC-9 de próstata que expresan el antígeno de célula madre de próstata (PSCA) utilizando anticuerpos contra PSCA. A. Imagen con un anticuerpo entero, B. scFv-Fc, C. scFv-Fc con mutaciones en la región de interacción con FcRn, D. Minibody E. Diabody marcado con ^{18}F , se observa señal en vejiga y ciego por excreción de metabolitos radiomarcados en bilis (Knowles & Wu 2012)

Los diabodies muestran como se indicó anteriormente, una vida media entre 3 y 7 horas, además de una alta penetrancia tumoral y retención con rápido clearance permitiendo la toma de imágenes en el mismo día. Adicionalmente, la vida media de esta molécula permite utilizar ^{18}F o ^{68}Ga que además de tener vidas medias cortas, tienen mayor rendimiento de emisión de positrones, en relación a radionucleídos de mayor vida media (Freise & Wu 2015).

Esta estrategia ha sido evaluada en micro-PET en modelos murinos con varios diabodies, dentro de los que se destacan anti antígeno de células madre de próstata PSCA marcados con ^{124}I (Leyton et al. 2009) (figura 12), diabodies con reconocimiento para HER2 marcados con ^{124}I (Robinson et al. 2005; Reddy et al. 2011) o ^{18}F (Olafsen et al. 2012), a la molécula de adhesión celular de leucocitos activados (ALCAM/CD166) marcados con ^{64}Cu (McCabe et al. 2012) así como CD20 marcado con ^{124}I (Olafsen et al. 2009). Se muestra en la figura 11 una comparación entre imágenes obtenidas con distintos fragmentos de anticuerpos dirigidos contra el mismo antígeno tumoral PSCA (Knowles & Wu 2012).

Expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes.

Varios sistemas de expresión para fragmentos de anticuerpos han sido evaluados y reportados los que incluyen sistemas procariotas como *Escherichia coli* (Holliger et al. 1993; Mansfield et al. 1997), levaduras como *Picchia pastoris* (Kogelberg et al. 2013), células de insectos como S2 de *Drosophila melanogaster* (Gilmartin et al. 2012; Backovic et al. 2010) o mediada por baculovirus (Furuta et al. 2012) células de mamífero como HEK293- 6E (Kiesgen et al. 2015) o CHO (Hess & Neri 2015). De hecho numerosos estudios han sido realizados para evaluar la cantidad y calidad de diabodies producidos en diferentes sistemas de expresión. A pesar de estos esfuerzos, el rendimiento obtenido en cada sistema de expresión de un fragmento de anticuerpo derivado de un anticuerpo parental depende fuertemente de la secuencia aminoacídica individual y por tanto, es característica de cada caso (Gilmartin et al. 2012).

Sistemas Procariotas *E. coli*.

La enterobacteria *Escherichia coli* es utilizada en la producción industrial de proteínas recombinantes. Esto se debe al bajo costo de producción, el rápido crecimiento, la facilidad en la manipulación y el alto rendimiento, en conjunto al gran conocimiento de la genética de este microorganismo. Como desventajas las proteínas generadas no contienen modificaciones postraduccionales como glicosilación, contienen altos niveles de endotoxinas y pueden generarse proteínas insolubles en cuerpos de inclusión (Correa & Oppezzo 2015; Gilmartin et al. 2012).

Si bien la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli* es relativamente simple, la sobreexpresión de fragmentos de anticuerpos como scFvs generalmente forma agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión (Katsuda et al. 2012). La preparación de proteínas funcionales a partir de éstos puede realizarse mediante resolubilización de las mismas. Este proceso comprende desnaturalización de proteínas mediante detergentes o desnaturalizantes y el plegado ("refolding") mediante reducción de los agentes desnaturalizantes y agregado de pares redox en caso de formación de enlaces disulfuro. Varias estrategias han mostrado éxito en el refolding de fragmentos de anticuerpos como dilución, diálisis, refolding en fase sólida o cromatografía de gel filtración (Arakawa & Ejima 2014). ScFvs, diabodies e inmunotoxinas entre otros fragmentos han sido producidos de forma funcional empleando esta estrategia (Yuasa et al. 2012; Ortega et al. 2013; Pastan & Ho 2010).

Alternativamente, para reducir la formación de cuerpos de inclusión, proteínas como fragmentos de anticuerpos con enlaces disulfuro pueden ser expresadas en el espacio periplásmico donde chaperonas como DsbC y DsbA catalizan la formación de enlaces disulfuro estables. Esta estrategia fue descrita en la expresión de Diabodies mono y biespecíficos (Holliger et al. 1993). Sin embargo, el espacio periplásmico es reducido y la secreción de proteínas grandes puede ser

ineficiente a través de los transportadores de membrana., resultando en bajo rendimiento (Chames 2012).

Adicionalmente, para producir proteínas solubles y funcionales a nivel de citoplasma se han desarrollado distintas estrategias. En primer lugar, la presencia de codones poco comunes para *E. coli* puede tener una influencia negativa en los niveles de expresión. Para superar este punto se han diseñado programas que permiten estimar el nivel de codones raros para el sistema y sustituirlos mediante síntesis génica *de novo* o alternativamente se han generado cepas que contienen tRNAs suplementarios como por ejemplo BL21 CodonPlus (Novagen) o Rosetta (Invitrogen) (Correa & Oppezzo 2015). Por otra parte, el empleo de cepas con mutaciones en tioredoxin reductasa (trxB) o glutatión reductasa (gor) como SHuffle (New England biolabs) o Rosetta-gami (Novagen) así como el uso de co-expresión de chaperonas relacionadas a la formación de enlaces disulfuro (Dscbc, PDI, Erv1p) son dos estrategias que permiten la formación de estos enlaces a nivel citoplasmático (Katsuda et al. 2012; Nguyen et al. 2011). Otra estrategia ampliamente descrita es la expresión de proteínas de fusión para favorecer la solubilidad de las mismas, las principales proteínas de fusión son la proteína de unión a maltosa (MBP), S-Transferasa (GST), Tioredoxina A (TrxA), Disulfil isomerasa C (DsbC), proteína modificadora pequeña tipo ubiquitina (SUMO), entre otras. Esta estrategia tiene como desventaja que luego de expresada la proteína, en algunos casos las proteínas únicamente son solubles en fusión con las mismas, y una vez que se elimina la proteína fusionada la proteína de interés puede precipitar (Correa & Oppezzo 2015).

A nivel de cultivo, varios parámetros como inducción, temperatura y composición del medio tienen efectos importantes en el rendimiento de proteínas solubles. Se ha mostrado, que la disminución de la temperatura durante la inducción (16-25°C) puede aumentar el rendimiento de proteína solubles funcionales. Generalmente, la expresión a baja temperatura lleva a un aumento en la estabilidad y correcto plegamiento de proteínas, las interacciones hidrofóbicas que determinan la formación de cuerpos de inclusión son temperatura dependientes y promueve un aumento en la expresión y actividad de chaperonas (Sahdev et al. 2008; Vera et al. 2007). En cuanto al medio de cultivo, varios tipos han sido usados para la expresión proteica con rendimientos desde Luria Broth (LB), Terrific Broth (TB), Supero Broth (SB) entre otros, así como la condición de inducción, dependen fuertemente caso a caso, por lo que en conjunto con el uso de diferentes cepas, temperaturas y construcciones deben ser evaluadas para determinar cuáles son las mejores condiciones de expresión (Correa & Oppezzo 2015).

Sistemas eucariotas – Células S2 de *Drosophila melanogaster*.

La línea celular de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) ha sido usada para la expresión de altos niveles de IgGs completos recombinantes así como fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos son secretados y se acumulan en el sobrenadante alcanzando niveles entre 5 y

35mg/L. De hecho, los anticuerpos producidos han mostrado tener propiedades análogas a las obtenidas de sistemas en células de mamífero como células CHO (Johansson et al. 2012).

Las células S2 fueron aisladas de un cultivo primario de embriones de *D. melanogaster* (Schneider 1972) y pueden crecer a altas densidades en suspensión, a temperatura ambiente y en condiciones atmosféricas, haciendo el escalado sencillo. Adicionalmente, estas células pueden crecer en medio sin agregado de suero, facilitando la purificación y reduciendo costos de producción (Johansson et al. 2012; Moraes et al. 2012).

La expresión proteica en este sistema puede ser transiente o estable, mediante co-transfección con un plásmido de selección. Una característica interesante de las células S2 consiste en que pueden integrar múltiples plásmidos en su genoma permitiendo la generación de clones de alta expresión. Las proteínas pueden ser expresadas bajo control de promotores de metalotioneina, inducidos por metales pesados como cobre o cadmio y una secuencia N-terminal BiP se fusiona para dirigir los productos génicos a través de la vía de secreción al medio de cultivo. De forma interesante, a diferencia de otros sistemas como baculovirus, la expresión está basada en la generación de una línea celular no lítica que permite altas cantidades de producción en un ambiente bajo en proteasas (Moraes et al. 2012).

Una potencial desventaja de este sistema de expresión es el patrón de glicosilación alto en manosa que difiere del de mamíferos. Esto puede afectar varias propiedades relacionadas a la región Fc de los anticuerpos, como la vida media. Sin embargo, para fragmentos de anticuerpos como los diabodies que no contienen los sitios de glicosilación no sería relevante. Se ha descrito este sistema para la expresión tanto de anticuerpos completos como fragmentos ScFv, Fab y Diabodies (Gilmartin et al. 2012).

Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es una de las principales modificaciones post-traduccionales, de hecho en humanos el 50% de las proteínas presenta esta modificación que ocurre por la unión de una o más cadenas oligosacáridicas a la secuencia aminoacídica (Jensen et al. 2010; Spiro 2002; Freire et al. 2002). A diferencia de otras modificaciones post-traduccionales hay una gran diversidad dada la variedad de glicanos que se pueden producir. En mamíferos los glicanos se construyen de una combinación de 10 monosacáridos (Gal, Glc, Man, Fuc, Xyl, GalNAc, GlcNAc, GlcA, IdoA y N-acetilneuramínico o ácido siálico) que pueden unirse vía enlaces glicosídicos α o β para formar estructuras lineales o ramificadas. En las glicoproteínas 8 aminoácidos participan en uniones de tipo glicoproteína, si se suma a su vez la diversidad adicional generada por las ramificaciones y los azúcares terminales complejos, la diversidad molecular y de funciones aumenta de forma exponencial (Hart & Copeland 2010).

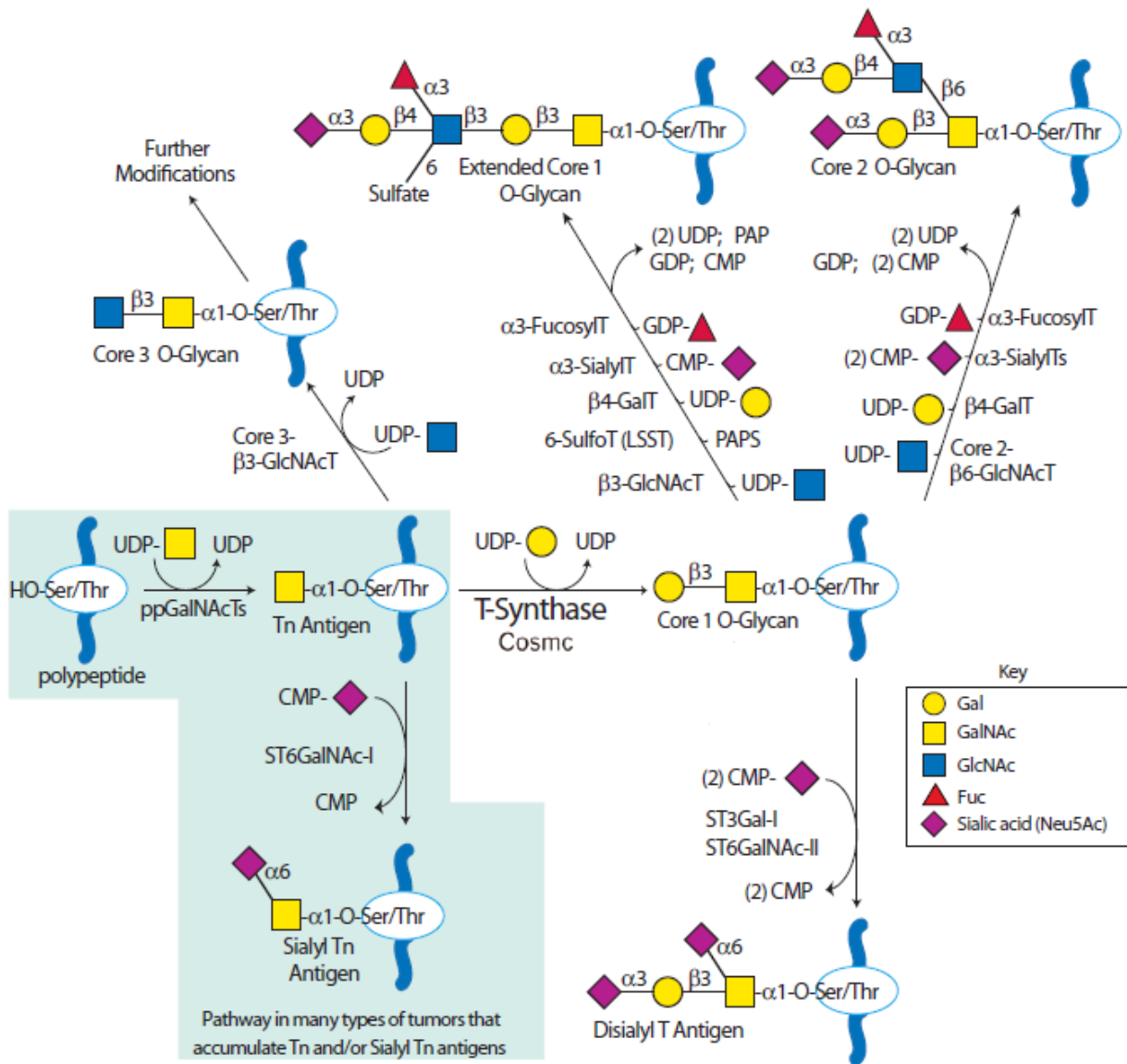


Figura 12 Rutas biosintéticas de O-glicanos. Adaptado de (Ju et al. 2014)

Se ha descrito que esta modificación está involucrada en procesos celulares como la secreción, la regulación de la actividad enzimática, estabilidad y solubilidad de proteínas secretadas, resistencia a proteasas y la funcionalidad de proteínas del sistema inmune (ej, selectinas) (Jensen et al. 2010; Variki et al. 2009). Adicionalmente, los carbohidratos participan en funciones de reconocimiento biológico, uniéndose a diferentes moléculas (como lectinas), interacciones célula-célula, célula matriz y en desarrollo (Freire et al. 2002; Variki et al. 2009).

Hay dos tipos principales de unión de los oligosacáridos a las proteínas en mamíferos denominadas glicosilación de tipo-N y tipo-O. En las N-glicoproteínas los carbohidratos principalmente N-acetilglucosamina (GlcNAc) interaccionan con el Nitrógeno amídico de residuos de Asparagina mediante un enlace N-glicosídico en una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Dall'Olio et al. 2012; Variki et al. 2009).

A diferencia de la N-glicosilación hay varios tipos de O-glicosilación y este proceso puede ocurrir tanto en el Golgi como en el citoplasma y núcleo. Las O-glicoproteínas presentan oligosacáridos unidos al grupo hidroxilo de Serinas o Treoninas sin presentar un patrón que permita su predicción, salvo la cercanía a aminoácidos de Prolina (Blom et al. 2004). Las modificaciones que ocurren en el Golgi comienzan por la formación de un enlace O-glicosídico entre un azúcar reductor terminal como N-acetilgalactosamina (GalNac), N-acetilglucosamina (GlcNac), manosa, fucosa, glucosa, galactosa o xilosa a Ser/Thr (Variki et al. 2009). El más común de éstos es el primero denominado también enlace de tipo mucina y debe su nombre a que está presente en las glicoproteínas de superficie de alto peso molecular (Jensen et al. 2010; Freire et al. 2002).

Las proteínas que son O-glicosiladas en citoplasma y núcleo por su parte, presentan un único residuo de N-acetilglucosamina (O-GlcNac), su adición es diferente a la descrita anteriormente y no es elongado, sino que es una modificación dinámica de señalización análoga a la fosforilación (Hart & Copeland 2010).

Puede considerarse que las cadenas oligosacáridicas están constituidas por tres sectores principales, la región central o core, región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena peptídica, el esqueleto o backbone que determina la longitud de la cadena carbohidrata y la región periférica donde se encuentran los antígenos de grupo sanguíneo u otros antígenos carbohidratos (Freire et al. 2002). Mientras que todas las N-glicoproteínas presentan el mismo tipo de core (Glc₃Man₉GlcNAc₂) debido a que su síntesis es en bloque, en las O-glicoproteínas existen 8 cores distintos a partir de los cuales se elonga la cadena oligosacáridica (Variki et al. 2009) la que se detalla en la figura 12. Los denominados antígenos de O-glicosilación simple corresponden a algunas de las estructuras del core y serán descritas en detalle más adelante.

Antígenos de O-glicosilación incompleta y cáncer.

Alteraciones en las estructuras de O-glicosilación de tipo mucina tienen varias consecuencias biológicas y patológicas dado el cambio de ligandos de interacción entre células tumorales y su microambiente. Estas modificaciones influyen el crecimiento y supervivencia de las células, su habilidad de invadir tejido y hacer metástasis, las interacciones con lectinas y receptores de superficie celular del sistema inmune. Las mucinas interactúan con moléculas de adhesión celular y pueden bloquear la adhesión célula a célula mediada por integrinas y E-cadherina (Brockhausen 2006).

Los O-glicanos encontrados en tumores incluyen a antígenos oncofetales, que son expresados normalmente durante el desarrollo embrionario pero no se encuentran en el adulto sano; neoantígenos los cuales no son expresados ni durante el desarrollo ni en tejido normal y por último

proteínas de tejido normal que son sobre-expresados durante el proceso tumoral. Dentro de las estructuras asociadas a tumor se encuentran los antígenos de O-glicosilación incompleta Tn, sialil-Tn y T así como otros glicanos del grupo ABO (H) y los antígenos sialil Lewis (Kudelka et al. 2015). Se ha observado que los O-glicanos están alterados desde etapas tempranas de la transformación maligna y algunos estudios han demostrado que son alteraciones importantes para el comienzo de la tumorigénesis. Adicionalmente se ha correlacionado los antígenos de O-glicosilación con la invasión y metástasis (An et al. 2007).

La expresión de los antígenos Tn, sTn y T han sido correlacionados con la progresión tumoral y conforman marcadores importantes para diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la respuesta tumoral. A modo de ejemplo, los primeros test para identificar O-glicanos asociados a tumor se efectuaron por inmunohistoquímica y detección a nivel sérico utilizando anticuerpos o lectinas contra Tn, STn, SLe^x (Kudelka et al. 2015).

La mayoría de los ensayos serológicos utilizados para la detección de cáncer están basados en la cuantificación de glicoconjugados en suero de pacientes. Estos ensayos pueden detectar antígenos carbohidratos como SLe^x (CA19-9), STn (CA72-4) o mucinas glicosiladas de forma aberrante como MUC1 (CA15-3) y MUC16 (CA125) (Reis et al. 2010).

Si bien el uso a nivel diagnóstico es limitado dado que éstos son expresados por una variedad de tipos de cáncer y que pueden ser generados por procesos no neoplásicos como la inflamación, estos marcadores han mostrado ser particularmente útiles para evaluación de prognosis y monitoreo de pacientes. Adicionalmente, la observación de que pacientes de cáncer son capaces de producir autoanticuerpos contra motivos de O-glicosilación incompleta, llevó a la evaluación de los mismos como biomarcadores para la detección temprana de cáncer (Wandall et al. 2010).

Antígeno Tn y cáncer

El antígeno Tn fue identificado por primera vez en 1959 en glóbulos rojos de un paciente con una rara enfermedad de anemia hemolítica aguda y poliaglutinabilidad, la que luego demostró estar causada por anticuerpos anti-Tn en suero (Dausset et al. 1959). Se denominó Tn o T "nouvelle" en referencia al antígeno T, descubierto previamente como un síndrome de poliaglutinabilidad similar. Dahr y colaboradores describieron a Tn como GalNAc-Ser/Thr mientras que Springer y col. Identificaron la relación biosintética entre Tn y T (Dahr et al. 1974; Springer 1984).

A nivel histológico, Tn es altamente expresado en más del 90% de los carcinomas de mama (Langkilde et al. 1992; Springer 1984), páncreas (Osako et al. 1993) y pulmón (Laack et al. 2002), más del 60% de carcinomas de colon (Cao et al. 1995; Itzkowitz et al. 1992), estómago y vejiga (Langkilde et al. 1992), entre 45 y 80% de carcinomas cervicales (Hirao et al. 1993; Hamada et al. 1993), y menos del 1 % de melanomas primarios, siendo poco común en cáncer hematológico (Kudelka et al. 2015; Ju et al. 2014) Si bien es un precursor biosintético normal pero no un producto

terminal, puede ser observado ocasionalmente en la maquinaria secretoria no así en la superficie o en proteínas secretadas de células normales (Kudelka et al. 2015). De hecho, es raramente encontrado en tejido normal (Cao et al. 1995; Osako et al. 1993; Langkilde et al. 1992).

Se ha observado la expresión de este marcador en el desarrollo temprano del cáncer y sus niveles se correlacionan con la progresión tumoral (Cao et al. 1995; Kudelka et al. 2015). En modelos de cáncer de mama y colorectal inducido químicamente se observó la expresión de Tn en lesiones pre-malignas (Babino et al., 2000; Berriel et al., 2005). De hecho, la relación entre la expresión de los antígenos Tn y T decrece durante la progresión tumoral, siendo Tn un indicador de la malignidad más preciso que la expresión del antígeno T (Desai 2000). Adicionalmente, comparando los tumores Tn positivos y negativos, la expresión de este antígeno se correlaciona con una peor sobrevida en carcinoma (Konno et al. 2002).

Si bien el antígeno Tn está altamente expresado en carcinomas en forma temprana en la tumorigénesis y se correlaciona con la progresión de la enfermedad y sobrevida, el mecanismo mediante el cual es sobre expresado en células tumorales no es claro. Varios mecanismos han sido propuestos dentro de los que se incluyen alteraciones genéticas y/o transcripcionales en las proteínas requeridas para la extensión de la glicosilación las que comprenden alteraciones en las enzimas que sintetizan el antígeno Tn, cambios en la expresión de los azúcares nucleotídicos o sus transportadores, modificaciones en el transporte vesicular, retención y modificaciones en la estructura del Golgi/ER así como alteraciones en la oligomerización de las glicosiltransferasas (Ju et al. 2014).

Tn puede ser extendido por la C₁ GalT sintasa para formar el core 1 o por C₃GnT para formar la estructura del core 3 a nivel intestinal. Estudios sobre líneas celulares de colon mostraron una pérdida de función de C₃GnT respecto a tejido normal (Vavasseur et al. 1995). En la vía de formación del core 1, el antígeno Tn es extendido por la sintetasa T, esta enzima a su vez depende para su función de la chaperona CosmC. Defectos en dicha chaperona pueden generar la pérdida de función de la sintetasa T, lo que se ha observado en líneas tumorales y muestras de cáncer cervical (Ju et al. 2008). De hecho uno de los mecanismos descrito es el silenciamiento epigenético de esta chaperona, observado en una serie de muestras de adenocarcinoma pancreático correlacionando así la expresión de Tn con la pérdida de la T sintasa dependiente de CosmC (Radhakrishnan et al. 2014).

Mecanismos que podrían estar implicados en el aumento de la expresión del antígeno Tn en tejido maligno comprende la alteración del Golgi o de la localización de las glicosiltransferasas. Normalmente, las GalNac-Ts se encuentran localizadas en el aparato de Golgi siendo Tn solamente detectado en la porción cis. Se ha reportado que la activación de quinasas promotoras de la invasividad como EGFR, PDGF-R y Src inducen transporte de las GalNacs-Ts desde el Golgi al retículo endoplásmico. Esta relocalización aumenta marcadamente la expresión de Tn siendo un

fenómeno común en tumores malignos de mama. Asimismo, esta traslocación de GalNAcs promueve adhesión celular, movilidad, invasividad y acumulación del antígeno Tn en proteínas de las superficie celular (Gill et al. 2010; Gill et al. 2013).

De forma análoga, también en colon, la presencia del antígeno Tn en MUC1, puede interactuar con la lectina de tipo galactosa de macrófagos MGL, presente tanto en macrófagos como en células dendríticas inmaduras y tolerogénicas. Se presume que la unión del antígeno Tn podría inducir efectos inmunosupresores permitiendo el inmunoescape de células tumorales (Saeland et al. 2007).

Varios anticuerpos monoclonales han sido generados o identificados que reconocen el antígeno Tn con posibles fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Pueden destacarse los anticuerpos NCC-LU-35 Y 31 (Hirohashi et al. 1985), el IgG3 CU-1 (Takahashi et al. 1988), MLS128 IgG3 (Numata et al. 1990), Ca 3250-3268 (Avichezer et al. 1997), KM3413 IgG1 quimérico (Ando et al. 2008) o 2154F12A4 (Danussi et al. 2009) así como el anticuerpo IgM murino 83D4 y su versión quimérica Chi-Tn (Osinaga, Pancino, Porchet, et al. 1992; Oppezzo et al. 2000) los que serán descritos en detalle en el próximo apartado.

Particularmente, cabe destacar el trabajo efectuado con el anticuerpo MLS128 generado a partir de inmunizaciones con células de cáncer de colon LS180 (Numata et al. 1990), el cual reconoce el antígeno Tn en un motivo de dos y tres Tn consecutivos dependiente de temperatura (Matsumoto-Takasaki et al. 2012; Osinaga et al. 2000). Este anticuerpo mostró además inhibir el crecimiento de células tumorales de colon (LS180 y HT29) y mama (MCF-7), posiblemente mediante interacción con la glicoproteína GP y el receptor del factor de crecimiento a insulina I (Zamri et al. 2012; Zamri et al. 2013; Morita et al. 2009). Estudios con fines diagnósticos de imagenología se efectuaron con este anticuerpo mediante marcado directo con ^{111}In y ^{125}I / ^{131}I así como marcado utilizando el método de ligación biotina/estreptavidina con ^{125}I e ^{111}In en modelos de xenotransplante de ratones con LS180 por SPECT (Yao et al. 1995; Zhang et al. 1998; Nakamoto et al. 1998). Con este anticuerpo se generaron de forma recombinante un scFv en *E. coli* para estudios estructurales así como un Fv-scFv en células de mamífero CHO con fines terapéuticos (Subedi et al. 2012; Yuasa et al. 2012).

Antecedentes

El estudio del antígeno tumoral Tn en nuestro grupo de trabajo comienza con el desarrollo y caracterización del anticuerpo monoclonal IgM 83D4. El mismo fue producido a partir de la inmunización de ratones con suspensiones celulares obtenidas de secciones de tejido de carcinoma de mama fijados en formol e incluidos en bloques de parafina con el fin de generar marcadores útiles en inmunopatología (Pancino et al. 1990a). El mismo mostró reactividad con tejido mamario tumoral pero no con tejido normal, siendo luego identificado el epítipo como una glicoproteína de alto peso molecular heterogénea, que corresponde al antígeno Tn (Pancino, et al. 1990; Osinaga et al. 1994 Osinaga et al. 1992). El anticuerpo 83D4 es un excelente marcador de malignidad en estudios inmunocitoquímicos en líquido pleural y de ascitis, ya que identifica a las células de carcinoma sin ser reactivo con las mesoteliales (Charpin et al. 1992; Beuselin-Yvraut et al. 1995). Mediante el estudio de reconocimiento de 83D4 con diferentes glicopéptidos por BiaCore, se evidenció que el reconocimiento por el antígeno es diferencial, no reconoce glicopéptidos mono-Tn mientras que es muy reactivo con glicopéptidos con clusters de dos o tres residuos Tn consecutivos (Osinaga et al. 2000). Particularmente las constantes de asociación de los motivos tri Tn en conformación Serina-Treonina-Treonina (S-T-T $K_D = 1,0 \times 10^{-9} M$) así como tres Treoninas consecutivas (T-T-T $D_K = 9,9 \times 10^{-9} M$) o Tn en tres Serinas consecutivas (S-S-S $K_D = 2,0 \times 10^{-9} M$) fueron determinadas (Mazal et al. 2013).

Utilizando el anticuerpo 83D4 y la lectina de las semillas del trigo (WGA) se desarrolló un método de tipo radio-inmuno-lectino-ensayo (SRIA WGA/83D4), de alta especificidad para el diagnóstico de los derrames serosos asociados con cáncer de mama y de ovario (Osinaga, Pancino, Beuselin-Yvraut, et al. 1992). Sin embargo, la sensibilidad de este test no permite la detección del antígeno presente en el suero sanguíneo. Posteriormente, utilizando al anticuerpo 83D4 asociado a la isolectina B4 de la *Vicia villosa* (VVLB4) biotinilada, se desarrolló el primer método (test CA83.4) que permite detectar y cuantificar las glicoproteínas Tn presentes en el suero de pacientes con carcinomas de mama, ovario y digestivos (Osinaga et al. 1996). Por otra parte, en inmunocitología el anticuerpo 83D4 permite la identificación específica de células de carcinomas en derrames pleurales y líquido de ascitis, debido a que no es reactivo con las células mesoteliales ni con las células sanguíneas (Beuselin-Yvraut et al. 1995).

A nivel básico, utilizando el anticuerpo 83D4 se demostró que el antígeno de O-glicosilación incompleta Tn se expresa no sólo en MUC1, principal mucina mamaria, sino también en tres apomucinas "no mamarias" (MUC2, MUC5AC y MUC6) (Freire et al. 2003).

A partir de la secuencia de 83D4, se desarrollaron por ingeniería genética diferentes variantes del mismo conservando la región de reconocimiento para estudios in vivo. En primer lugar se generó un scFv 83D4, que corresponde al sector variable del anticuerpo monoclonal murino, mediante

expresión a nivel periplásmico como proteína de fusión a MBP, el cual mostró ser reactivo con el antígeno Tn en ensayos de ELISA (Babino et al. 1997).

Adicionalmente, se generaron dos anticuerpos quiméricos IgM y otro IgG₁ los cuales mostraron un perfil de reconocimiento funcional similar al anticuerpo parental. Ensayos de Bia Core mostraron para IgM 83D4 una constante de afinidad $K_D = 4,2 \times 10^{-9}$ M y $K_D = 4,8 \times 10^{-9}$ M sobre glicopéptidos de dos y tres Tn respectivamente, mientras que la IgG₁ mostró una $K_D = 2,2 \times 10^{-8}$ M y $2,1 \times 10^{-8}$ M sobre los mismos glicopéptidos (Opezzo et al. 2000). En este trabajo utilizaremos el anticuerpo quimérico IgG₁ denominado Chi-Tn como se describe en materiales y métodos. Para este anticuerpo se han depositado 3 solicitudes de patente a nivel europeo (EP 2014302 A1 enero de 2009), a nivel internacional (WO 2009/007222 A1 enero de 2009) y en Estados Unidos, (US2010/0278818 A1 noviembre de 2010).

Ensayos in vivo donde se evaluó el uso de Chi-Tn a nivel terapéutico mostraron un efecto antitumoral del mismo en un modelo murino de ratones Balb/c utilizando la línea tumoral de mama TA₃/Ha. Luego de implantar el tumor en la cavidad peritoneal, los ratones fueron tratados con una combinación del anticuerpo quimérico 83D4 IgG₁ y de ciclofosfamida. Este tratamiento en combinación del anticuerpo y quimioterapia mostró rechazo tumoral y mejor supervivencia respecto a los tratados únicamente con anticuerpo o droga así como los controles sin tratar. El efecto terapéutico requiere asimismo receptores activadores para IgG (FcγRs) ya que en ratones que no expresan la cadena gamma asociada a FcγR, el efecto terapéutico desaparece. Se determinó que el mecanismo antitumoral observado puede explicarse por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Hubert et al. 2011).

Estudios adicionales mostraron que el anticuerpo Chi-Tn es internalizado por las células tumorales Tn positivas luego de la unión al antígeno. Mediante citometría de flujo y microscopía de deconvolución (utilizando células de linfoma humano Jurkat, dos líneas humanas de cáncer de ovario OvCar-3, Shin-3 y la línea murina mamaria TA₃/Ha), se comprobó que el anticuerpo Chi-Tn es internalizado dentro de endosomas tempranos. De hecho, la conjugación de Chi-Tn a dos drogas citotóxicas saporina y auristatin F mostró citotoxicidad sobre células Tn positivas (Jurkat, Ta₃Ha) no observable en células Tn negativas (SKBR3) (Heitzmann-Daverton 2013). Estos resultados sugieren fuertemente que este anticuerpo recombinante anti-Tn puede ser de utilidad para el desarrollo de tratamientos anti-tumorales basados en el direccionamiento de drogas o toxinas hacia el interior de células tumorales Tn positivas. Más aún, dado que en este tipo de modelos, la región Fc no estaría implicada en el mecanismo de acción, el uso de fragmentos de anticuerpos más pequeños que mantengan la afinidad por el antígeno genera una interesante opción para evaluar nuevas estrategias terapéuticas.

Por otra parte, ensayos preliminares en modelos tumorales de xenotransplante murinos con la línea tumoral de mama MCF7 utilizando el anticuerpo Chi-Tn radiomarcado en SPECT, mostró una alta especificidad por tejido tumoral respecto tejido normal. Sin embargo, dado que se trata de un anticuerpo entero, el radioisótopo utilizado y el tiempo de toma de imágenes post-inyección del marcador hacen que no sea el mejor modelo. De esta forma, se hace relevante la generación de moléculas de menor tamaño con cinética y biodistribución manteniendo la especificidad observada con el anticuerpo quimérico Chi-Tn.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la generación por ingeniería genética de fragmentos de anticuerpos a partir del anticuerpo 83D4 que mantengan la afinidad por el antígeno Tn y por tanto la capacidad de reconocimiento de células tumorales respecto a tejido normal; estas moléculas podrían ser útiles para estrategias de diagnóstico en el área de imagenología, tras su radiomarcado.

Objetivos

Objetivos generales

El presente proyecto buscar generar nuevas herramientas con potencial aplicación en diagnóstico en imagenología molecular del cáncer como en inmunoterapia anti-tumoral teniendo como blanco el antígeno tumoral Tn. Combinando las características descritas para el anticuerpo anti Tn 83D4 y las propiedades de fragmentos de anticuerpos como los Diabodies, el objetivo general del presente trabajo se propone el diseño, producción y caracterización de Diabodies contra el antígeno tumoral Tn.

Objetivos Específicos

- Diseño de un Diabody anti-Tn recombinante a partir de la secuencia del anticuerpo monoclonal 83D4.
- Análisis de distintos sistemas de expresión recombinante (procariota/eucariota) para obtener el mejor rendimiento de producción proteica.
- Purificación y caracterización de las proteínas generadas.
- Evaluación funcional de las proteínas en su reconocimiento por el antígeno Tn, sobre diferentes modelos glicopeptídicos y células enteras in vitro.

Materiales y Métodos

Antígeno Tn

Se utilizó como fuente de antígeno Tn la proteína mucina submaxilar ovina (OSM), la cual fue purificada de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Tettamanti & Pigman 1968). La versión asialilada de OSM que contiene predominantemente el antígeno Tn expuesto fue preparada por tratamiento con 0.01 N de HCl a 80°C durante 1 hora luego de la cual se neutralizó el pH con NaOH 10 N y la fracción insoluble fue separada mediante centrifugación 5 minutos a 14000g. La concentración proteica se cuantificó por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA).

Se utilizó adicionalmente como fuente de antígeno Tn, un glicopéptido biotinilado tri-Tn S*T*T*G6K(biot)G y el péptido S-T-T- G6K(biot)G sin glicosilar, ambos facilitados por la Dra. Sylvie Bay (Institut Pasteur de Paris).

Secuencias

Los genes de Diabodies anti-Tn se generaron a partir de las secuencias del anticuerpo monoclonal murino 83D4 la cual se encuentra disponible en la base de datos PubMed. La secuencia de la región variable de la cadena pesada VH (GenBank: AF201962.1) y la secuencia de la región variable de la cadena liviana Vk (GenBank: AF201961.1) se detallan en la figura 13 (Oppezco et al. 2000).

Se utilizaron asimismo las secuencias del epítotope c-myc para la identificación de las construcciones in vitro, la secuencia de clivaje proteolítico TEV y la secuencia His6 para la purificación de las construcciones obtenidas también a partir de la base de datos GenBank, dichas secuencias se muestran en la figura 14.

Una vez diseñados, los genes de las construcciones estos fueron generados de forma sintética por la empresa GeneScript. Para potenciar la expresión en los sistemas seleccionados se efectuó una optimización de codones facilitando de esta forma la expresión proteica mediante la sustitución de codones pocos frecuentes en dichos sistemas por otros más adecuados. El análisis se realizó con el algoritmo OptimumGene™ de GeneScript el cual analiza el uso de codones, el contenido GC, el contenido de dinucleótidos CpG, la estructura secundaria de ARNm, sitios de splicing, motivos de inestabilidad de ARN (ARE), sitios de restricción, secuencias repetidas, entre otros.

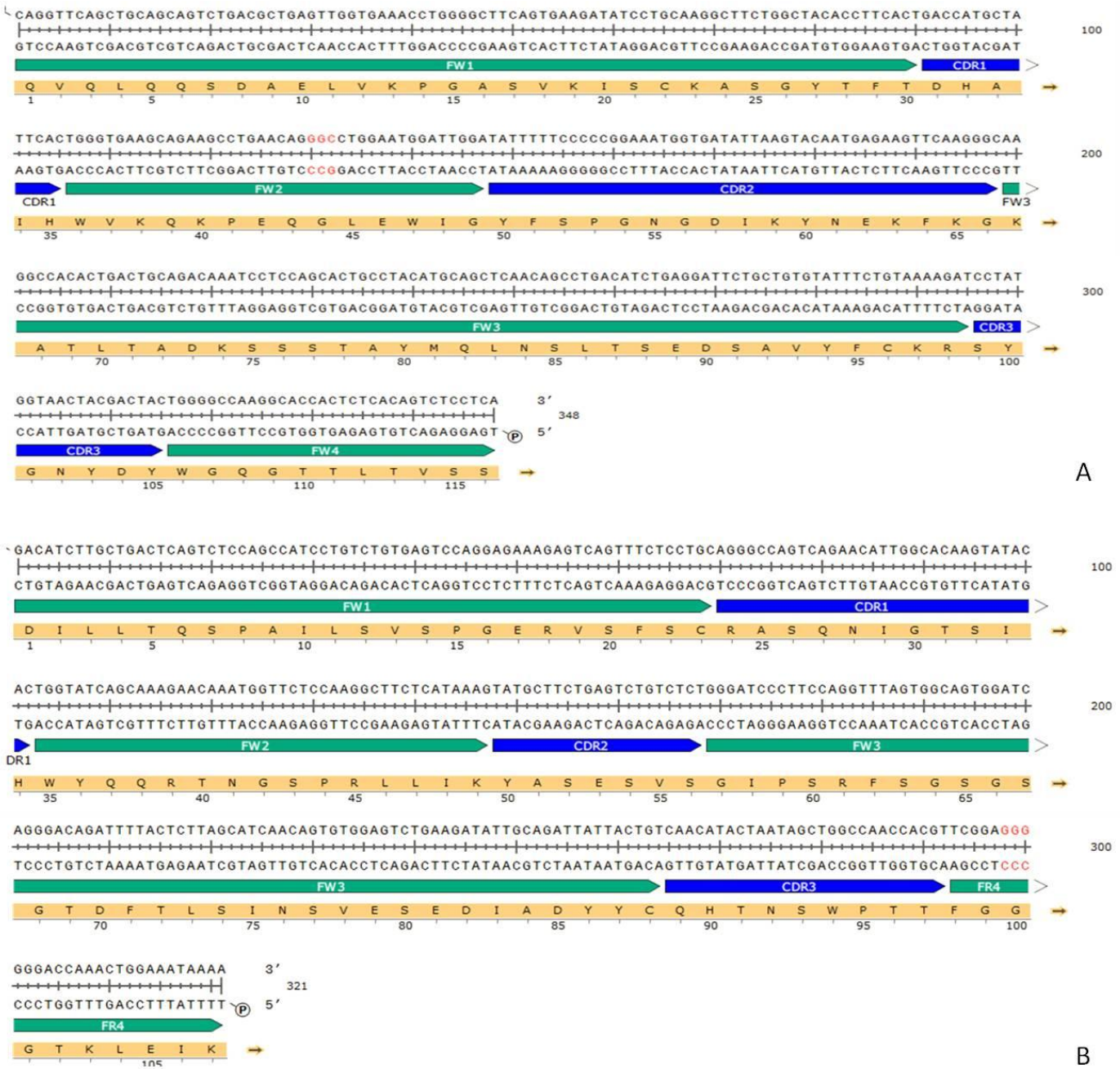


Figura 13. Secuencia de las regiones variables de la cadena pesada VH (A) y liviana Vκ (B) de 83D4. Se muestra la secuencia nucleotídica y la correspondiente secuencia peptídica. CDR región complementaria de reconocimiento, FR regiones Framework. En rojo se muestra codón modificado para incluir enlaces disulfuro intercatenario.

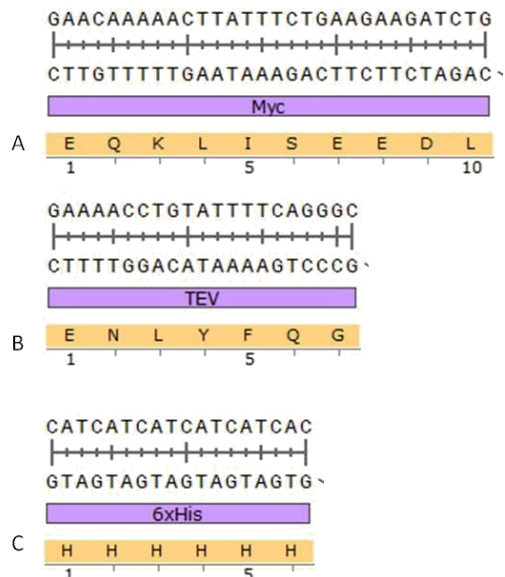


Figura 14 Secuencias nucleotídicas y peptídicas de **A. c-Myc B. TEV y C His tag** utilizadas para la identificación y purificación de las construcciones.

Anticuerpos

Anticuerpo Monoclonal 83D4

El anticuerpo monoclonal 83D4 (IgM) se cultivó a partir de un clon del hibridoma correspondiente en DMEM, 2mM de L-glutamina y 1mM de piruvato de sodio en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂ (Pancino, et al. 1990). El sobrenadante de cultivo conteniendo dicho anticuerpo fue utilizado como control positivo en los ensayos de caracterización funcional del DbTn.

Anticuerpo Monoclonal Chi-Tn

La producción del anticuerpo Chi-Tn se realizó a partir de un sub-clon productor del anticuerpo quimérico de la línea X-63 el que se cultivó en medio RPMI conteniendo 10% de Suero Fetal Bovino en un sistema Bello Cell (Chem-Glass Biosciences) en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo. Este sistema consiste en un biorreactor que permite la generación de cultivos de alta densidad a través de matrices porosas donde las células se adhieren y crecen, y un flujo constante que alterna el medio de cultivo con períodos de aireación.

Sobrenadante de cultivo obtenido mediante este sistema fue centrifugado a 3000g durante 15 min., filtrado 0,22µm, y diluidos en buffer fosfato 50 mM pH 7.4. Los anticuerpos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de proteína A (HiTrap Protein A HP GE Healthcare) equilibradas con buffer fosfato 25 mM pH 7,4. Luego de cargar el sobrenadante de cultivo en la columna durante toda la noche a 1ml/min, se conectó a un equipo AKTA Purifier o AKTA Pure (GE Healthcare Lifesciences) y se lavó con buffer fosfato 25 mM pH 7.4 hasta que la DO a 280 nm fuera basal. Se realizó un primer paso de elución correspondiente a las inmunoglobulinas provenientes del suero fetal bovino mediante un step de 3 volúmenes de columna (VC) de buffer citrato 0,1M pH 4,5 y a continuación la elución del anticuerpo Chi-Tn

mediante un step de 3VC de Buffer Citrato 0,1 M pH 3. Las muestras se colectaron en alícuotas conteniendo Na_2HPO_4 1M para neutralizar el pH. Las fracciones fueron agrupadas y dializadas contra buffer PBS durante toda la noche. La pureza e identidad de las inmunoglobulinas se evaluó por gel filtración en columnas Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) y por SDS-PAGE. Este anticuerpo se utilizó como control en la caracterización de los diabodies producidos.

Líneas celulares tumorales

Las líneas celulares de origen humano MCF7 (adenocarcinoma mamario), fueron adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC) y fueron cultivadas en DMEM suplementados con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), 2mM de L-glutamina y 1mM de piruvato de sodio en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO_2 .

Sistemas de expresión proteica procariota

Vectores

- pUC57Amp^R

Todas las construcciones para la expresión en *E. coli* fueron clonadas por el fabricante en el plásmido pUC57-Amp^R en el sitio de restricción EcoRV, conformando así los vectores pUC57-Amp^RDbTn y pUC57-Amp^RTnT y pUC57-Amp^RPE38. Las secuencias fueron confirmadas por secuenciado utilizando los primers M13pUC fow y M13Puc Rev.

- pET28a

El vector elegido para la expresión a nivel citoplasmático de diabodies fue el **pET28a** (Novagen) Este vector presenta resistencia a Kanamicina para su selección y el promotor T7 para la inducción de la secuencia. Las construcciones fueron clonadas en los sitios EcoRI-XhoI para DbTn. El clonado fue efectuado también por GeneScript y las inserciones fueron confirmadas por secuenciación utilizando los primers T7 y T7ter.

- pLysPFH255 y pLysPMJS9

Los plásmido pLysPFH255 y pLysPMJS9 construidos a partir del vector pLysS con resistencia a Cloranfenicol tienen clonados de forma policistrónica las enzimas Erv1P y PDI o Erv1P y DsbC respectivamente bajo control del promotor inducible por arabinosa pBAD (Nguyen et al. 2011). Erv1P es una sulfhidril oxidasa de *S. cerevisiae* que se encarga de la catálisis de novo de enlaces disulfuro, mientras que DsbC es una isomerasa procariota y PDI una isomerasa eucariota adaptada a *E. coli*. De esta forma, la pre-expresión de estas enzimas proporcionan una herramienta para la síntesis de proteínas con enlaces disulfuro citoplasmáticas.

- pMALp2E

La expresión a nivel de periplasma se evaluó con el plásmido pMALp2E (New England Biolabs) tras subclonado de la construcción de DbTn. En este plásmido la secuencia a expresar queda inserta “downstream” del gen *malE* de *E. coli*, que codifica para la proteína de unión a maltosa MBP, produciendo una proteína de fusión. Adicionalmente, este plásmido contiene una secuencia de direccionamiento al periplasma así como un sitio para la enzima enteroquinasa para clivar la proteína de fusión. La construcción DbTn fue subclonada entre los sitios EcoRI y BamHI a partir del plásmidos pUC57-DbTn como se detallara en el apartado correspondiente.

Reconstitución de pET28a-DbTn y pET28a-TnT

El vial conteniendo el plásmido liofilizado (4µg) fue reconstituido agregando 20µL de agua estéril e incubando a 50°C durante 15 minutos. Un microlitro de ADN (200ng/µL) fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* XL1-Blue electrocompetentes con un pulso de 500V y 8 ms. Luego de la electroporación las bacterias fueron incubadas durante 1 hora en medio LB a 37°C y 220 rpm y plaqueadas en medio LB Agar conteniendo Kanamicina 50 µg/ml.

Amplificación y purificación de plásmidos

El ADN plasmídico se amplificó mediante cultivo de colonias aisladas en medio LB conteniendo el antibiótico de selección adecuado (Kanamicina 30µg/ml para pET28a, Cloranfenicol 34µg/ml para pLys o Ampicilina 100 µg/ml para pUC57 y pMALp2E) e incubación a 37°C a 220 rpm durante toda la noche. Los plásmidos fueron purificados con kit de mini prep QIAGEN. Brevemente, luego de centrifugar el medio de cultivo 1 minuto a 14000g, el pellet celular fue resuspendido en Buffer Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, ARNasa 100 µg/ml. Se agregó buffer de Lisis alcalino NaOH 200 mM, SDS 1% y posteriormente el ADN genómico fue precipitado mediante el agregado de Buffer Acetato de potasio 3 M pH 5,5. Se centrifugó durante 10 minutos a 14000g y el sobrenadante fue cargado en columnas de sílica las que fueron centrifugadas durante 1 minuto a 14000g. Luego de lavados con buffer NaCl 1 M, MOPS 50mM pH 7 15% Isopropanol, se eluyó el ADN con 30 µL de agua destilada. Los plásmidos se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Digestión enzimática

La confirmación de clonado o identidad de los diferentes vectores de expresión se efectuó mediante corte con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa. Para ello, se realizó un mix conteniendo entre 5 y 10 U de las enzimas de restricción en el buffer proporcionado por el fabricante (Sigma, NEB o Invitrogen) según el caso en 20 o 50 µl de volumen final de reacción. Entre 5 y 10µl de muestras procedentes de la purificación de mini-preps se incubaron con

el mix durante tres horas a 37°C. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% y se visualizaron tras tinción con Bromuro de Etidio en transiluminador UV.

Microorganismos

- Electrocompetentes

Las cepas electrocompetentes fueron generadas a partir de pre-cultivo de colonias durante toda la noche en medio LB a 37°C y 220 rpm. Se generó un cultivo mediante dilución 1:100 del pre-cultivo y se incubó a 37°C a 220 rpm hasta que la DO a 600 nm fue entre 0,6 y 0,8. Se centrifugó el medio de cultivo a 5000 g durante 15 minutos a 4°C y el pellet obtenido se resuspendió en igual volumen de agua mili-Q fría. Mediante centrifugaciones secuenciales, se redujo el volumen de resuspensión hasta 1:4 del volumen inicial, donde las células se resuspendieron en glicerol al 10%. Finalmente, alícuotas de células en glicerol al 10% fueron conservadas a -80°C hasta su utilización.

- XL1-Blue

La amplificación de los plásmidos utilizados en todos los casos se efectuó utilizando bacterias XL1-Blue electrocompetentes generadas según se detalló en el apartado anterior.

- BL21 (DE3)

La expresión proteica en procariotas se evaluó utilizando la cepa BL21 (DE3) la cual presenta la característica de ser deficiente en las proteasas Lon y OmpT, así como presentar el gen de la ARN polimerasa T7 bajo control del promotor lacUV5 integrado en el cromosoma. De esta forma, cuando se usa IPTG, se induce la expresión de proteínas recombinantes clonadas en vectores downstream a promotores de T7.

- BL21 (DE3) pLysPFH255 y Bl21 (DE3) pLysPMJS9

Bacterias BL21 (DE3) electrocompetentes fueron transformadas con el plásmido de expresión de chaperonas pLysPFH255 o pLysPMJS9. Se seleccionaron colonias resistentes a Cloranfenicol y con éstas se generaron células electrocompetentes para transformar con los distintos vectores de expresión. Estas cepas se utilizaron en la evaluación de la expresión de las construcciones a nivel citoplasmático.

- Shuffle (New England BioLabs)

Esta cepa comercial presenta mutaciones en tioredoxin reductasa (trxB) y glutatión reductasa (gor) y expresa la chaperona de enlaces disulfuro DsbC de forma constitutiva, siendo una cepa optimizada para la expresión de proteínas con enlaces disulfuro a nivel citoplasmático.

Evaluación de la expresión proteica citoplasmática

Colonias BL21 (DE3) pLysPFH255, BL21 (DE3) pLysPMJS9 o Shuffle conteniendo los vectores de expresión (pET28a DbTn, pET28a TnT) fueron cultivadas durante toda la noche a 37°C y 220 rpm en medio LB conteniendo Cloranfenicol 34 µg/ml y kanamicina 30 µg/ml. El día siguiente, el cultivo fue diluido 1/100 en medio 2YT (1.6% Triptona, 1% extracto de levadura, 0,5 % NaCl pH 7) o LB (Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L) con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37°C y en agitación hasta que la DO a 600 nm fue de 0.4. Primeramente se indujo la expresión de las chaperonas para la formación de enlaces disulfuro mediante agregado de Arabinosa 0.5% w/v e incubación en agitación a 30°C. Luego de 30 minutos se indujo la expresión de las construcciones mediante adición al medio de cultivo de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM o 0,1 mM y el cultivo se mantuvo tanto a 30°C durante 4 horas o durante toda la noche a 20°C para favorecer la solubilidad de las proteínas generadas.

Luego de la inducción, se recuperaron las bacterias por centrifugación del medio durante 20 minutos a 4000 rpm y el pellet seco fue pesado y resuspendido en buffer Tris-HCl 50 mM NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM pH 8 conteniendo inhibidor de proteasas (Roche), DNAasa I (1µg/ml) (Sigma), lisozima 1 mg/ml y se congeló a -80°C hasta su utilización. Luego de descongelado el lisado fue sonificado con macrotip (4 pulsos de 20 segundos, consistiendo cada pulso en 2 segundos a 35% de amplitud y 1 segundo de descanso en hielo). A continuación se centrifugó a 18000 g a 4°C durante 40 minutos de forma de separar la fracción soluble de la insoluble. Las proteínas obtenidas en la fracción soluble correspondiente al sobrenadante de centrifugación fueron purificadas como se indica en el apartado correspondiente.

Expresión proteica en cuerpos de inclusión.

La expresión de proteínas en cuerpos de inclusión fue realizada en cepas BL21(DE3) conteniendo en este caso únicamente el plásmido de la construcción pET28a DbTn. Con el fin de favorecer la formación de proteína insoluble, el cultivo se realizó en medio 2YT y kanamicina 30µg/ml a partir de una dilución 1/100 de un pre-cultivo el cual se incubó a 220 rpm y 37 °C hasta una D.O. de 0,8. La expresión proteica se indujo con el agregado de IPTG 0.5mM y se mantuvo a 37°C y en agitación durante 4hs. La obtención de la fracción insoluble a partir de la fracción celular del cultivo se efectuó de forma análoga a la descrita anteriormente y se conservó el pellet obtenido luego de la lisis celular y ultracentrifugación. Los cuerpos de inclusión fueron lavados dos veces en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, Tritón 100 2%, β-Mercaptoetanol 1.5 mM, Urea 1.6 M pH 8 y dos veces en Buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M pH 8. Finalmente, las proteínas fueron resolubilizadas en buffer Tris-HCl 100 mM, Guanidinio-HCl 6 M pH 8. Para la completa reducción proteica se agregó DTT

5 mM y se incubó durante toda la noche en agitación a 4°C. Dicha fracción fue cuantificada y utilizada para las distintas estrategias de renaturalización proteica.

Renaturalización de proteínas expresadas en cuerpos de inclusión.

La renaturalización de proteínas a partir de los cuerpos de inclusión se evaluó mediante tres metodologías diferentes. Las proteínas desnaturalizadas en buffer Tris-HCl 100 mM, Guanidinio-HCl (Gdn-HCl) 6M pH 8 fueron purificadas por cromatografía de afinidad IMAC (como se detallará en el apartado correspondiente) y cuantificadas por absorbancia a 280 nm.

Renaturalización por dilución

En esta estrategia las proteínas desnaturalizadas se diluyen rápidamente en una solución de renaturalización conteniendo el par redox glutatión oxidado y reducido y L-arginina gota a gota y en agitación (Arakawa & Ejima 2014).

Se preparó buffer de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, EDTA 5 mM, L-Arginina 0.5 M, Glutatión oxidado (GSSG) 1 mM, Glutatión reducido (GSH) 5 mM e inhibidor de proteasas, pH 9.3) en cantidad suficiente para que la concentración final de proteína en solución luego de la dilución fuera de 100 µg/ml. Luego de realizada la dilución gota a gota y en agitación, se incubó durante toda la noche a 4°C. Las proteínas en buffer de renaturalización fueron dializadas durante toda la noche contra buffer Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM pH 7,4 utilizando membrana de diálisis de cutoff 14 kDa (Sigma). Las muestras se concentraron en centrífuga de cutoff 10 kDa (Millipore) y caracterizados como se detalla en el apartado correspondiente.

Renaturalización por diálisis sucesivas

En esta metodología las proteínas a renaturalizar se mantienen en una membrana de diálisis y el agente desnaturalizante se reduce mediante diálisis sucesivas desde la concentración inicial de 6M de Guanidinio-HCl a 0 M permitiendo la renaturalización de las proteínas en solución (Ortega et al. 2013). De esta forma se realizaron diálisis en buffer Tris-HCl 100 mM, L-Arginina 0.4M, DTT 5 mM y la concentración de Guanidinio-HCl se redujo en pasos sucesivos a 4M, 2M, 1 M 0.5 M hasta 0 M. Se incorporó Glutatión oxidado (GSSG) 0.75 mM y reducido (GSH) 7.5 mM a partir de 1 M de Guanidinio-HCl. Cada cambio de buffer se realizó durante toda la noche o durante todo el día. Posteriormente se realizó una diálisis para eliminar los componentes del buffer de renaturalización en Buffer Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM pH 7,4 y las proteínas solubles fueron purificadas y caracterizadas.

Renaturalización en columna

Finalmente se evaluó la renaturalización de las proteínas expresadas mediante inmovilización de las mismas en columna His-trap en buffer de desnaturalización (Tris-HCl 100 mM, Guanidinio-HCl 6M, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM pH 8). Luego se aplicó un gradiente de buffer de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, GSSG 1 mM, GSH 5 mM pH 8) hasta un 75% en 20 VC, el cual se mantuvo por 10 VC y finalmente en 10 VC se llegó a un 100% de solución de renaturalización. La elución de las proteínas se efectuó en buffer de elución (Tris-Hcl 100 mM, GSSG 1 mM, GSH 5 mM, L-Arginina 0.4 M, Imidazol 0.5 M, pH 8) con un step de 5 VC. Las fracciones obtenidas fueron luego dializadas contra buffer Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM pH 8 y caracterizadas.

Expresión proteica en periplasma.

Subclonado a vector pMALp2E

El plásmido pUC57-DbTn y el plásmido pMALp2E fueron digeridos con las enzimas EcoRI y HindIII para liberar el inserto correspondiente al gen de DbTn y generar los sitios de inserción en el plásmido receptor. Las digestiones se separaron por electroforesis en gel de agarosa y las bandas correspondientes fueron cortadas y purificadas utilizando el kit de extracción (Ilustra GFX GE Healthcare) según indicación del fabricante.

La ligación del fragmento DbTn al vector pMALp2 se efectuó utilizando la ligasa quick (NEB) en proporción 3:1 y 5:1 inserto:vector (50 ng) según indicación del fabricante. Brevemente el mix conteniendo ambos fragmentos en un volumen de 10 µl se incubó con 10µl de Buffer (66 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 7.5% Polietilen glicol pH 7,6) y 1 µg de ligasa durante 20 min. a temperatura ambiente. Los productos de ligación fueron purificados con kit de extracción de ADN (Kit Ilustra GFX GE Healthcare) para eliminar las sales del buffer de ligación. 2 µl de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes XL1-Blue como se detalló anteriormente. Se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina, se confirmó por digestión con las enzimas EcoRI y BamHI la presencia del inserto en el vector y éste fue utilizado para transformar bacterias BL21(DE3) competentes.

Expresión proteica y purificación de fracción periplásmica

Bacterias de la cepa BL21(DE3) conteniendo el plásmido pMALp2E-DbTn fueron cultivadas durante toda la noche en un pre-cultivo en medio LB conteniendo Ampicilina 100 µg/ml. El mismo fue diluído 1/100 al día siguiente en medio 2YT-glucosa 0.2%- Ampicilina y cultivado a 37°C y 220 rpm hasta que la DO alcanzó 0,6. La expresión proteica fue inducida por adición de IPTG 0.3 mM y el cultivo se mantuvo en agitación a 20°C durante toda la noche. Al día siguiente las células fueron recuperadas por centrifugación a 3000g durante 15 minutos a 4°C. La fracción proteica

correspondiente al periplasma fue purificada mediante shock osmótico, para el cual el pellet fue pesado y resuspendido en buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, 20% sucrosa, EDTA 1 mM e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. A continuación se centrifugó a 14000g a 4°C por 40 minutos. Se conservó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en la solución de shock fría (Buffer Tris-Hcl 10 mM pH 8, 0.5 mM MgCl₂) y se incubó en hielo por 10 minutos en agitación. Finalmente, se centrifugó por 25 minutos a 14000g a 4°C y se conservó el sobrenadante conteniendo la fracción periplasmática la cual fue dializada contra Binding Buffer (Tris-HCl 50 mM NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM pH 8) durante toda la noche para luego ser purificada por cromatografía de afinidad IMAC.

La remoción de la proteína de fusión se evaluó con la enzima enteroquinasa (Roche y Sigma-Aldrich). 25ug de proteína fue incubada en 50ul de buffer Tris-HCl 50mM pH8 con 0,6 ug de proteína(Roche) o 5ul correspondiente a 5U (Sigma-Aldrich) a 37°C Alícuotas de 5 ug fueron obtenidas a 1, 3 y 24hs. La digestión fue evaluada por SDS-PAGE y Western-Blot.

Cromatografía de Afinidad IMAC

Las proteínas expresadas en *E. Coli* fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) la cual se basa en la capacidad del aminoácido Histidina de formar complejos con metales quelados e inmovilizados a pH neutro.

Los sobrenadantes conteniendo las fracciones solubles de la expresión en citoplasma y los obtenidos por resolubilización en Binding Buffer (Tris-Hcl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH 8) fueron filtrados (0.22um) y cargados en columnas HisTrap (GE Healthcare) de 1 ml previamente equilibradas en Binding Buffer a un flujo de 1ml/min utilizando una bomba peristáltica P-1 (GE Healthcare). La columna se conectó posteriormente a un equipo AKTA Pure o Purifier (GE Healthcare) indistintamente con un límite de presión de 0.3 MPa y se lavó con binding buffer hasta que la absorbancia a 280 nm fuera despreciable. La elución se efectuó mediante un gradiente de 10VC con Buffer de Elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 500 mM pH 8). Se colectaron alícuotas de los picos observados por absorbancia a 280nm. Las fracciones correspondientes al sobrenadante crudo, fracción no unida (Flow-throw), lavados y eluato se conservaron y corrieron en geles de poliacrilamida al 12% para SDS-PAGE y tinción con Coomassie Blue o fueron utilizados para Western Blot.

Sistemas de expresión proteica Eucariota

Vectores

pUC57Kan^R

De forma análoga a la expresión en sistemas procariotas, los genes de DbTn y DbTnT fueron adquiridos de forma sintética a GenScript a los que se les optimizó los codones para la expresión en células de *Drosophila* S2. Las construcciones fueron clonadas en el vector pUC57-Kan^R en el sitio de restricción de EcoRV conformando así pUC57-Kan^RDbTn y pUC57-Kan^RTnT, la construcción se verificó por secuenciado utilizando los primers M13pUC fow y M13Puc Rev.

- **Vector de expresión pT350**

El vector de expresión pT350 fue facilitado por la Dra. Lorena Tomé, Laboratorio de Biofísica de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo. Este plásmido fue diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en células S2 a partir del plásmido pMT (Invitrogen). Está compuesto por un promotor de metalotioneína (pMT de *Drosophila*), el cual permite la inducción de la expresión proteica con el agregado de metales divalentes, contiene una señal de exportación BiP (péptido señal perteneciente a *D. melanogaster*) para la traslocación de la proteína recombinante hacia el RE e ingreso en la vía secretoria. Finalmente el plásmido pT350 contiene un sitio de clivaje por enteroquinasa (EK) seguido de un doble strep-tag que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad. El plásmido contiene las secuencias necesarias para su amplificación en bacterias, con resistencia a Ampicilina. El mismo fue amplificado, purificado y cuantificado para el posterior sub-clonado con las construcciones del Diabody de forma análoga a las descritas en los apartados anteriores.

- **pCoPuro**

Como vector de selección de clones transfectados se utilizó el vector pCoPuro (Invitrogen) que codifica para la resistencia al antibiótico Puromicina, y contiene además origen de replicación procariota para su amplificación y purificación, con resistencia a Ampicilina.

Reconstitución, amplificación y purificación de los plásmidos pUC57^{kan}DbTn y pUC57^{kan}DbTnT.

Los plásmidos liofilizados para la expresión eucariota fueron procesados de forma análoga a la descrita para la expresión procariota.

Sub clonado del gen DbTn y DbTnT al plásmido de expresión pT350

El subclonado de la secuencia optimizada de DbTn y TnT en el plásmido pT350 se realizó por RF cloning o clonado libre de enzimas de restricción. Esta metodología comprende dos rondas de amplificación por PCR; una para la síntesis de megaprimers en la cual se amplifica el gen de interés flanqueado con secuencias pertenecientes al sitio de clonado en el plásmido de expresión. En la segunda ronda se emplea el megaprimer purificado y como molde el plásmido de interés, el

producto de esta reacción es digerido con *DpnI* de forma de degradar el ADN parental y posteriormente este producto es utilizado para la transformación de bacterias competentes que circularizan y amplifican el plásmido (Unger, et al, 2010).

Para la síntesis de megaprimers se utilizaron 10 μL Phusion buffer GC 5x, 1 μL dNTPs (10 mM), 2 μL de cada uno de los primers detallados en la tabla 1 (10 μM), 1 μL Phusion DNA polymerase (NEB) (2 U/ μL), ADN molde (en este caso pUC-DbTn o pUC- DbTnT) 50 ng y H₂O hasta volumen final de 50 μL . El programa utilizado incluyó desnaturalización inicial a 98°C durante 5 min y luego 35 ciclos de: desnaturalización a 98°C durante 30s, hibridación a 60°C durante 1min y extensión a 72°C durante 30s. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 10min. Los megaprimers fueron purificados a partir de geles de agarosa 1% (Kit Illustra GFX GE Healthcare) y se midió la concentración de ADN obtenido en Nanodrop (Thermo). La segunda PCR se efectuó utilizando 10 μL Phusion buffer HF 5 x, 1 μL dNTPs (10 mM), 250 ng del megaprimer generado en la parte anterior, 1 μL Phusion DNA polymerase (2 U/ μL), 40ng del plásmido pT350 y H₂O hasta volumen final de 50 μL . El programa empleado para la segunda PCR consistió en desnaturalización inicial a 98°C durante 5 min y luego 30 ciclos de: desnaturalización a 98°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 1min y extensión a 72°C durante 4min (1min por Kb). Se realizó una extensión final a 72°C durante 10min. Posteriormente se realizó la digestión del ADN parental (molde) agregando 1 μL de *DpnI* (20 U/ μL) e incubando 1h a 37°C. Finalmente 2 μL de las muestras fueron empleados para transformar bacterias electrocompetentes como se indicó anteriormente.

Colonias resistentes a Ampicilina fueron cultivadas ON y los plásmidos purificados mediante Kit de mini-prep de Quiagen como se indicó anteriormente. Los plásmidos conteniendo insertos del tamaño esperado mediante digestión enzimática con BamHI fueron secuenciados utilizando los primers MT fow y BGH reverse (Tabla 1), verificando así la secuencia de los insertos y que los mismos estuvieran clonados en el mismo marco de lectura de la secuencia de exportación Bip así como con las secuencias para el sitio de corte con enteroquinasa y el doble strep tag.

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados para RF-Cloning de construcciones DbTn y DbTnT en el vector de expresión pT350 y posterior confirmación. Se detalla en azul secuencia complementaria a vector y en verde secuencia de hibridación a inserto. Los primers MT y BGH fueron utilizados en el secuenciado de confirmación del subclonado.

Primer	Secuencia
Fow Mega	GTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGCAGGTGCAGCTGCAGCAGGAG
Rev Mega	GATGACTCCAACCGGCCTTATCGTCATCGTCTTCGCCCTGAAAGTACAGGTTCTCCG
MT fow	CATCTCAGTGCAACTAAA
BGH Rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG

Líneas celulares

Células Schneider S2

El cultivo de las células S2 fue realizado en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo. Las células S2 fueron descongeladas en medio Schneider conteniendo penicilina-estreptomycin y suplementado con Suero Fetal Bovino inactivado al 10% (Gibco). Los cultivos fueron incubados en estufa a 25°C en ausencia de CO₂. Las células se subcultivaron cada vez que la densidad celular alcanzó 10-20x10⁶ células/mL y siempre se mantuvo el medio condicionado durante el pasaje celular en una dilución al medio.

Generación de una línea celular estable S2-DbTn

Co-transfección de células S2

Las células S2 fueron sembradas a una densidad de 5x10⁶ células por botella T25. Se prepararon 4 condiciones, dos para cada una de las construcciones y se incluyó un control transfectado únicamente con el plásmido de selección y una sin transfectar como control del antibiótico de selección. Las co-transfecciones se realizaron con 2 µg de cada una de las construcciones pT350-DbTn o pT350-TnT junto con el plásmido de selección pCoPuro en una relación 20:1 usando el kit comercial de transfección Effectene (Quiagen) según indicaciones del fabricante. Luego de 24hs de cultivo se removió completamente el medio de transfección y se agregó medio de cultivo Schneider nuevo suplementado con SFB 10% y medio condicionado de las S2 parentales. Luego de 72hs de la transfección se inició el proceso de selección mediante la adición de Puomicina (6 µg/mL) en las células transfectadas y controles. El cambio de medio se realizó cada 5 días y dos semanas luego de la transfección comenzó la amplificación de los clones positivos. En ese

momento también se inició la adaptación de las células S2 a medio de cultivo libre de proteína (Insect Xpress medium, Lonza). Para la propagación celular se comenzó con botellas T25 (2 semanas y media), luego botellas T75 (1 semana) y finalmente botellas T150. En las T150 las células se mantuvieron hasta el inicio de los cultivos de alta densidad para la posterior inducción y expresión proteica. Para la propagación de células con alta densidad se sembraron las células S2 transfectadas con medio Xpress nuevo con puromicina (6ug/mL) en frascos Erlenmayer de 250mL a 25°C y 100 rpm. (El protocolo utilizando fue cedido por la Dra. Lorena Tomé.)

Cinética de inducción.

Con el fin de determinar las condiciones de inducción y tiempo de expresión se realizó un ensayo de cinética de inducción, donde se evaluaron dos inductores y la producción proteica a distintos tiempos post-inducción. La inducción se evaluó con CuSO₄ (500 µM) y CdCl₂ (5 µM). Se sembraron 2,5x10⁵ células S2 transfectadas por pocillo de una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante toda la noche antes de la inducción. Luego del agregado de los inductores, se colectaron sobrenadantes de los pocillos 1, 2, 3, 5 y 7 días post inducción. Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y para cada pocillo se separó el pellet y el sobrenadante. Como control el ensayo se realizó con células S2 sin transfectar inducidas con CuSO₄ (500 µM) y CdCl₂ (5 µM) y células transfectadas sin inducir, que se mantuvieron hasta el día 7. La expresión proteica se evaluó por Western Blot de los sobrenadantes recolectados.

Expresión proteica

Para la producción a gran escala de la proteína DbTn, las células fueron cultivadas en frascos Erlenmayer de 250mL e inducidas con CdCl₂ 50µM con una densidad celular de 7-7,5x10⁶ células/mL, durante 5 días a 25°C y 110 rpm, luego del cual el sobrenadante fue recuperado mediante centrifugación por 20 minutos a 15000g y el sobrenadante fue mantenido con 10% glicerol a -20°C hasta la purificación.

Cromatografía de afinidad StrepTrap

Las proteínas expresadas en *Drosophila* fueron purificadas por cromatografía de afinidad empleando columnas StrepTrap™ HP (Streptactin superflow GE Healthcare) de 1mL. Se ajustó el pH del sobrenadante con Tris 1 M pH 8,5 se centrifugó durante 20 minutos a 15000g y filtró 0,22 µm. Se agregó un inhibidor de biotina (biotin blocking solution) a 147 mg/L y se cargó en la columna previamente equilibrada en Binding Buffer (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8) en bomba peristáltica. La columna se conectó a un equipo AKTA y se lavó con Binding buffer hasta una absorbancia despreciable a 280 nm. La elución se realizó en un paso único con 6 VC de

Binding Buffer conteniendo 2,5 mM destiobiotina. Luego de la elución la columna se regeneró con 3 VC de Agua, 3 VC de NaOH 0,5 M y luego se equilibró con Binding buffer. Las fracciones correspondientes al sobrenadante, fracción no unida, lavados y eluidos se recuperaron y se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y tinción con Coomassie.

En todas las purificaciones las condiciones fueron: flujo 1mL/min y presión límite columna 0,3 MPa.

Caracterización de las proteínas expresadas

SDS- PAGE y Western Blot.

Muestras obtenidas de los distintos pasos de expresión y purificación proteica fueron incubados en Buffer de carga (β -mercaptoetanol 25 %, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de bromofenol 0.1mg/ml) o alternativamente en buffer de carga no reductor (de igual composición sin el agregado de β -mercaptoetanol) a 99°C durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % y teñidos con Coomassie Blue durante toda la noche y desteñidos con solución de desteñido (etanol, ácido acético y agua en proporción 50:10:40).

Los geles utilizados para Western Blot fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, etanol 20 %) luego de la electroforesis durante 15 minutos y las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (GE Healthcare) mediante electrotransferencia semi-seca durante 1 hora a 20 V. La presencia de proteínas en la membrana se verificó mediante tinción con una solución de Rojo Ponceau. A continuación los sitios inespecíficos fueron bloqueados con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 3 % en PBS durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-His₆ (GE Healthcare) (dilución 1/3000) o anti c-myc (Invitrogen) (dilución 1/1000) en buffer PBS-Tween 20 0,1% BSA 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa (Dako dilución 1/1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. En todos los casos entre incubaciones se realizaron 3 lavados con buffer PBS-Tween 20 0,2%. El revelado se realizó con el reactivo quimioluminiscente ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) y exposición de films (Amersham Hyperfilm ECL GE) con la membrana en oscuridad durante 1 o 5 minutos tras lo cual fueron revelados utilizando un equipo Hyper processor (Amersham Biosciences).

Cromatografía de exclusión molecular

En todos los casos las proteínas purificadas fueron evaluadas en su estado de oligomerización mediante cromatografía de exclusión molecular a nivel analítico utilizando columnas Superdex

200 (10/300)(GE Healthcare) para la inmunotoxina así como el anticuerpo Chi-Tn y Superdex 75 (10/300) (GE Healthcare) para la evaluación de Diabodies, conectados a equipos AKTA. Las columnas fueron equilibradas con buffer Tris-HCl 50 mM NaCl 300 mM pH 8 o PBS Glicerol 10% a un flujo no mayor a 1ml/min y presión máxima 1,30 MPa recomendadas por el fabricante. 500 µl de muestra fueron inyectados y se siguió el volumen de retención mediante absorbancia a 280 nm. Los picos fueron luego comparados con los volúmenes de elución proteínas estándar para estimar el tamaño molecular o el grado de oligomerización que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Calibración de columnas Superdex 75 y 200 (10/300)

	KDa	Vol Retención (ml)	
		Superdex 75	Superdex 200
Blue Dextrane	7,67	7,67	
IgG	150	-	10,4
Albúmina bovina (BSA)	67	8,8	13,30
Ovalbúmina	44	9,5	14,48
Quimiotripsina	25	11,87	16,29
Ribonucleasa	13,7	12,94	17
Binder B10	9,3	13,6	-

Espectrometría de masa

La identidad de las proteínas generadas fue analizada por espectrometría de masa en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo. Proteínas provenientes de geles de poliacrilamida fueron escindidos del gel, digeridos con tripsina, purificados y analizados en un equipo MALDI/TOF/TOF. Los péptidos tripticos identificados fueron comparados con digestiones teóricas de la secuencia peptídica de las diferentes construcciones así como comparado con bases de datos públicas utilizando el software MASCOT.

ELISA

La funcionalidad de las proteínas generadas en su capacidad de reconocer al antígeno Tn fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) con aOSM 0.5µg por pocillo en buffer carbonato (NaHCO₃-Na₂CO₃ 0,05M pH 9,6), durante toda la noche a temperatura ambiente. Los sitios de union inespecificos se bloquearon con gelatina 1% en PBS por 2 horas a 37° C. A continuación, se adicionaron diluciones seriadas de las muestras a analizar en buffer PBS, Tween-20 0,1%, gelatina 0,5% y se incubaron por 2 horas a

37°C. Posteriormente se incubó con anticuerpo anti c-myc (Invitrogen) a una dilución 1/1000 a 37°C durante 1 hora. Finalmente, los pocillos fueron incubados con un anticuerpo anti-ratón ligado a peroxidasa (sigma) en una dilución 1/500 a 37°C durante una hora. En todos los casos posterior a cada incubación se realizaron tres lavados con buffer PBS Tween 0,1%. La actividad peroxidasa se evidenció con ABTS (2,2-azinobis(ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6-sulfónico)) y H₂O₂ 30% en Buffer Citrato Fosfato 0,1M pH 5,0. La reacción colorimétrica se desarrolló durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas.

En todos los casos, se utilizó como control positivo del ensayo el anticuerpo quimérico Chi-Tn, como controles de la especificidad, se utilizaron pocillos a los que no se les agregó c-myc o anti-His₆, y a los que se les agregó únicamente anticuerpo anti ratón-peroxidasa. Finalmente, para confirmar la interacción entre las proteínas expresadas y los anticuerpos anti-myc o anti-His₆, se sensibilizaron pocillos con las construcciones en una concentración de 0.5 µg de proteína por pocillo. Todas las muestras fueron evaluadas adicionalmente en pocillos sin sensibilizar con aOSM, incubados únicamente con buffer carbonato.

Paralelamente, se efectuó con las muestras analizadas un segundo formato de ELISA, donde placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con diluciones seriadas de las proteínas expresadas, así como el anticuerpo quimérico como control positivo durante toda la noche a temperatura ambiente en Buffer Carbonato. Luego de bloquear los sitios inespecíficos, se incubó con una solución de aOSM de 10 µg por pocillo en buffer PBS buffer PBS, Tween-20 0,1 %, gelatina 0,5% durante 2 horas a 37°C. Posteriormente la presencia del complejo Diabody-antígeno Tn fue evidenciada mediante incubación con sobrenadante del anticuerpo 83D4 en una dilución 1:2 durante una hora a 37°C y de un anticuerpo anti-ratón a una dilución 1/500 durante 1 hora a 37°C. La reacción colorimétrica y la absorbancia fueron determinados de forma análoga a la expresada anteriormente. En todos los casos entre cada incubación se efectuaron tres lavados con PBS-Tween 0,1%. Se verificó la especificidad de reacción utilizando como controles pocillos sensibilizados únicamente con Buffer Carbonato, pocillos a los que no se les agregó aOSM y pocillos a los que no se les incorporó el sobrenadante de 83D4.

Resonancia plasmónica de superficie (SPR)

El reconocimiento por Tn fue evaluado mediante Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) o Biacore, en la Unidad de Biofísica de Proteínas (UBP) del Institut Pasteur de Montevideo en un equipo BiaCore 3000. Glicopéptidos biotinilados conteniendo 3 antígenos Tn consecutivos o el correspondiente control sin glicosilar fueron inmovilizados a un sensor conteniendo estreptavidina (ChipSA) a un flujo a 5µl/min. Las muestras analizadas por su parte fueron diluidas en PBS con 0.005% P20 y fueron inyectadas a 20µl/min.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La capacidad de las proteínas expresadas de reconocer el antígeno Tn en un contexto celular fue evaluado por inmunofluorescencia indirecta empleando células MCF-7. Se dispensaron 40000 células por portaobjeto mediante cytopspin de las mismas durante 10 minutos a 1500 rpm. A continuación se fijaron por incubación en metanol acetona 50:50 durante 10 minutos. Los portaobjetos se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente y conservaron a -20°C hasta su utilización. Las placas fueron rehidratadas en PBS durante 10 min y se incubaron con las proteínas a evaluar en las diluciones apropiadas (10 o 100 µg/ml), sobrenadante de 83D4 y el anticuerpo quimérico Chi-Tn (10 µg/ml) como controles positivos, durante una hora a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS de 5 minutos, las células tratadas con los diabodies fueron incubadas con el anticuerpo anti-myc en una dilución 1/50 correspondiente a 10 µg/ml en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas a continuación durante 1 hora con un anticuerpo anti ratón-FITC 1/50 o anti-IgG humano-FITC 1/50 para Chi-Tn. Finalmente, las muestras fueron tratadas con DAPI 1 µg/ml durante 5 minutos para marcado nuclear de las células fijadas. Como controles negativos se evaluaron placas sin el agregado de diabodies o anticuerpos anti-Tn. Todas las muestras fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus a 10 y 40 X y analizadas con el software ImageJ.

Resultados

Construcción de genes de Diabodies Tn.

La construcción génica de Diabodies anti Tn se efectuó a partir de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo monoclonal 83D4. La misma consta de la región VH y VL unidas por un linker de cinco aminoácidos (Gly₄Ser). En la región carboxilo-terminal se incluyó la secuencia del epítipo C-myc para identificación en estudios funcionales y la secuencia para el sitio de corte proteolítico TEV seguido de un tag de histidina (His₆) para la purificación de las proteínas generadas a nivel procariota, que no fue incluido en las construcciones de expresión a nivel eucariota. Esta construcción se denominó Diabody Tn (**DbTn**) y se muestra en la figura 15-A. Adicionalmente, se generó una secuencia completa del dímero en una única cadena. De esta forma, el gen consta de una región VH y VL separadas por un linker de cinco aminoácidos (Gly₄Ser) al igual que DbTn y un linker largo y flexible de tres repetidos de la secuencia (Gly₄Ser), seguido de una segunda región idéntica (VH-linker-VL). En el extremo carboxilo terminal se adicionó la secuencia Myc-Tev-His₆. Esta construcción se denominó DbTn en tándem (**TnT**) y se muestra de forma esquemática en la figura 15-B. El detalle de la secuencia génica y aminoacídica de estas construcciones se puede consultar de forma detallada en el anexo 1.

Con el fin de conferir mayor estabilidad al dímero se incorporaron 2 cisteínas en regiones conservadas que corresponden a la zona Framework (FR) del dominio inmunoglobulina (FitzGerald et al. 1997). Para ello se modificó el residuo en posición 44 del Framework 2 de la cadena pesada y el residuo en posición 100 del Framework 4 de la cadena liviana (numeración según Kabat, et al 1991) que en ambos casos correspondió a Glicina, dichos nucleótidos se detallan en rojo en las figuras del anexo.

Para favorecer la expresión de las construcciones generadas tanto a nivel procariota como eucariota, las secuencias fueron analizadas y los codones de las mismas fueron optimizados para su expresión en *E. coli* como en células de *Drosophila*. Se detallan en el Anexo 2 las secuencias optimizadas para cada uno de los sistemas de DbTn, considerando que la secuencia DbTnT corresponde a una secuencia en tándem análoga a DbTn. A modo de ejemplo, para la construcción DbTn, se modificaron 164 codones para la expresión en *E. coli* (61% de la secuencia) y 147 codones para la expresión en *Drosophila* (58%).

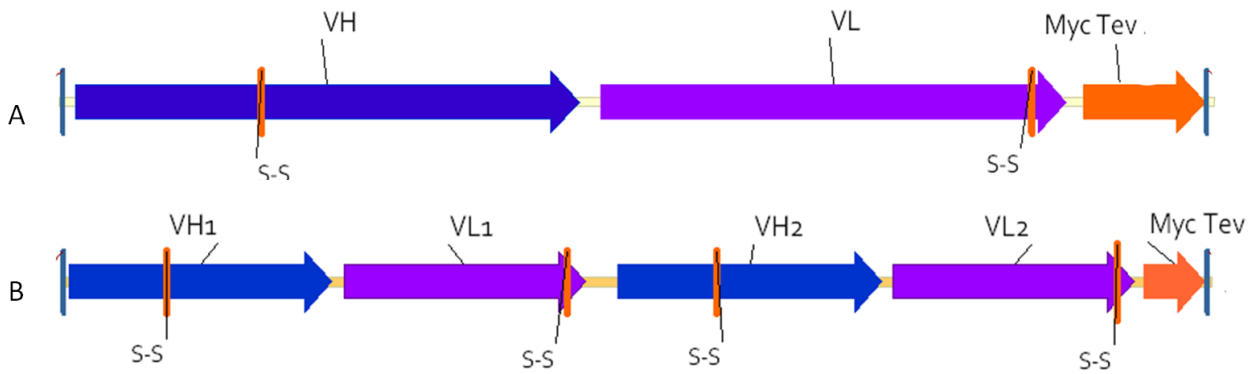


Figura 15. Construcción de genes de Diabodies anti-Tn Esquema del diseño de las diferentes construcciones generadas. A, Diabody Tn o DbTn, B, Diabody Tn en tándem o TnT. VH Región variable de la cadena pesada, VL Región variable de la cadena liviana del anticuerpo monoclonal 83D4. S-S enlaces disulfuro incorporados.

Los genes de las distintas construcciones fueron generados de forma sintética por la empresa GenScript y clonados en los plásmidos puC57 Amp^R para *E. coli* y puC57 Kan^R para *Drosophila* en el sitio de restricción EcoRV.

Expresión y purificación de Diabodies anti-Tn

Sistema de expresión procarionta

Expresión citoplasmática en *E. coli*

Vectores de expresión

Inicialmente se evaluó la expresión de las construcciones generadas en un sistema procarionta basado en *E. coli* para lo cual los genes de DbTn y TnT fueron sub-clonados en el plásmido de expresión pET28a entre los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Este paso también fue realizado por la empresa GenScript y se detalla en la figura 16 a y b

Los plásmidos fueron reconstituidos, amplificados y purificados por mini-prep como se indicó en materiales y métodos. Se verificó la presencia de los insertos por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y visualización de las bandas en geles de agarosa 1% que se muestran en las figuras 16 c y d, donde se observa la liberación de insertos de 700pb y 1500pb consistentes con DbTn y TnT.

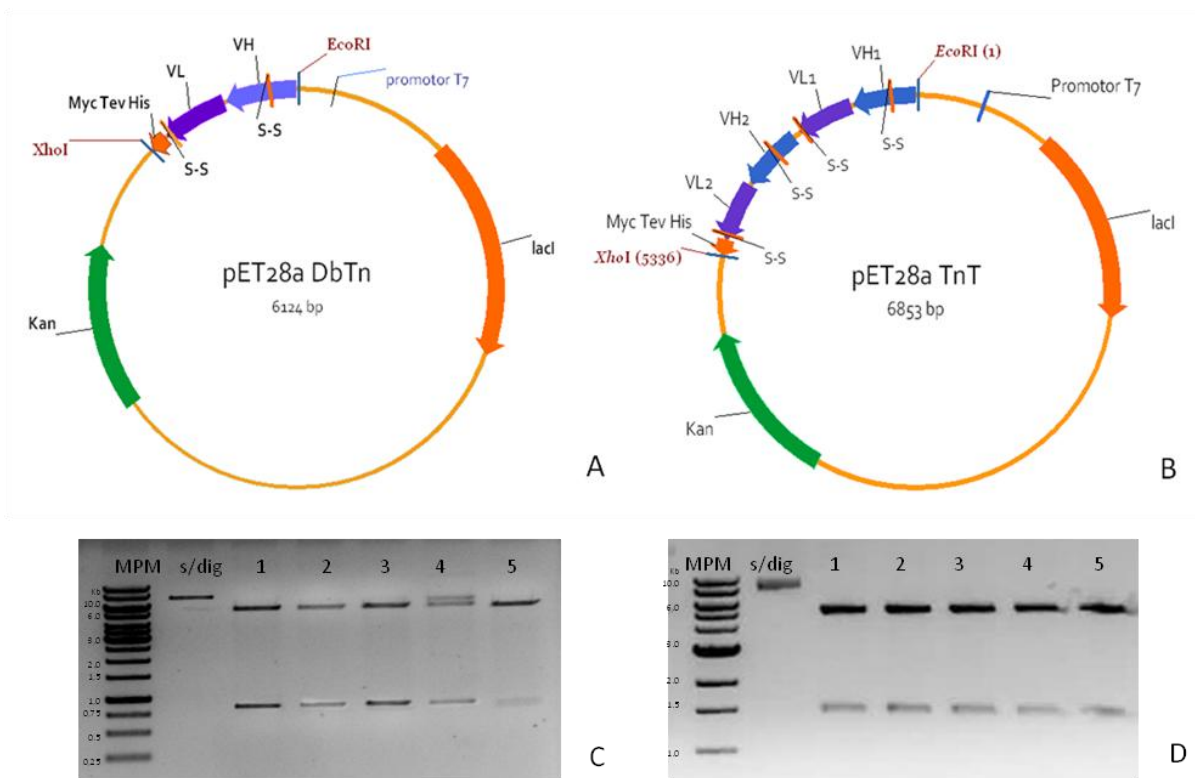


Figura 16 Plásmidos de expresión de Diabodies Tn en *E. coli*. Se clonaron las secuencias de DbTn y TnT en los sitios EcoRI y XhoI del plásmido pET28a, generando así el plásmido pET28aDbTn (A) y pET28aTnT (B). La digestión con dichas enzimas generó la liberación de los insertos. Gel de agarosa 1 % de digestión enzimática de los plásmidos pET28a-DbTn (C) y pET28a-TnT (D) con las enzimas EcoRI y XhoI.

De forma teórica se calculó el peso molecular, punto isoeléctrico y la absorbancia relativa a 280 nm de cada construcción utilizando el programa NTI vector, los que están detallados en la tabla 3.

Tabla 3. Características teóricas del gen y proteínas DbTn y TnT expresados en *E. coli*

	DbTn	TnT
Longitud	783 pb	1512 pb
	260a.a.	503a.a.
Peso molecular	28,4kDa/56,8kDa	54,2 KDa
Abs 280 1mg/ml corr.	0,63	0,61
Punto isoeléctrico	5,9	6,18

Dado el contenido de enlaces disulfuro en la proteína de interés, se evaluaron cepas adaptadas a la expresión de los mismos en el ambiente reductor citoplasmático de *E. coli*.

Se evaluó la expresión de la construcción DbTn en las cepas Bl21 (DE3) pLysPFH255, BL21 (DE3) pLysPMJS9 y Shuffle en medio de cultivo LB, a 30°C y con 0,5 mM de IPTG. En todos los casos,

luego de la expresión se separó la fracción soluble e insoluble y la fracción soluble fue purificada por cromatografía de afinidad IMAC.

En la figura 17 se muestran geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie Blue de las distintas fracciones, donde se observa que en todos los casos se expresó la proteína DbTn la cual se obtiene en la fracción insoluble. No se observan bandas del peso esperado en las fracciones de elución de cromatografía de afinidad IMAC, ni diferencias en el patrón de expresión en la fracción soluble de las distintas cepas.

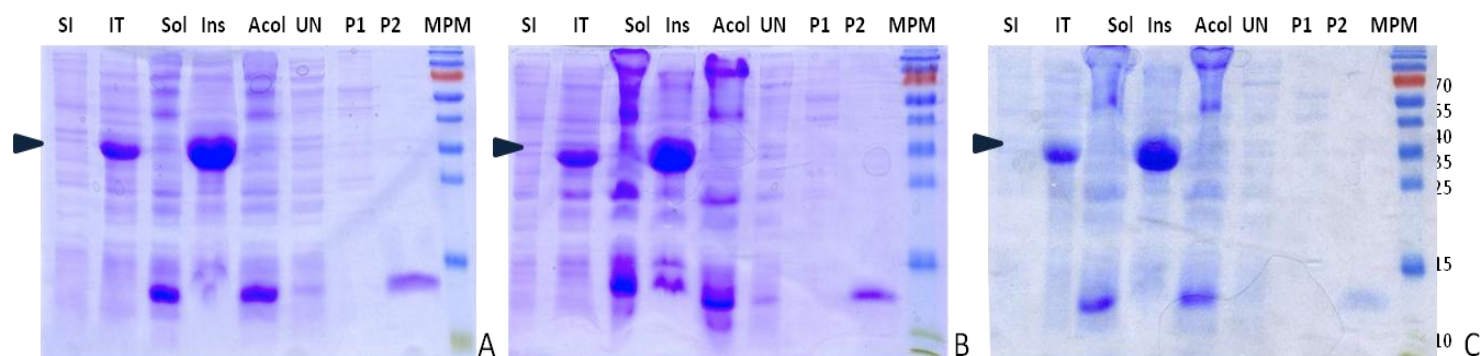


Figura 17. SDS-PAGE de fracciones de Expresión de DbTn en las cepas de *E. coli* **A.** BL21 (DE3) pLysPFH255, **B.** BL21 (DE3) pLysPMJS9 y **C.** Shuffle. Se detalla con una flecha el peso molecular esperado para la construcción. **SI.** Sin inducir, **IT** Inducido Total, **Sol**, Fracción soluble **Ins** Fracción Insoluble **Acol** Fracción soluble filtrada utilizada en IMAC **UN** fracción no unida **P1** y **P2** picos obtenidos en IMAC

Dado que no se observaron diferencias en la expresión entre las distintas cepas, se eligió trabajar únicamente con la cepa BL21 (DE3) pLysPFH255 para los siguientes ensayos.

El efecto de la concentración de inductor de expresión IPTG, se evaluó mediante la expresión a 30°C en LB con 0,1mM o 0,5 mM y se verificó mayor expresión a esta concentración, manteniéndola para el resto de los experimentos (datos no mostrados).

A continuación se evaluó el efecto de la temperatura de inducción en la expresión a nivel citoplasmático así como el cambio a un medio de cultivo más rico como 2YT. De esta forma, se estudió la expresión de DbTn y TnT luego de inducción durante 4 horas a 30°C o durante toda la noche a 20°C, separando las fases solubles e insolubles y purificando la fracción soluble por IMAC, la que fue concentrada 10 veces en centrífuga antes de ser cargada en los geles de poliacrilamida. En la figura 18 se muestran geles de SDS-PAGE con las fracciones proteicas obtenidas. Las fracciones cultivadas a 30°C no muestran bandas del peso esperado en la fracción purificada para ninguna de las dos construcciones. Esto indica que el cambio de medio de LB a 2TY si bien tuvo un efecto en la biomasa recuperada luego de la expresión, no generó efectos en la solubilidad de ninguna de las dos proteínas. Por otra parte, cuando la inducción se realizó a 20°C, se observaron bandas del peso esperado en la fracción purificada IMAC, indicando que al menos una parte de la proteína blanco fue producida de forma soluble.

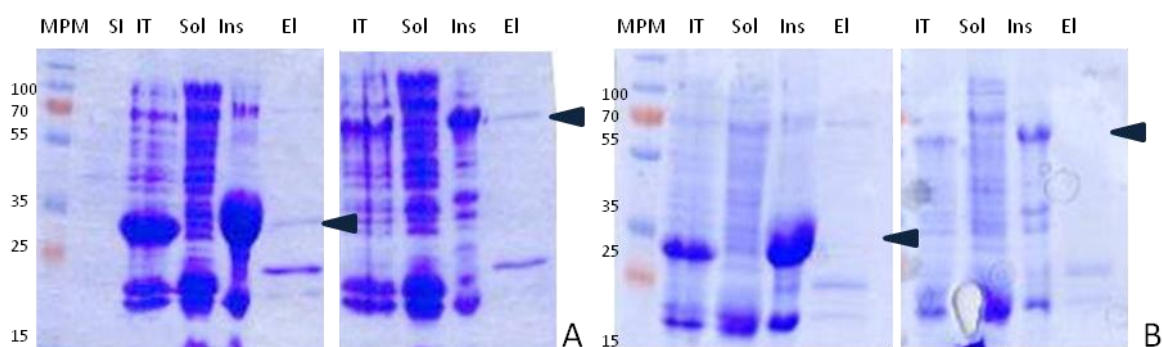


Figura 18. SDS-PAGE de fracciones de expresión a 20°C (A) o 30°C (B) de DbTn o TnT. **SI** antes de inducir **IT** inducido total **Sol** Fracción soluble **Ins** Fracción insoluble **EI** Pico elución IMAC. Las flechas señalan los pesos esperados para DbTn 35kDa o TnT 55 kDa

Para confirmar la identidad de las proteínas observadas en los eluidos de la expresión de DbTn y TnT a 20°C, las bandas del peso molecular esperado fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masa, los que se muestran en el anexo 3. Los péptidos obtenidos de forma experimental por digestión con Tripsina fueron comparados con digestiones teóricas de ambas proteínas. Se identificó de forma significativa las proteínas DbTn y TnT. En el caso de DbTn el porcentaje de cobertura de los péptidos identificados (3) correlaciona con un 41% de la secuencia mientras que para TnT la cobertura es de un 28%.

Cabe destacar que pese a optimización del proceso de purificación en columnas IMAC, no se logró obtener proteína soluble de forma pura y en cantidad suficiente para continuar los ensayos requeridos a los objetivos de este trabajo.

Resolubilización de cuerpos de inclusión

Si bien la reducción de temperatura generó un aumento de expresión de proteína soluble, la mayor parte se encuentra formando cuerpos de inclusión para las dos construcciones siendo la producción de DbTn mayor a TnT. De esta forma, se evaluaron métodos de resolubilización de las proteínas generadas considerando como beneficio la alta expresión en esta fase de DbTn. Como se describió en materiales y métodos, para obtener una gran cantidad de proteína en cuerpos de inclusión, la expresión se efectuó en bacterias BL21 (DE3) pET28DbTn, en medio 2YT, inducción con IPTG 0,5 mM durante cuatro horas a 30°C. Las bacterias fueron recuperadas, lisadas, y la fase insoluble se lavó y resolubilizó de forma de generar una fracción enriquecida en DbTn. El DbTn de esta forma desnaturalizado fue purificado por IMAC y cuantificado. Este pool de DbTn fue utilizado para la evaluación de cada una de las estrategias de refolding. Se muestra en la figura 19 el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue de las distintas fracciones en el proceso de purificación así como el cromatograma de IMAC. El pico de IMAC fue cuantificado por absorbancia

a 280 nm con un rendimiento de 15 mg por litro de medio, si bien se observa en el gel, que la fracción no unida aún contiene proteína del peso correspondiente a DbTn y que el eluido presenta otras proteínas de menor y mayor peso molecular.

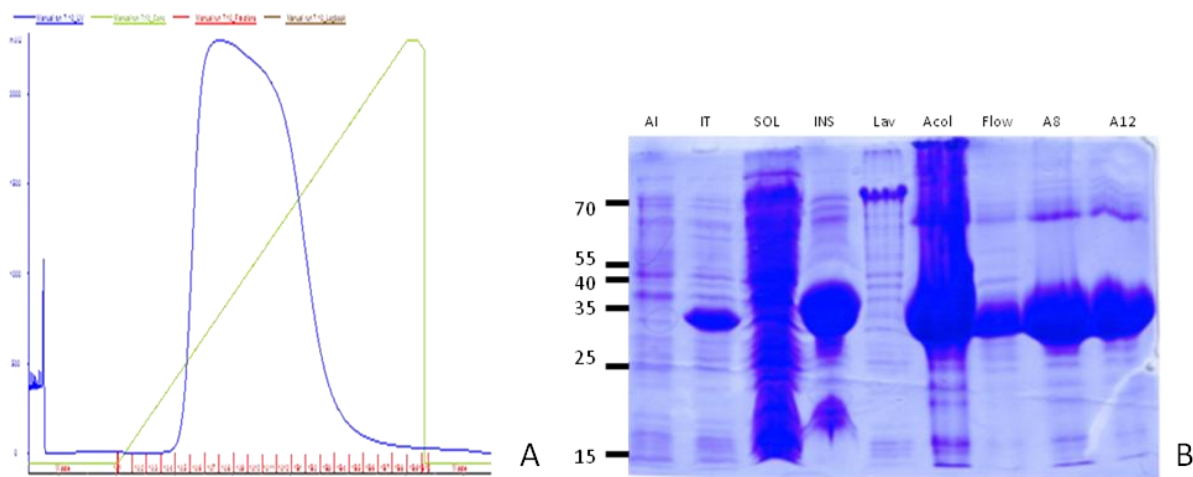


Figura 19. Expresión y purificación de Diabody Tn en cuerpos de inclusión. A. cromatograma del perfil de elución, en azul absorbancia a 280nm en verde gradiente de elución. B. SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación. **AI.** Antes de Inducir, **IT.** inducido total, **SOL.** Fracción Soluble, **INS.** fracción insoluble, **Lav.** sobrenadante lavado de cuerpos de inclusión, **A.col.** Fracción antes de columna, **Flow.** fracción no unida, **A8** y **A12** fracciones del pico de elución.

Resolubilización por dilución.

En esta estrategia, las proteínas desnaturalizadas son diluidas rápidamente en buffer de Refolding, el cual contiene L-Arginina así como el par redox glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) para la formación de enlaces disulfuro. Se evaluaron distintas proporciones del par redox GSH-GSSG 5:1, 10:1 o solamente GSSG, obteniendo el mejor rendimiento de Diabody en su conformación dimérica en la relación 5:1 y es la que se empleó en el resto del presente trabajo.

En cada ensayo se utilizaron entre 8 y 10 mg de proteína las que fueron diluidas a una concentración final 100 µg/ml en el buffer de renaturalización el que se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C. Se concentró y dializó esta solución, y una alícuota de 500 µl de proteínas en solución fueron cargadas en una columna de gel filtración Superdex 75 (10/300) para determinar el estado de oligomerización de las mismas. Se muestra en la figura 20-A el perfil observado en la cromatografía, donde se obtienen dos picos con volúmenes de elución 9,0 ml y 10,7 ml. Si se comparan estos volúmenes con el estándar de la columna correspondería el primer pico a un tamaño molecular entre 67 y 44 KDa, coherente con el tamaño del Diabody en estado dimérico y el pico 2 a un tamaño menor a 44 KDa, consistente en este caso con la fracción monomérica que en geles de SDS-PAGE muestra un tamaño relativo de 35 kDa. Cabe destacar que la fracción mayoritaria corresponde a la fracción monomérica, siendo el rendimiento de éste

método para DbTn alrededor de 300 µg de proteína recombinante dimérica pura por litro de cultivo.

Resolubilización por diálisis sucesivas

Para esta estrategia, se emplearon 3 mg de proteína desnaturalizada a una concentración de 10µM que en el caso del Diabody corresponde a 0,3 mg/ml para realizar diálisis de volúmenes no mayores a 3 L. El componente desnaturalizante (Gdn-HCl) del buffer se reduce gradualmente y el par redox GSSG/GSH se introduce en la transición entre 1 a 0,5M de (Gdn-HCl).

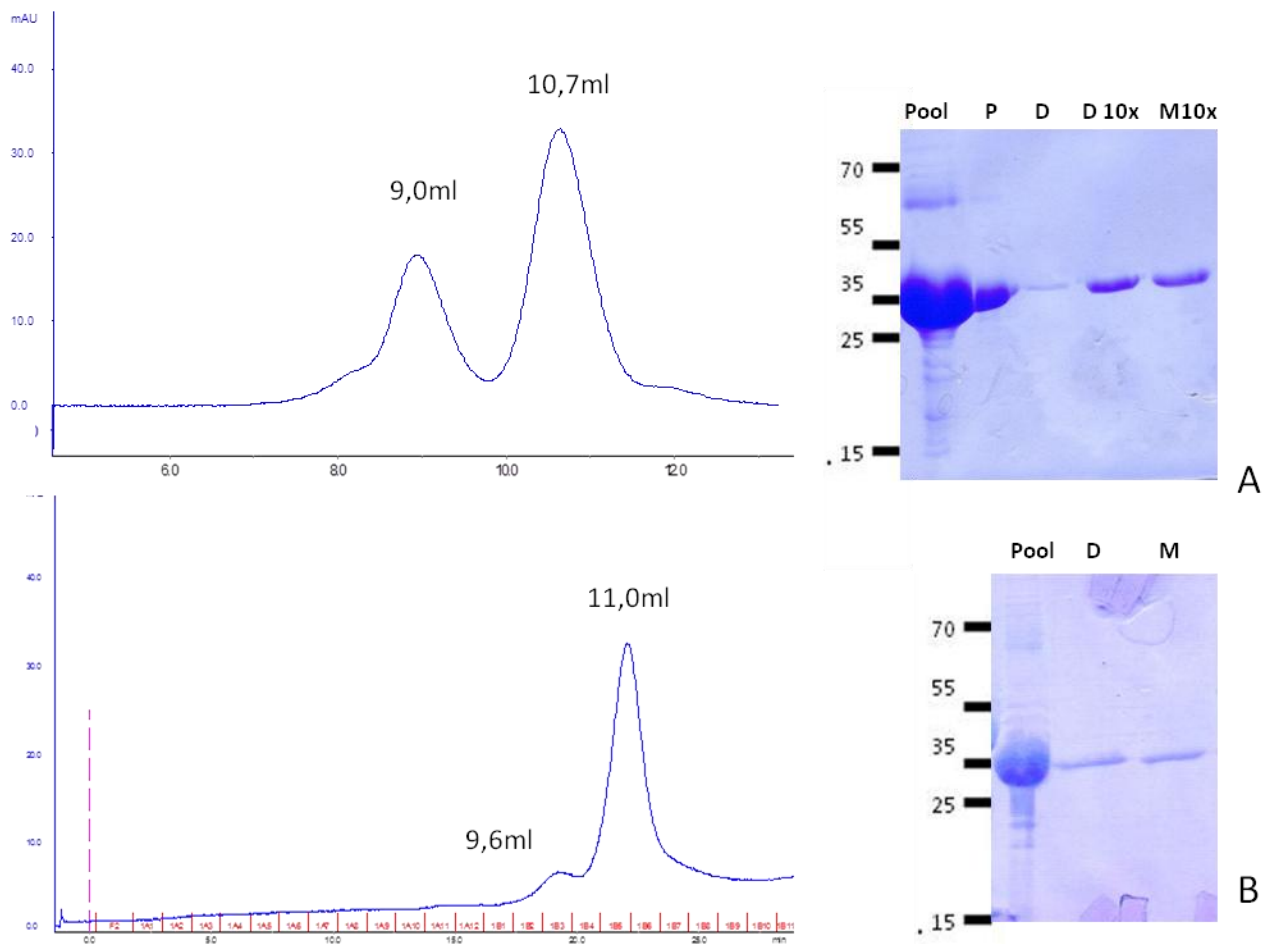


Figura 20. Refolding DbTn A. Refolding por dilución, B. Refolding por Diálisis sucesivas. Gel filtración de 500ul en Superdex S75 10/300. Y SDS PAGE de fracciones obtenidas. **Pool.** Fracción pico de IMAC DbTn, **P.** precipitado. Fracción precipitada luego de la diálisis, **D** Pico 1 fracción dimérica **D10X** pico 1 concentrado 10 veces **M** pico 2 correspondiente a monómero **M10X**, pico 2 concentrado 10 veces en centrífuga.

Luego de la serie de diálisis, la muestra fue centrifugada para eliminar proteína precipitada y la muestra fue concentrada y evaluada por gel filtración. Como se observa en la figura 20 B, se obtuvo un patrón similar al del refolding por dilución, es decir dos picos de volúmenes de elución en el orden de los tamaños correspondientes a DbTn dimérico y monomérico pero en una proporción menor de la fracción dimérica respecto a la monomérica que la observada en la metodología anterior. El rendimiento en este caso de DbTn dimérico soluble fue de 100 µg/L de medio de cultivo.

Resolubilización en columna

A partir del pool de DbTn purificado por IMAC 10 mg de proteína fueron diluidos en Binding Buffer y cargados en una columna His-trap de 1 ml. Luego de un gradiente mediante el cual se eliminó gradualmente el buffer de desnaturalización por el de refolding, luego de la elución se observó precipitación de proteínas incluso dentro de la columna como un frente marcado de elución. De cualquier manera, se centrifugó y cuantificó el sobrenadante obteniéndose 1 mg de proteína soluble, luego de dializarlo y concentrarlo para el análisis por gel filtración, la fracción remanente soluble fue menor a 300 µg. A partir del comportamiento observado en los otros métodos, donde solamente una fracción de la muestra está compuesta por DbTn dimérico y que el rendimiento de la resolubilización por dilución fue igual o mayor, en este método no se prosiguió con el análisis por gel filtración de las proteínas obtenidas.

Se puede concluir entonces, que se logró obtener proteína soluble con tamaños moleculares consistentes con el diabody dimérico a partir de cuerpos de inclusión expresados en *E. coli*. En todos los casos sin embargo, se obtuvo de forma mayoritaria la fracción monomérica. De los tres métodos evaluados el que mostró mejor rendimiento por litro de medio de cultivo es el de dilución obteniendo hasta 300 µg/L de proteína en forma dimérica.

Expresión en periplasma

Como se mencionó, la expresión en el espacio periplásmico es la más citada para diabodies, dado que es el espacio natural donde las bacterias contienen la maquinaria enzimática necesaria para la formación de enlaces disulfuro.

Vectores

Para la expresión de DbTn en este compartimento primeramente se subclonó la secuencia del DbTn y TnT en el vector de expresión pMALP2E. Los fragmentos generados por digestión con EcoRI y HindIII de pUC57^{Amp} DbTn y el vector pMALp2E fueron ligados como se detalló en materiales y métodos. La confirmación de la ligación se efectuó mediante digestión de plásmidos purificados a partir de mini preps de colonias resistentes a Ampicilina con las mismas enzimas y se

muestra en la figura 21 así como el plásmido generado, particularmente para DbTn si bien se realizó en paralelo con DbTnT.

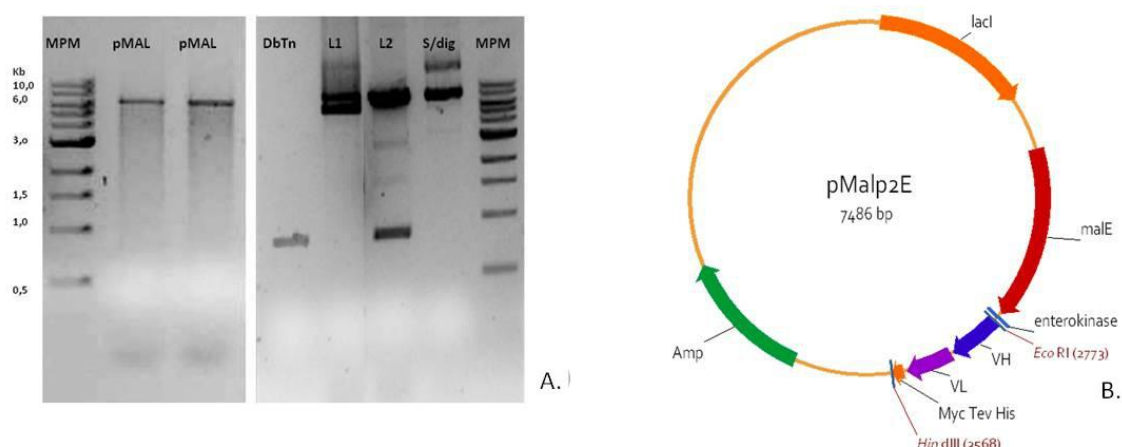


Figura 21 Subclonado por ligación enzimática de DbTn en pMALp2E. **A.** Fragmentos utilizados para la ligación pMALp2E y DbTn y confirmación de sub-clonado por digestión con EcoRI y HindIII. **L1** Ligación negativa **L2** ligación con inserto de tamaño esperado. **B.** Esquema de plásmido generado pMALp2E-DbTn

Con el plásmido generado se transformaron bacterias BL21 generando así la cepa BL21-pMALP2E-DbTn. Luego de la expresión la fracción periplásmica se obtuvo por shock osmótico y el sobrenadante fue cargado en columnas His-trap de 1ml. Las fracciones de cada paso fueron evaluadas por SDS-PAGE y Western Blot utilizando un anticuerpo anti-Histidina de forma de detectar la proteína DbTn en la fusión DbTn-MBP. Como se observa en la figura 22 A, se obtuvo una banda correspondiente al peso esperado para la fusión MBP-DbTn (72,2kDa), el cual se mantuvo en la fracción periplásmica que fue posteriormente purificada. En la purificación se obtuvieron dos picos, ambos contienen una fracción de peso esperado reconocido por el anticuerpo anti-His (Figura 22 a y c). El rendimiento de proteína de fusión DbTn-MBP fue de aproximadamente 1 mg/L de proteína. Se evaluó la digestión con enteroquinasa para liberar el Diabody mediante incubación durante 1, 3 ó 24 horas según las condiciones indicadas por el fabricante. Dichas fracciones fueron separadas por SDS-PAGE y Western Blot que se muestran en la figura 22 b donde se observa la aparición de una banda del peso correspondiente al DbTn monomérico. Sin embargo, la digestión parece ser parcial y a las 24 horas aumenta una banda de aproximadamente 20kDa que podría corresponder a degradación proteica. Este ensayo fue repetido con el doble de concentración recomendado (10 U/ μ g) así como utilizando una enteroquinasa de otro fabricante. En todos los casos se visualizó el mismo patrón, en el cual no se digiere completamente la fracción de Diabody-MBP, obteniéndose bandas de menor peso molecular, tal vez resultado de clivaje proteico. La proteína de fusión en su estado dimérico generaría una proteína de aprox. 140kDa la cual no mantiene las características farmacocinéticas

de los diabodies, por lo que no se tuvo en cuenta la utilización de esta fracción para ensayos funcionales.

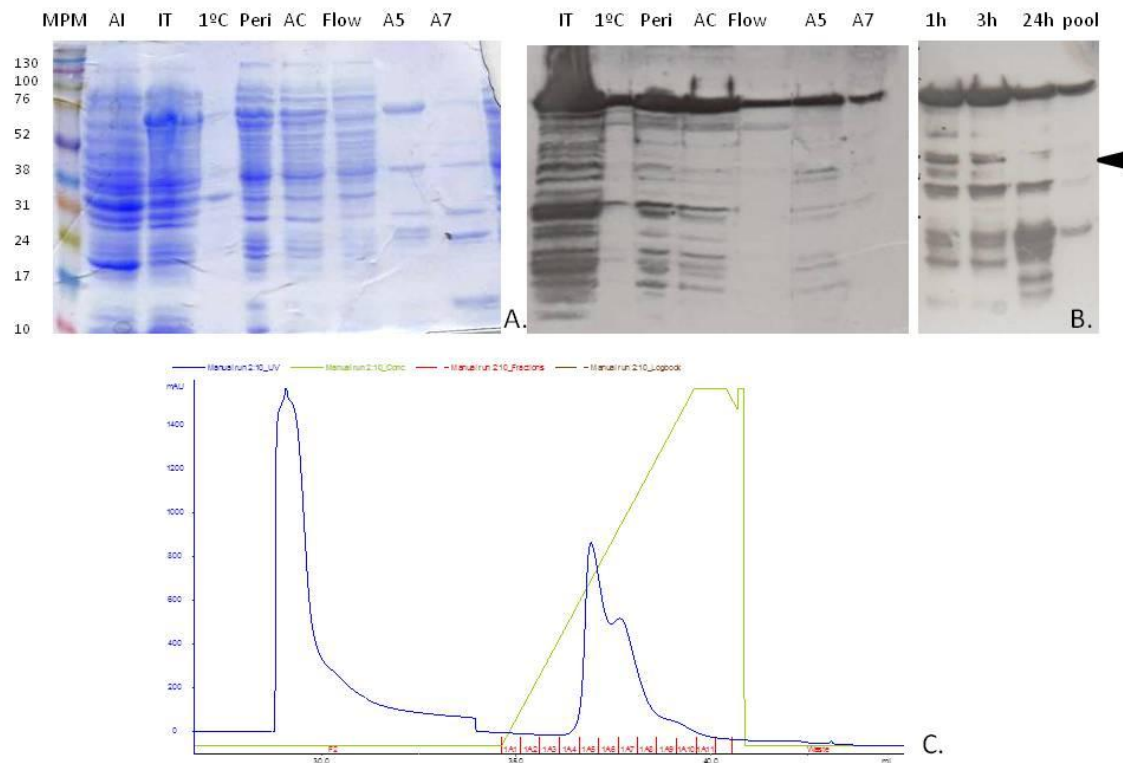


Figura 22. Expresión y purificación de DbTn-MBP en periplasma. **A.** SDS-PAGE y **B.** Western Blot anti-His-tag de fracciones obtenidas en el proceso de expresión, purificación y digestión con Enteroquinasa. **C.** Cromatograma de la cromatografía de afinidad por IMAC. **AI.** Antes de inducir, **IT.** Inducido total, **1°** Sobrenadante primera centrifugación de purificación de proteínas periplasmáticas **Peri.** Fracción periplasma **AC** Antes de columna, **Flow,** fracción no unida, **A5** y **A7** picos de IMAC. 1-3 y 24hs post incubación del pool con enteroquinasa. Se muestra con una flecha el peso correspondiente al monómero de DbTn.

Adicionalmente se evaluó la expresión en periplasma de la construcción DbTn TnT. Si bien se subclonó en forma paralela la secuencia TnT en el plásmidos pMALp2, no se evidenció proteína del peso esperado cuando se evaluó la expresión a nivel de periplasma ni por SDS-PAGE o Western-Blot por lo que no se muestra en los resultados.

Sistema de expresión eucariota

Debido al bajo rendimiento obtenido en la expresión de la proteína blanco en sistemas procariontas se evaluó la utilización de un sistema eucariota en células de *Drosophila S2*, el cual tiene la ventaja de que las proteínas expresadas son secretadas al medio de cultivo a través de una señalización vía retículo, condiciones óptimas para la generación de enlaces disulfuro.

Vectores

Para la evaluación de la expresión de genes DbTn y TnT en este caso sin el tag de histidina los genes fueron sintetizados por GenScript con optimización de codones para este sistema y sub clonados en el plásmido pUC57 kan^R en el sitio EcoRV como se mencionó anteriormente. Se verificó la presencia de los insertos por digestión con las enzimas EcoRI y HindIII (Figura 24 c). El plásmido de expresión utilizado fue el pT350 en el cual el inserto debe estar en el mismo marco de lectura de la señal de translocación Bip en la región upstream al gen y al doble strep-tag downstream como se muestra en el esquema de la figura 23 A-B. El subclonado de las construcciones se realizó mediante RF cloning.

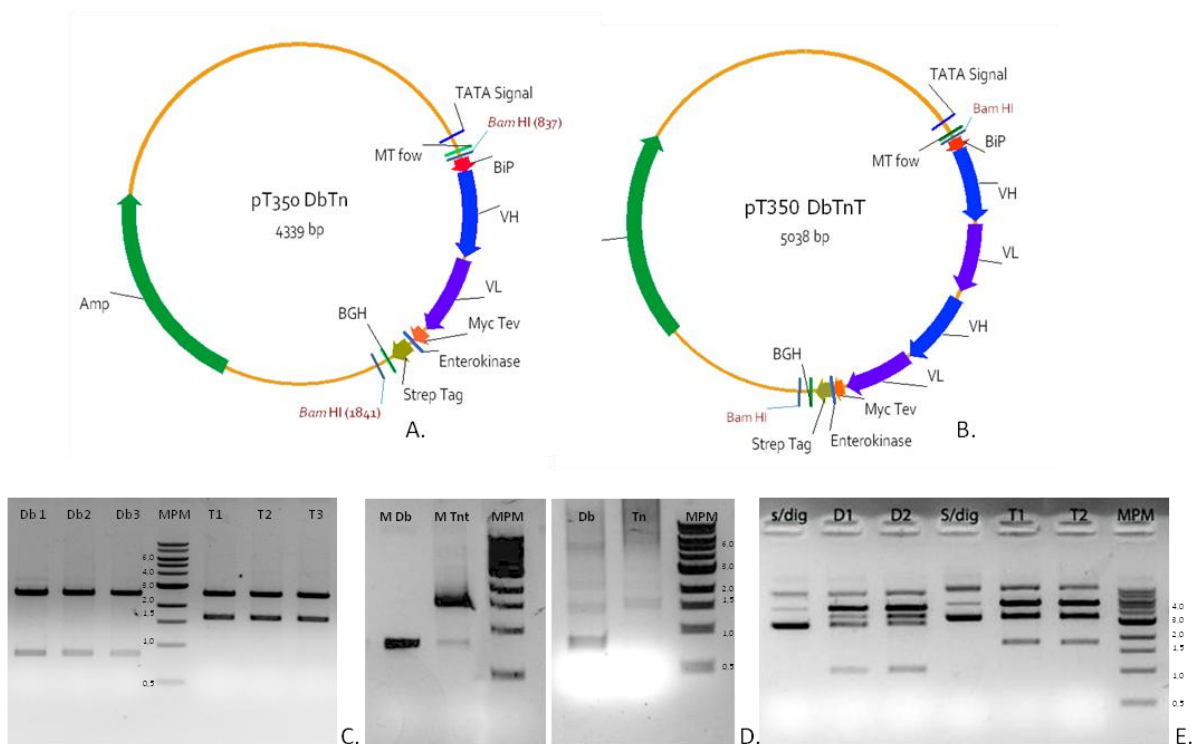


Figura 23. Plásmidos de expresión de Diabodies Tn en *Drosophila*. **A y B.** pT350DbTn y pT350 DbTnT. **C.** Geles de agarosa de digestión de los plásmidos pUC57kan^R DbTn y pUC57kan^R TnT con EcoRI y HindIII. Db DbTn y T TnT **D.** RF cloning, megaprimers generados en la primera ronda de PCR (izq.), producto de amplificación de la segunda PCR (der).M. Megaprimer **E.** Confirmación por digestión con BamHI de sub-clonado por RF cloning de plásmidos pT350DbTn o pT350TnT.

En la primera ronda de amplificación se generaron megaprimers consistiendo en el gen DbTn o TnT flanqueados por los sitios de inserción en el plásmido pT350. Cabe destacar que dado que las dos construcciones presentan la misma secuencia en los extremos N y C terminal, se utilizaron los mismos juegos de primers para los dos genes.

Se muestra en la figura 23 D la amplificación de la primera ronda de PCR. Las bandas obtenidas fueron purificadas del gel y utilizadas como primers en la segunda ronda de amplificación, utilizando como ADN molde el plásmidos pT350. A partir de estas colonias se amplificaron y purificaron plásmidos y la presencia de inserto fue analizada inicialmente por liberación del mismo con la enzima BamHI. pT350-DbTn genera dos bandas de 3335 y 1004pb mientras que pT350-TnT 3335 y 1750 pb lo que puede observarse en la figura 23E.

Los plásmidos positivos mediante digestión enzimática fueron secuenciados con los primers MT y BGH para confirmar que la secuencia fuera la correcta y que el sitio de inserción estuviera en el mismo marco de lectura que Bip y el doble Strep tag.

Se detalla en la tabla 4 datos teóricos de las proteínas expresadas en este sistema, en el que a diferencia del sistema empleado en procarionota se utiliza un doble-strep tag para su purificación.

Tabla 4. Características teóricas del gen y proteínas DbTn y TnT expresados en *Drosophila*

	DbTn	TnT
Longitud	865 pb	1562 pb
	289 a.a.	517 a.a.
Peso molecular	31kDa / 62 kDa	55,3 KDa
Abs 280 1mg/ml corr.	0,59	0,54
Punto isoeléctrico	5,6	6,24

Cinética de Inducción.

Una vez confirmado el sub clonado de los genes en el plásmido pT350, se generó una línea policlonal de células S2 que incorporaron el plásmido pT350 DbTn o pT350 DbTnT como se indicó en el apartado correspondiente de materiales y métodos.

La puesta a punto de las condiciones de expresión de diabodies en este sistema se realizó mediante una cinética de expresión en placa. Se evaluaron dos inductores y el tiempo de expresión tomando muestras al día 1, 2, 3, 5 y 7 post-inducción. Los sobrenadantes de cultivo fueron evaluados por Western-Blot determinando la presencia de proteína con un anticuerpo anti-c Myc, siendo el control positivo la proteína DbTn-MBP que se muestra en la figura 24. En relación a la

expresión de DbTn se observan bandas del peso esperado para las dos condiciones, siendo la expresión con cadmio de mayor intensidad. En esta condición a partir del segundo día se observa producción proteica con un pico al día 5. En cuanto a la construcción DbTnT, se observan bandas tenues en los sobrenadantes inducidos con Cadmio, entre los días 2 y 5 post-inducción, mientras que no se evidencia producción de proteínas en los sobrenadantes de las condiciones inducidas con cobre. En vista a estos resultados se decidió trabajar con la construcción DbTn, inducida con Cadmio durante 5 días.

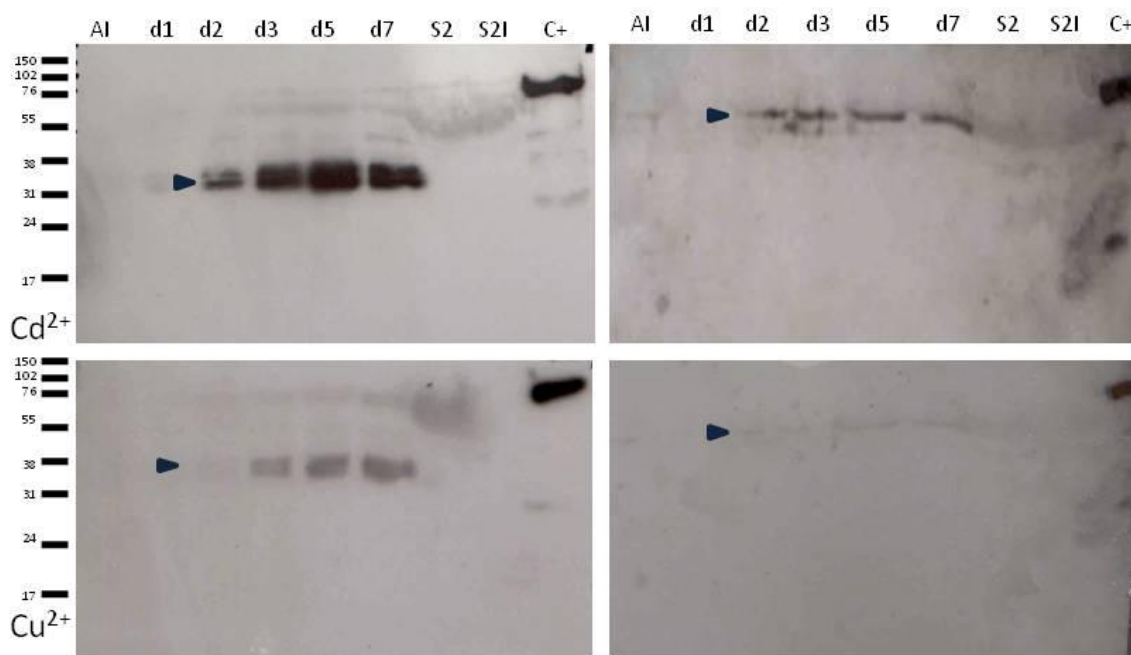


Figura 24. Cinética de inducción expresión de DbTn en *Drosophila*. Western Blots de sobrenadantes de cultivo inducidos con Cd^{2+} (Superior) o Cu^{2+} (inferior) de entre 1 y 7 días post inducción. **AI** Antes de inducir **d1-d7** días post-inducción **S2** sobrenadante de células S2 sin transfectar **S2I** sobrenadantes de células S2 sin transfectar inducidas **C+** DbTn-MBP.

Expresión y purificación de DbTn

A partir de las condiciones determinadas en la cinética de expresión, células S2 pT350DbTn fueron cultivadas a una densidad de 7×10^6 células /ml, inducidas y cultivadas durante 5 días a 28°C y 110 rpm. El sobrenadante fue colectado, centrifugado y filtrado. Las proteínas producidas fueron purificadas en una columna StrepTrap de 1ml como se mencionó en materiales y métodos, el pico de elución obtenido se observa en la figura 25 A. El estado de oligomerización de los Diabodies expresados fue analizado en columnas de gel filtración Superdex s75 (10/300). De forma análoga a las muestras analizadas anteriormente, se obtuvieron dos picos, correspondientes a la fracción dimérica y monomérica. Cabe destacar que la proporción entre fracción dimérica y monomérica varió según el batch analizado y la temperatura a la que se conservó el mismo hasta su purificación. Se muestra en la figura 26b un perfil en el que la proporción mayoritaria es la dimérica

y en la figura 25c el perfil de geles SDS-PAGE. La variabilidad en el rendimiento de proteína dimérica soluble purificada fue entre 3,7 y 4,6 mg/L según el batch analizado, pero en todos los casos fue de casi un orden mayor a los rendimientos obtenidos en el sistema procariota.

Cabe destacar que cuando el pico correspondiente al dímero se analiza en geles de poliacrilamida de mayor porcentaje se evidencian dos bandas de pesos muy similares. Estas bandas fueron analizadas de forma independiente por espectrometría de masa para su caracterización (ver anexo 3). En ambos casos se determinó que la identidad corresponde al DbTn, sin embargo, la de menor peso molecular correspondería a una fracción en el que se pierde el doble strep-tag, siendo la cobertura para esta fracción clivada del 68% y la proteína completa 66%. Se detalla en el anexo 3 los péptidos identificados y como en la molécula completa se identifica el extremo C-terminal, péptido que no aparece en la fracción clivada así como el gel desde el cual se purificó.

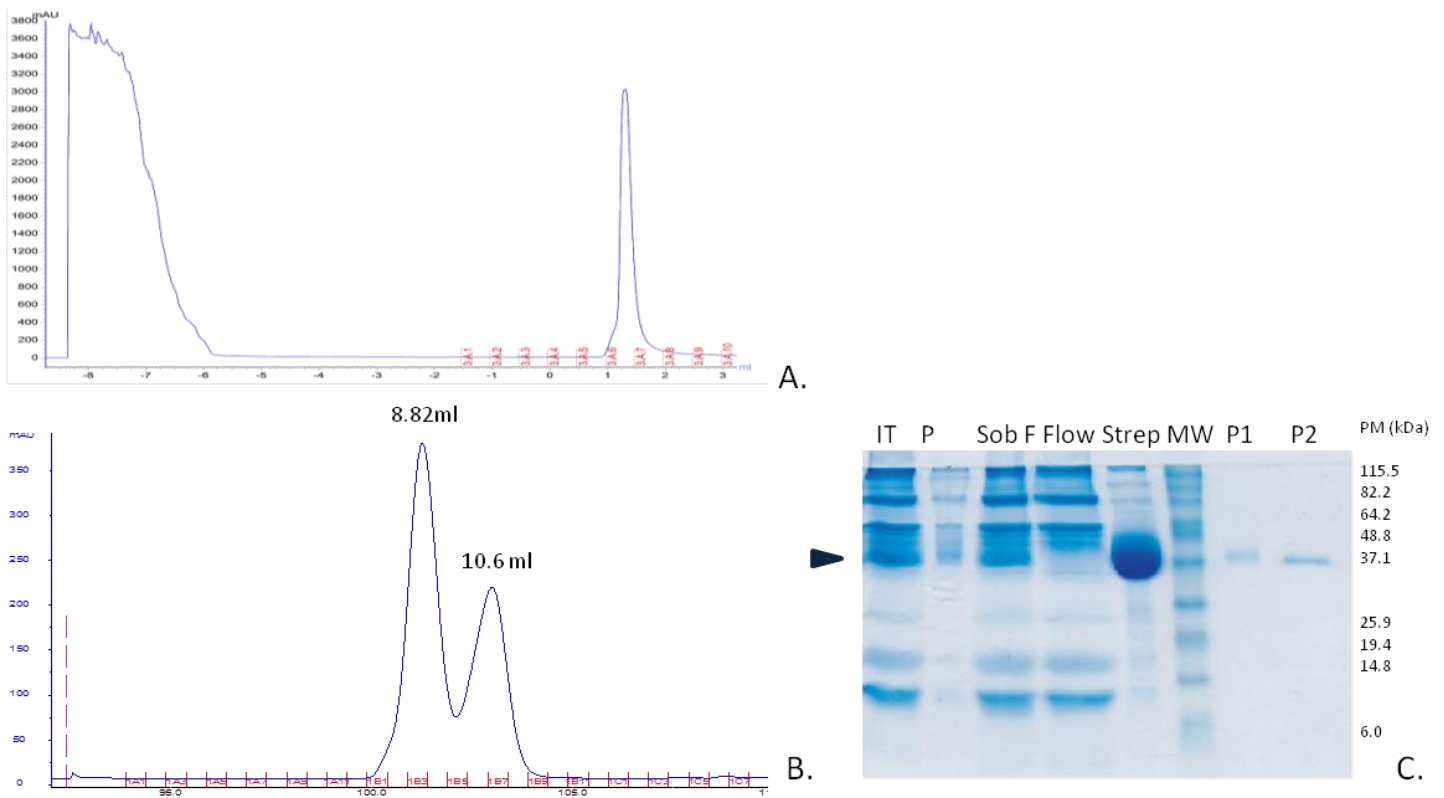


Figura 25 Expresión de DbTn en *Drosophila S2*. **A.** Cromatograma de cromatografía de afinidad Strep-trap, **B.** Cromatografía de gel filtración en columna Superdex S75 (10/300). **C.** SDS-PAGE de fracciones de purificación IT inducido total **P**. Precipitado medio cultivo **SobF** Sobrenadante filtrado **Flow** Fracción no unida Strep Pico cromatografía **P1 y P2** picos gel filtración 8,82 y 10,6 respectivamente.

De esta forma, se analizó la expresión de un Diabody anti-Tn en un sistema procariota y otro eucariota logrando obtener proteína soluble y dimérica en ambos casos. Cada sistema ofrece ventajas en relación a tiempos y rendimiento los que se resumen en la tabla 5. Dado el rendimiento obtenido en el sistema *Drosophila S2* y el tiempo de producción luego de obtener la

densidad celular necesaria, se optó por este sistema para la producción de Diabody Tn para los ensayos de caracterización funcional, que serán detallados a continuación.

Tabla 5. Comparación de los distintos métodos de expresión evaluados para la producción de DbTn en cuanto a rendimiento y tiempo requerido.

	Expresión	Rendimiento (mg/L)	Tiempo	
<i>E. coli</i>	Soluble	ND	4 días	No se obtuvo proteína pura
<i>BL21(DE3)</i>	Insoluble	0,3	7 días	
	Periplasma	1	4 días	Solo como proteína de fusión a MBP.
<i>Drosophila S2</i>	Sobrenadante	3,7-4,6	6 días	Distinta proporción D:M

Caracterización funcional de Diabodies Tn

Estabilidad del dímero DbTn

En base a los cromatogramas obtenidos de gel filtración tanto en las proteínas expresadas en sistemas procariontas y eucariotas en los que se observa que se obtienen fracciones correspondientes a dímero y monómero, se analizó la migración electroforética de las mismas con y sin agente reductor que se muestra en la figura 26 b. En condiciones no reductoras se observan dos bandas, una correspondiente al peso del dímero y la mayoritaria al del monómero, indicando que solamente una fracción presenta enlaces disulfuro intercatenarios. Más aún, cuando el pico correspondiente al monómero es inyectado nuevamente en la columna de gel filtración, se vuelven a obtener dos picos, con volúmenes de elución correspondientes a una fracción monomérica mayoritaria y una dimérica minoritaria (figura 26a). De esta forma, habría una población dimérica estabilizada por enlaces disulfuro intercatenarios, otra estabilizada por interacciones no covalentes que determinan su elución en gel filtración con un peso correspondiente a un dímero; mientras que hay una en equilibrio entre la fracción dimérica y monomérica mayoritaria. Cabe destacar que la figura 26 de cromatografía de gel filtración corresponde a un batch distinto al de la figura 26, Se puede apreciar que la proporción de dímero en este caso es menor relacionado también con la estabilidad de la molécula expresada.

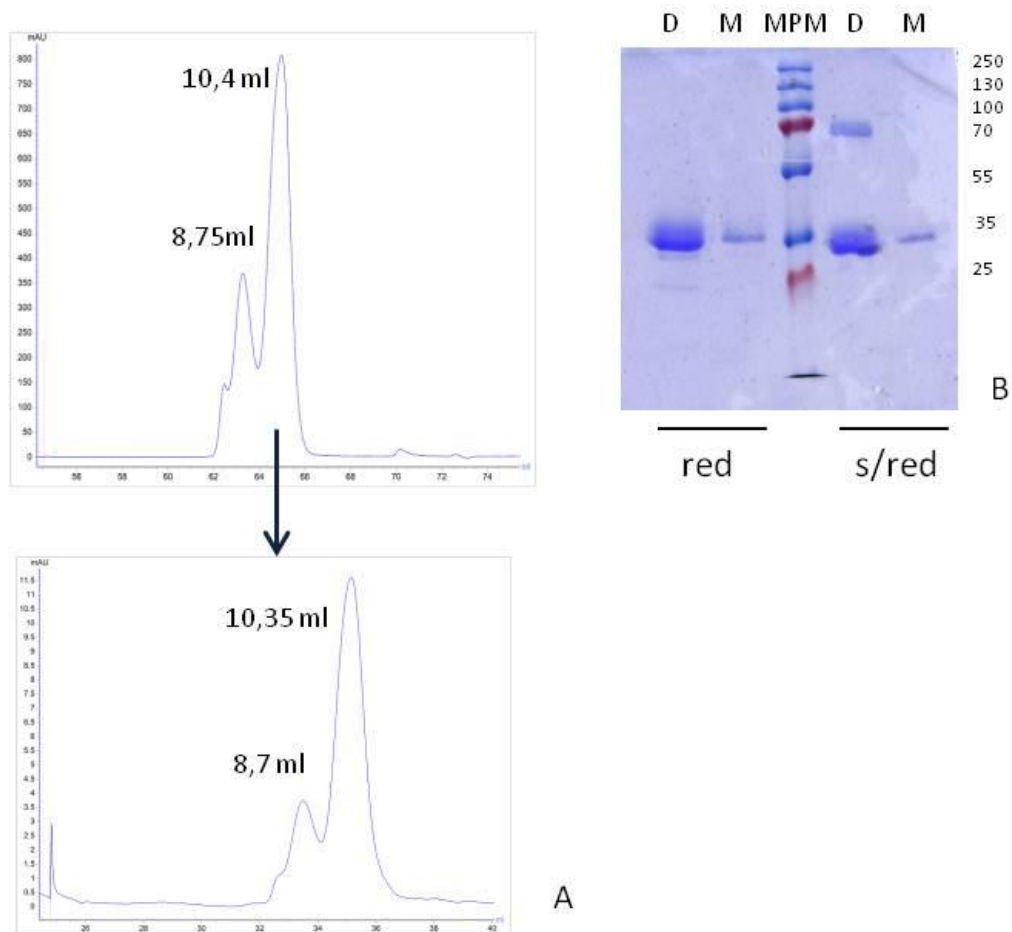


Figura 26 A. Gel filtración de fracción monomérica DbTn en columna Superdex S75 10/300 El pico correspondiente a 10,4 ml fue reinjectado en la columna generando el cromatograma inferior. B. SDS-PAGE de fracciones correspondientes a monómero (M) y dímero (D) en condiciones reductoras (red) y no reductoras (s/red).

ELISA

El reconocimiento del Diabody al antígeno Tn se evaluó mediante ELISA indirecto utilizando la mucina aOSM como fuente de antígeno Tn. En un primer formato, se inmovilizó la mucina aOSM en placas de 96 pocillos, luego del bloqueo de los sitios inespecíficos, se evaluó el reconocimiento de distintas diluciones del Diabody Tn en su formato dimérico o monomérico. La detección de la unión antígeno-diabody se realizó con anticuerpo murino anti-myc y en un paso posterior con un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa. Como control positivo se utilizaron el anticuerpo 83D4 o el Chi-Tn. En la figura 27A se muestra que en ninguna de las condiciones evaluadas se observó la interacción de DbTn a aOSM, mientras que controles utilizando el anticuerpo Chi-Tn y de la unión diabody-myc fueron positivos. Se evaluó un segundo formato de ELISA en el cual se inmovilizó el Diabody tanto las fracciones dimérica como monomérica, así como el control Chi-Tn a placas de 96 pocillos, para luego ser incubados con el antígeno Tn (aOSM). La interacción Diabody-aOSM se evidencia luego mediante un segundo anticuerpo anti-Tn (83D4) y su posterior interacción con un anticuerpo anti-ratón peroxidasa. Los controles en este ELISA consistieron en pocillos sensibilizados con Chi-Tn y pocillos con las muestras a los que no se les incorporó aOSM o AcMo 83D4.

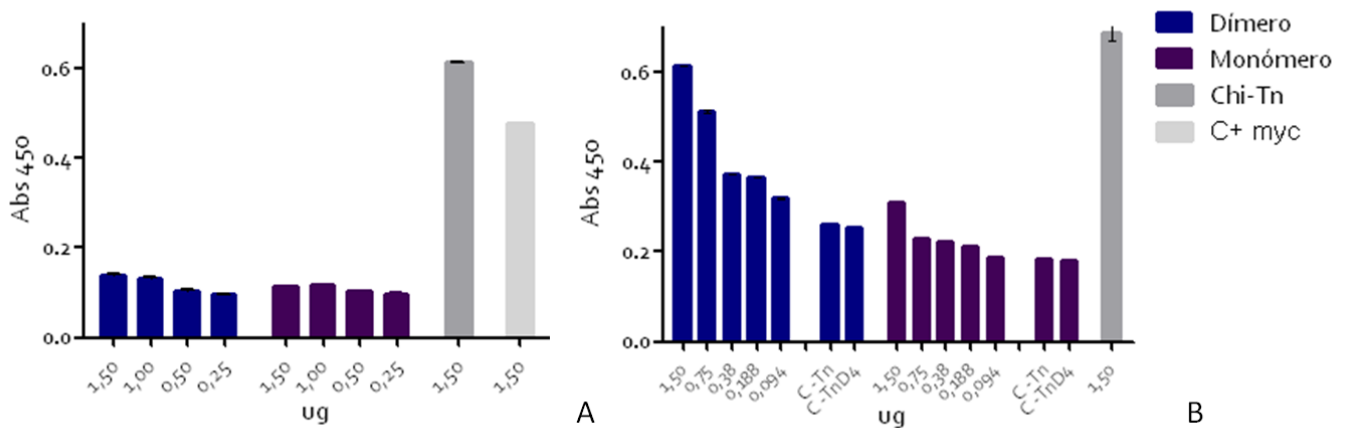


Figura 27 Evaluación del reconocimiento del Diabody Tn por ELISA. **A.** ELISA indirecto en el cual se sensibilizó con aOSM. **B.** ELISA tipo sandwich en el cual se sensibilizó con las distintas construcciones. C-Tn corresponde a pocillos en los que no se les agregó aOSM C- TnD4 corresponde a pocillos sin AcMo 83D4

Como se muestra en la figura 27B, en este formato de ELISA se obtuvo una señal positiva para el Diabody dimérico que disminuye al realizar diluciones seriadas. Por su parte, la fracción monomérica se comporta de forma análoga pero con una menor intensidad. A modo de ejemplo solamente a la concentración de 1,5 µg por pocillo es superior a la intensidad de los controles negativos. Si bien la absorbancia de los controles negativos fue mayor al formato inicial de ELISA, la absorbancia del Diabody dimérico a 1,5 y 1 µg es significativamente diferente a los controles (test de Student $p < 0,05$)

Resonancia plasmónica de superficie (SPR)

Los ensayos de ELISA realizados indicaron que el Diabody en su conformación dimérica reconoce el antígeno Tn en un contexto en el cual varias moléculas deberían interactuar con el antígeno para mantener la interacción y de esa forma ser detectada. Estos ensayos son indirectos, dependiendo de la interacción de otros anticuerpos para evidenciar esta interacción. En SPR o Biacore por su parte, la señal que se detecta corresponde a la interacción antígeno-anticuerpo de forma directa. Para este ensayo se generó un chip donde se inmovilizó un péptido biotinilado tri-Tn así como el correspondiente sin glicosilar como control negativo correspondiente a la celda de referencia.

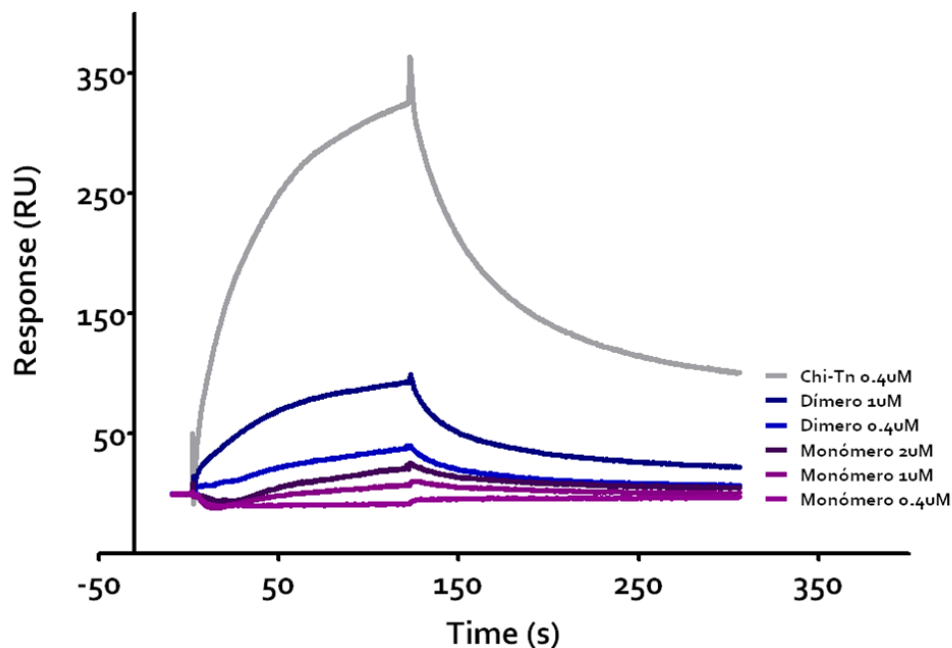


Figura 28. Perfiles de asociación y disociación de Diabody Tn. Se grafican unidades relativas en función del tiempo (segundos) de las muestras analizadas Chi-Tn (gris) dímero (azul) y monómero (violeta).

Las muestras analizadas fueron el anticuerpo Chi-Tn, y el Diabody en su conformación dimérica y monomérica diluidas a una concentración 0,4, 1 y 2 μM , las que fueron inyectadas en el equipo de Biacore. En la figura 28 se muestra el perfil de asociación y disociación obtenido de las distintas muestras. En primer lugar debe tenerse en cuenta que la intensidad de unidades relativas es proporcional al tamaño de la molécula. Adicionalmente, las curvas mostradas corresponden a la resta de los valores de intensidad de la celda conteniendo el glicopéptido Tn respecto a la celda control conteniendo el glicopéptido sin glicosilar. Por otra parte, el análisis realizado es cualitativo y no cuantitativo, en base a la observación de la existencia de un equilibrio entre la fracción dimérica y monomérica, no pudiendo definir si las moléculas interaccionan con uno o dos sitios, parámetro fundamental para determinar constantes de asociación/disociación o afinidad. Para la muestra del Diabody, a medida que aumenta la concentración comienza a aumentar la interacción con el glicopéptido de forma específica, si bien también la disociación es rápida, siendo la señal a los 3 minutos (180 segundos) casi basal. En cuanto a la fracción monomérica, si bien el tamaño molecular es la mitad que el dímero y cinco veces menor que el anticuerpo quimérico, no se observa el mismo patrón incluso si se compara al doble de la concentración del dímero (2 μM vs 1 μM). Estos resultados si bien cualitativos, están en la línea de lo observado por ELISA, en la cual podemos afirmar que el Diabody Tn reconoce al antígeno pero se disocia rápidamente, lo que explicaría la ausencia de señal en los ensayos descritos anteriormente. Adicionalmente se observa que el monómero reconoce en menor medida al antígeno Tn, lo cual es coherente a la base teórica

en la cual el monómero solamente podría interaccionar con su dominio VH. El Diabody interacciona entonces con el antígeno Tn con una señal a priori mayor, con una rápida disociación, lo que explicaría la ausencia de señal en el ELISA cuando se sensibiliza con aOSM.

Inmunofluorescencia indirecta

El reconocimiento del antígeno Tn por el Diabody en el contexto celular, se evaluó mediante Inmunofluorescencia indirecta utilizando células MCF-7 las cuales ya ha sido reportado expresan dicho antígeno.

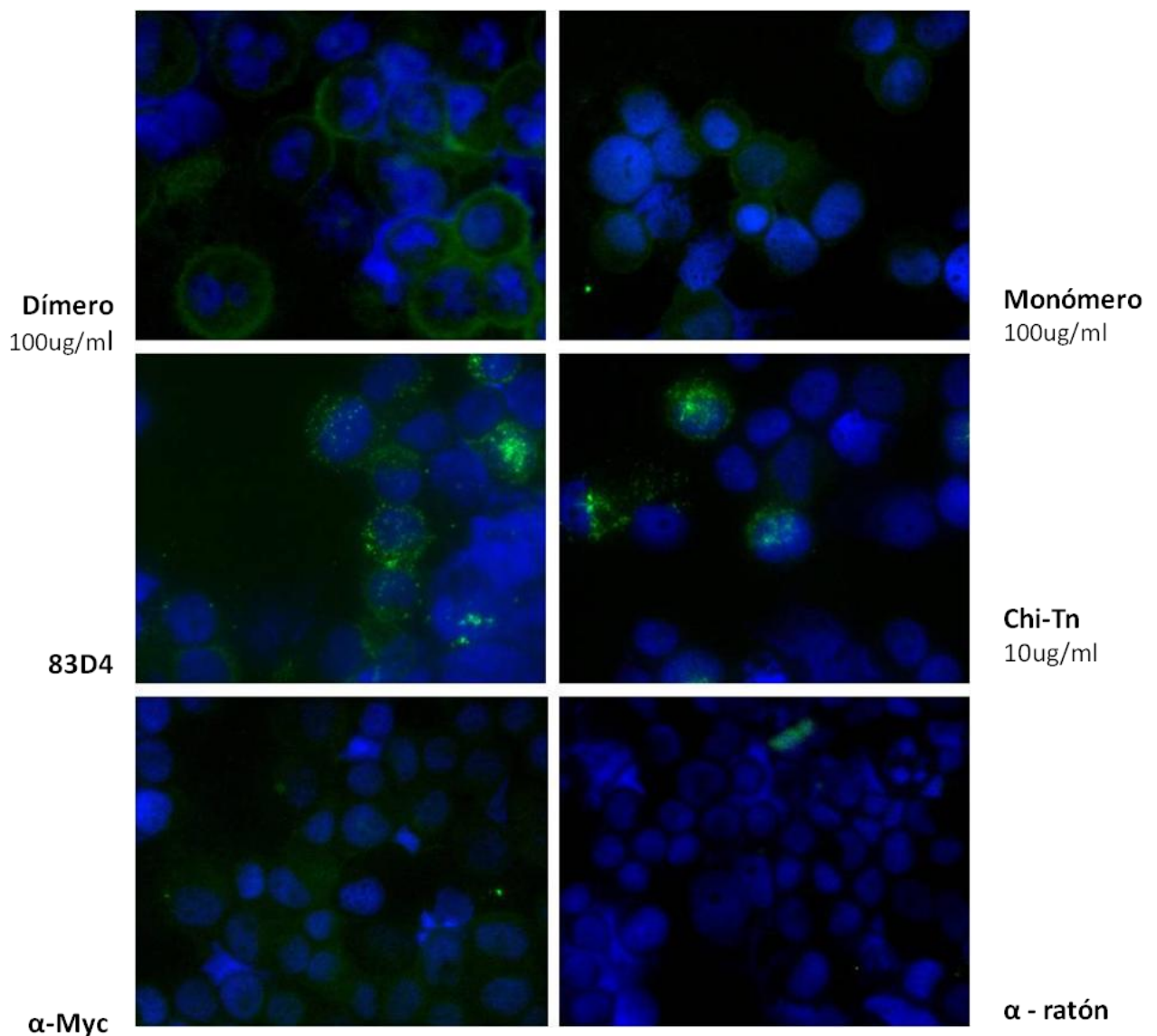


Figura 29 Inmunofluorescencia indirecta de células MCF-7. Se observan imágenes obtenidas a 40X utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC (verde), los núcleos están marcados con DAPI (azul).

Se muestra en la figura 29 las imágenes obtenidas a un aumento 40X en todos los casos. Los controles utilizados fueron 83D4 y Chi-Tn. Como se observa en A y B, tanto el dímero como el monómero generaron una señal difusa citoplasmática, la cual es similar a la señal del control del anticuerpo anti-myc utilizado. Si bien la intensidad a la misma exposición para el dímero es mayor a la del monómero y del control myc, el patrón observado es distinto al de los anticuerpos completos, donde el marcado es puntiforme. Se evaluaron distintas diluciones de ambas construcciones y del anticuerpo c-myc para descartar una señal inespecífica, pero no se obtuvo en ningún caso un marcado similar a los controles positivos. A partir de éstos resultados no podemos definir si hay o no reconocimiento puesto que no podemos indicar si no logramos detectarlo (al igual que en ELISA) o no se da en estas condiciones experimentales.

Discusión

Los antígenos asociados a tumor expresados en la superficie de células tumorales constituyen un excelente blanco para desarrollar estrategias terapéuticas y diagnósticas. En los últimos años varios anticuerpos monoclonales dirigidos a dichos antígenos han sido aprobados para inmunoterapia del cáncer. En la misma línea anticuerpos monoclonales y una alta gama de fragmentos generados por ingeniería genética a partir de éstos pueden utilizarse para diagnóstico en técnicas imagenológicas como inmunoPET y SPECT. En este sentido, el antígeno Tn representa un blanco interesante, constituyendo un marcador sensible y específico para la detección preclínica de carcinomas así como un potencial blanco terapéutico (Kudelka et al. 2015). Varios anticuerpos monoclonales han sido reportados contra este antígeno, siendo el anticuerpo monoclonal 83D4 un anticuerpo ampliamente caracterizado en su reconocimiento a Tn y de tejido tumoral respecto a tejido normal (Charpin et al. 1992; Babino et al. 2000). A partir de este anticuerpo monoclonal IgM murino, ha sido desarrollado un anticuerpo quimérico Chi-Tn con fines terapéuticos y evaluado en ensayos preclínicos (Hubert et al. 2011) y un scFv-83D4 con fines estructurales (Babino et al. 1997).

Este trabajo buscó generar nuevas moléculas con reconocimiento a Tn a partir del anticuerpo 83D4 que se adecúen a su uso diagnóstico en técnicas imagenológicas como inmunoPET o SPECT. En ese sentido, los Diabodies compuestos por un dímero de scFvs de 55kDa muestran tener una buena relación entre especificidad, avidéz, tamaño molecular, penetrancia, retención tumoral y clearance sanguíneo, para su uso con este fin (Holliger & Hudson 2005; Knowles & Wu 2012).

Construcción de Diabodies anti antígeno Tn.

Existe consenso en el diseño de moléculas de Diabodies a partir de las secuencias génicas de inmunoglobulinas o scFvs, donde la formación de dímeros de scFv está basada en la longitud del linker que une las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas (Holliger et al. 1993; Holliger & Hudson 2005). Se generó la construcción génica Diabody Tn considerando las longitudes de los linkers y el orden VH-VL el cual se denominó DbTn. De forma adicional, se generó una molécula denominada Diabody Tn en tándem DbTnT, descrita generalmente para diabodies biespecíficos (Kipriyanov et al. 1999) donde los cuatro dominios variables (VH1-VL1-VH2-VL2) se codifican en una única cadena, buscando de esta forma aumentar la estabilidad de la molécula al no tener que formarse un homodímero. Sin embargo, como se detallará más adelante, esta construcción no presentó ventajas respecto al DbTn tanto en su expresión en sistemas procariotas, donde presentó menor nivel de expresión a nivel citoplasmático y no fue posible evidenciar su expresión a nivel

periplásmico mientras que en el sistema eucariota la expresión a nivel de sobrenadante de cultivo fue mínima en las condiciones evaluadas (figura 24).

En ambos casos se incorporaron cisteínas en posiciones conservadas y descritas en la bibliografía para aumentar la estabilidad de ambas moléculas con el fin de generar enlaces disulfuro intercatenarios en el caso del DbTn e intracatenario para Db TnT (FitzGerald et al. 1997; Sagawa et al. 2011; Reiter, et al 1996). El efecto en la estabilidad de esta modificación no pudo ser evaluada debido a que no se trabajó con las secuencias sin modificar.

Adicionalmente, las secuencias generadas fueron modificadas para optimizar los codones en los sistemas utilizados (*E. coli* y *Drosophila*). En la mayoría de los genomas secuenciados, los codones sinónimos no son usados en igual frecuencia. En bacterias la abundancia de tARNs y el uso de codones ha co-evolucionado y se hace evidente en proteínas con alto nivel de expresión con funciones celulares esenciales. Relaciones similares entre el uso de codones y la abundancia de ARNts ha sido observado en algunos eucariotas como *C. elegans* y *D. melanogaster* pero no es tan clara en otros (Angov 2011). Se ha indicado que el uso de codones de baja frecuencia dentro de un gen puede regular la tasa de síntesis proteica y permitir la formación en la cadena naciente de estructuras secundarias o terciarias, y por tanto influyen en el correcto plegamiento de las mismas (Marin 2008). Por tanto, el uso de codones debe ser tenido en cuenta para potenciar la expresión en sistemas heterólogos, pero también debe considerarse que la presencia de codones raros está ligado no solo a la síntesis proteica sino al correcto plegamiento. En este trabajo la optimización de codones lo efectuó GenScript utilizando un algoritmo denominado OptimumGene y según se indica, la optimización de las secuencias considera las características del mensajero así como el uso de codones del organismo y los sitios de pausas en la traducción para el correcto plegamiento. Sin embargo al no ser un software libre, no es posible acceder a la información precisa del algoritmo ni la base de datos que utiliza para dicho cálculo. Si se comparan las secuencias de DbTn generadas a partir del anticuerpo 83D4 murino, las secuencias optimizada para su expresión en *E. coli* se modificó en un 51% de los codones mientras que en *Drosophila* fue un 68%. La implicancia real en la expresión génica de la optimización de codones debe evaluarse por comparación en el rendimiento proteico de las construcciones con y sin optimización, estudio que no se abordó en este trabajo de Tesis.

Sistemas de expresión

Fragmentos de anticuerpos recombinantes han sido producidos con éxito en varios sistemas de expresión como bacterias (Holliger et al. 1993; Pastan et al. 2006), mamíferos (Kimura et al. 2004; Kim et al. 2008), insectos (Reavy et al. 2000; Gilmartin et al. 2012), levaduras (Kogelberg et al. 2013; Gasser & Mattanovich 2007), plantas (Vaquero et al. 2002) entre otros. La producción de un fragmento de un anticuerpo particular debe ser optimizada caso a caso dado que cada anticuerpo a pesar de mantener la estructura básica de inmunoglobulina tiene una fuerte dependencia de la secuencia aminoacídica. Por tanto, el sistema óptimo de expresión dependerá del tipo de molécula a ser expresado (IgG, Fab, scFv, Diabody), la secuencia particular del anticuerpo y otros factores como la cantidad y pureza requerida del producto final (Verma et al. 1998).

Expresión en *E. coli*

La expresión de proteínas en *E. coli* presenta varias ventajas como la rapidez, el bajo costo, facilidad de manipulación y escalabilidad. Sin embargo, también presenta desventajas o problemas como la imposibilidad de incorporar modificaciones post-traduccionales como la glicosilación, la de expresar proteínas de mamífero completas o proteínas de membrana (Katsuda et al. 2012). De hecho, de las proteínas reportadas en la base de datos PDB un 88% de las estructuras fueron desarrolladas en *E. coli* sin embargo, de las proteínas utilizadas en farmacéutica solamente un 30% se producen en este sistema respecto a sistemas eucariotas, ilustrando las limitaciones de esta estrategia (Ferrer-Miralles et al. 2015).

La producción heteróloga de inmunoglobulinas implica un desafío dada la estrecha relación entre conformación y función. El dominio inmunoglobulina particularmente contiene como se mencionó anteriormente un enlace disulfuro conservado y en este trabajo además los incorporados para agregar estabilidad. Está reportado que la sobreexpresión de fragmentos de anticuerpos como scFv generalmente forman agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión (Katsuda et al. 2012). Experiencias previas en la expresión de fragmentos scFv de 83D4 en nuestro grupo de trabajo mostró que los dominios variables de este anticuerpo monoclonal son particularmente insolubles debido al alto grado de aminoácidos hidrofóbicos (Babino et al. 1997).

Varias estrategias han sido desarrolladas con el fin de optimizar la expresión de proteínas con enlaces disulfuro a nivel citoplasmático en procariontes. En el presente trabajo se evaluaron varias condiciones para optimizar la producción de proteínas solubles a nivel citoplasmático conteniendo enlaces disulfuro. En primer lugar se evaluó la expresión en la cepa Shuffle que expresa de forma constitutiva DsbC, así como la pre-expresión de las chaperonas DsbC y PD1 ó DsbC y Erv1p en cepas BL21 DE3. En todos los casos se observó un perfil similar, en el cual hay expresión de

proteína recombinante pero que no está presente en la fracción soluble, sino como agregados insolubles (Figura 17).

Otro de los parámetros que el sistema procariota permite modificar es la temperatura a la que se induce y se da la expresión. La disminución en la temperatura genera una síntesis proteica más lenta, reduce las interacciones hidrofóbicas que pueden generar agregados insolubles y un mayor acceso de las proteínas recién sintetizadas a la maquinaria de chaperonas moleculares lo que puede potenciar la producción de proteínas solubles y funcionales a expensas de reducir los rendimientos (Ferrer-Miralles et al. 2015). En este trabajo se evidenció que la disminución de la temperatura produjo un incremento en la producción de proteínas purificadas a partir de la fracción soluble. Las mismas fueron identificadas por espectrometría de masa confirmando así su identidad.

Otra variable que mejoró el rendimiento de proteína soluble fue el medio de cultivo utilizado, al pasar de LB a 2YT aumentando el peso seco producido y la proporción de proteína soluble.

De esta parte se puede concluir que de las condiciones evaluadas, el uso de la pre-expresión de chaperonas (DsbC y/o PDI o Erv1p) en conjunto con la reducción de la temperatura y un medio de cultivo rico llevaron a producir DbTn en forma soluble a nivel citoplasmático en *E. coli*.

El rendimiento en este sistema no pudo ser determinado al no llegarse a un nivel de pureza suficiente. En relación a este aspecto, cabe destacar que es posible optimizar la purificación para obtener fracciones de proteína pura. Sería interesante la evaluación de un segundo paso de purificación luego de la IMAC para eliminar las impurezas observadas por SDS-PAGE. En ese sentido, una posibilidad es usar la afinidad del DbTn por el antígeno Tn en su forma aOSM para su purificación. Otras posibilidades podrían incluir escalado del cultivo e intercambio iónico o gel filtración purificando únicamente la fracción correspondiente al dímero. Otra característica que no se evaluó en esta instancia es el grado de oligomerización del DbTn, relacionado también a que no se logró generar una fracción pura de proteína soluble.

Si bien hay varias referencias que reportan la expresión de Diabodies o scFv a nivel de citoplasma de forma soluble, la gran mayoría produce la formación de agregados insolubles, lo que se debe en parte al dominio inmunoglobulina y por otra a la secuencia particular del anticuerpo del que se trata. En este trabajo se evidenció una alta producción de proteína formando cuerpos de inclusión, por lo que se evaluaron diferentes métodos para recuperar proteína soluble funcional a partir de ellos.

Expresión en cuerpos de inclusión

Dado que los cuerpos de inclusión son relativamente puros y contienen proteínas recombinantes intactas, varias estrategias han sido reportadas para recuperar proteínas activas a partir de estos agregados (Yamaguchi & Miyazaki 2014). Generalmente, los cuerpos de inclusión se disuelven en

una alta concentración de un desnaturalizante como Urea, Guanidinio-HCl (Gdn-HCl) o detergentes iónicos, los que se utilizan para disminuir las interacciones no covalentes entre proteínas y agentes reductores como DTT para reducir enlaces disulfuro inter o intra moleculares. El plegamiento o refolding a partir de estas proteínas ocurre por remoción del agente desnaturalizante y generando las condiciones que permitan la interacción intramolecular para colaborar en el correcto plegado proteico (Jungbauer & Kaar 2007). La formación de enlaces disulfuro requiere un par de grupos tiol facilitados por el glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH), mientras que algunos protocolos sugieren solamente la utilización de GSSG, otros utilizan diferentes proporciones del par siendo una variable a ajustar dependiendo de la proteína, como lo son la temperatura, el tiempo de refolding, la concentración y el pH (Correa & Opezzo 2015).

La formación de cuerpos de inclusión se efectuó con la construcción DbTn expresando la proteína a 37°C sin expresión de chaperonas para enlaces disulfuro, evaluándose tres métodos diferentes: dilución, diálisis sucesivas y refolding en columna. En primer lugar se evaluó la resolubilización por dilución, donde pequeñas cantidades la proteína desnaturalizada se diluyen en buffer de refolding. De esta forma se reducen las interacciones entre proteínas, las que al llegar a su conformación nativa dejan de interactuar entre ellas (Singh et al. 2015). Este método ha sido descrito para la resolubilización de inmunotoxinas de tipo scFv-PE, en el cual dos cadenas una codificando VL-PE y otra correspondiente a VH se expresan de forma separada en cuerpos de inclusión los que se agregan en cantidades iguales y se pliegan por dilución en forma conjunta para luego ser purificados y caracterizados (Pastan et al. 2007; Niv et al. 2000). La resolubilización por dilución de Diabody Tn generó dos especies que eluyen en columnas de gel filtración con tamaños correspondientes a dímero y monómero, siendo la fracción mayoritaria el monómero. En relación al par redox utilizado, el que generó mayor cantidad de proteína soluble en forma dimérica fue GSSG/GSH 1:5 (figura 21). Si se considera que se parte de 10 mg de proteína y el rendimiento de DbTn dimérico es de 300 µg, se recuperaría por este proceso un 3% del material de partida, aunque no hay que perder de vista que el rendimiento global es mayor puesto que no se está considerando la fracción mayoritaria monomérica.

Por otra parte, en el método de diálisis sucesivas, el agente desnaturalizante se elimina de forma gradual en presencia de una concentración constante de L-Arginina que evita la agregación e incluye el par redox en el paso de reducción de Gdn-HCl de 1 M a 0,5 M. Este método fue utilizado por Yuasa et al para la resolubilización de un scFv anti-Tn, a partir del anticuerpo MLS128 el cual como se mencionó anteriormente presenta en su región VH una homología de secuencia con 83D4 del 95% (Yuasa et al. 2012). Más aún, en el trabajo de Ortega et al., 2013 se evaluó el refolding de un Diabody contra el receptor de la hormona antimulleriana comparando el rendimiento de

proteína soluble obtenida entre 13 condiciones variando el momento de agregado del agente reductor y del par redox entre los 5 pasos de diálisis. La mejor de estas condiciones fue la utilizada para evaluar el refolding de DbTn (descrita en detalle en materiales y métodos). Con este método la resolubilización mostró un perfil similar al de refolding por dilución donde se observan dos fracciones, una monomérica y otra dimérica. Sin embargo, la fracción dimérica presentó una proporción menor que en el método anterior siendo aproximadamente de 100 µg/L de medio.

Finalmente, se evaluó un método que presenta como ventaja que el refolding y la purificación se dan en el mismo paso. En éste, las proteínas son inmovilizadas en columna (en este caso de IMAC) y el agente desnaturalizante se elimina mediante un gradiente lento en el cual se incorpora el buffer de renaturalización. Una vez equilibrado en este buffer, se eluyen las proteínas obteniendo así una fracción concentrada y pura de proteína soluble. En este método la mayor parte de la proteína producida precipitó al eluir de la columna y la fracción soluble recuperada fue menor a los dos métodos anteriores incluso antes de evaluar el grado de dimerización, por lo que no se analizó en detalle. Si bien se utilizó el mismo buffer de refolding el bajo rendimiento podría explicarse en parte considerando que los soportes sólidos pueden limitar la flexibilidad para el plegamiento aún si la unión es en un único sitio y podrá darse mientras el tag de histidina no interfiera en la formación de la configuración nativa (Jungbauer et al. 2004).

En suma, se logró re solubilizar a partir de cuerpos de inclusión el DbTn obteniendo 300 µg/L de proteína pura en el mejor de los casos. Un análisis más detallado del correcto plegamiento del dominio inmunoglobulina podría ser realizado mediante análisis por dicroísmo circular, donde los espectros brindan información de la estructura secundaria. En el trabajo de Yuasa et al, luego del refolding de un scFv anti- antígeno T esta estrategia fue empleada donde la presencia de un pico negativo a 217nm indica la presencia de hojas β, consistente con el plegamiento inmunoglobulina (Yuasa et al. 2013a).

Expresión en Periplasma

La expresión de Diabodies en el espacio periplásmico está ampliamente descrito por tratarse del compartimento no reductor de *E. coli* donde se encuentran la maquinaria de chaperonas involucradas en la síntesis e isomerización de enlaces disulfuro. (Berkmen 2012). Más aún presenta la ventaja que la purificación de proteínas es más simple que de lisados celulares totales y las proteínas pueden ser direccionadas a este espacio mediante el agregado de señales como pelB u ompA. Sin embargo, una de las principales desventajas de este sistema radica en que la maquinaria de translocación puede ser saturada, disminuyendo el rendimiento total de la proteína de interés (Correa & Oppezzo 2015). Un trabajo previo de nuestro grupo describió la expresión de un scFv-MBP en periplasma utilizando el vector pIMa16 clivando luego la proteína de fusión MBP

por incubación con el factor Xa y verificando el reconocimiento a Tn por ELISA (Babino et al. 1997). De forma análoga se clonó el gen de DbTnT en el plásmido de expresión periplásmica pMALp2 el cual también genera una proteína de fusión DbTn-MBP. Se expresó y purificó una proteína correspondiente al peso molecular de DbTn-MBP, mientras que no fue posible detectar expresión génica para la construcción correspondiente TnT por SDS page o Western Blot. Si bien el rendimiento de la purificación proteica a partir de la fracción periplásmica fue de 1 mg/L de medio de cultivo, no se logró clivar el DbTn mediante digestión con la proteína enteroquinasa. MBP es una proteína de fusión que se utiliza para la solubilización de la proteína a la que se fusiona y es posible que la expresión conjunta de DbTn-MBP potencie su solubilidad en las condiciones evaluadas y al ser clivado, parte del DbTn precipite. Se podrían evaluar otros plásmidos de expresión periplásmica como pET22b que no generan proteína de fusión. Puesto que una de las propiedades que hacen interesante el uso de los Diabodies con fines diagnósticos es su tamaño molecular, la fusión MBP-DbTn tendría un tamaño en su forma dimérica del orden de una IgG y no sería útil para dicho fin.

Expresión en células de *Drosophila*.

Las células de *Drosophila* Schneider (S2) pueden ser transfectadas de forma sencilla para generar líneas estables de expresión proteica. Estas células pueden crecer a altas densidades, sin necesidad de CO₂ y se adaptan a medio libre de suero lo que simplifica el manejo y purificación de las proteínas recombinantes (Moraes et al. 2012). La presencia de la maquinaria de plegamiento que promueve la correcta formación de enlaces disulfuro en el retículo endoplasmático hace interesante su uso para la expresión de moléculas de tipo inmunoglobulina y ha sido utilizada de forma satisfactoria para la producción y secreción de grandes cantidades de varios fragmentos de anticuerpos como Fab o scFv (Backovic et al. 2010; Gilmartin et al. 2012; Yuasa et al. 2013).

Se clonaron las construcciones optimizadas en el vector pT350 el cual cuenta con un promotor inducible por metales pesados (pMT), una señal de exportación (BiP) así como un doble Strep tag para la purificación por afinidad de las construcciones secretadas (Backovic et al. 2010).

Líneas estables S2 transformadas y adaptadas al crecimiento sin suero fueron utilizadas para la expresión del DbTn. Particularmente, la construcción DbTn TnT mostró niveles bajos de expresión en inducción con cadmio mientras que con cobre no se observó expresión (Figura 24). Sería interesante incluir otras condiciones como aumentar el tiempo del cultivo o modificar la concentración de inductores para optimizar la expresión. Se trabajó entonces con la construcción DbTn y las proteínas generadas fueron purificadas por afinidad en columnas strep-tag y el grado de oligomerización fue evaluado por gel filtración. De forma análoga a los resultados de refolding de cuerpos de inclusión, se obtuvieron dos fracciones correspondientes al DbTn monomérico y dimérico. Sin embargo, en este caso la proporción de ambos fue variable, para algunos

sobrenadantes se obtuvo mayormente dímero y otros monómero (Figuras 25 y 26). Uno de los factores que puede estar afectando esta proporción es la conservación del sobrenadante hasta su purificación. Se observó que sobrenadantes mantenidos a 4°C durante más de 4-5 días mostraron una menor proporción de dímero respecto a aquellas que fueron almacenadas a -20°C, lo que podría estar dando una idea de la estabilidad de la molécula en estas condiciones. De todas formas el rendimiento promedio de la fracción dimérica por litro de medio de cultivo fue de 4mg/L, un orden superior al obtenido en *E. coli*. Este rendimiento es consistente con reportes de scFvs producidos en este sistema (Gilmartin et al. 2012). Una estrategia interesante para aumentar el rendimiento de DbTn dimérico utilizando la optimización del refolding para DbTn sería purificar la fracción monomérica, desnaturalizarla y renaturalizarla. Un trabajo publicado por Gilmartin utiliza este procedimiento para mejorar el rendimiento de producción de scFvs, donde la aparición de picos correspondientes a dímero son desnaturalizados y resolubilizados para aumentar la proporción de scFvs monoméricos, por diálisis sucesivas. Interesantemente, en este mismo trabajo, se compara la expresión de diferentes scFv expresados bajo las mismas condiciones y se describe que la proporción monómero/dímero/oligómero es variable según el scFv demostrando así la implicancia de la secuencia particular de cada inmunoglobulina en su comportamiento (Gilmartin et al. 2012).

En la tabla 5 se comparan los métodos de expresión proteica en función del rendimiento de Diabody dimérico, el tiempo y el grado de pureza. Como se mencionó anteriormente cada método presenta ventajas y desventajas en relación al tiempo, complejidad, escalabilidad y costos. En nuestro caso, si bien la expresión en *Drosophila* requiere mayores tiempos para la obtención de líneas de producción estable y para generar cultivo de la densidad celular necesaria, es el método que presenta mejor rendimiento de proteína pura por litro de cultivo y es la que se utilizó para la caracterización del DbTn.

Caracterización de Diabody Tn.

A partir de la observación de que tanto el Diabody Tn expresado en *E. coli* en cuerpos de inclusión como en *Drosophila* presentan dos estados de oligomerización, se evaluó si los dímeros presentan enlaces disulfuro incorporados a la secuencia. Como se observó en la figura 26 solamente una fracción de éstos migra en condiciones no reductoras como dímero, indicando que parte de esta fracción interacciona de forma no covalente. Por su parte, la fracción monomérica al ser reinyectada en una columna de gel filtración vuelve a presentar dos picos, demostrando que parte de la proteína expresada se encuentra en un equilibrio. Para determinar las cisteínas que están formando enlaces disulfuro, se podría analizar por espectrometría de masa ambas fracciones

tratando a las cisteínas con agentes alquilantes de grupos tiol libres como Iodoacetamida en condiciones reductoras y no reductoras. Este resultado nos indica que si bien se generaron Diabodies diméricos unidos de forma covalente, hay una proporción que se encuentra en equilibrio entre dímero y monómero. La estabilidad de las proteínas en condiciones fisiológicas es un parámetro importante para su utilidad *in vivo*, por lo que el uso de la proteína expresada requiere de optimización en su estabilidad. Para mejorar este aspecto una alternativa podría ser la modificación en la construcción génica, mediante mutaciones puntuales para evaluar la incorporación de enlaces disulfuro en otras posiciones. A modo de ejemplo, los fragmentos de anticuerpo biespecíficos denominados DART, presentan dominios de heterodimerización C-terminal mediante la co-expresión de la secuencia VEPKSC en una cadena y FNRGEC en la otra formándose un enlace disulfuro en la cisteína terminal (Moore et al. 2011).

El reconocimiento del Diabody Tn al antígeno se evaluó por ELISA y Biacore. Los resultados obtenidos por ELISA utilizando como fuente de Tn a la aOSM mostraron en primer lugar que no es posible detectar reconocimiento en el formato evaluado (Tn/Diabody/anti-myc/anti-ratón HRP). Los mismos resultados se observaron utilizando un anticuerpo anti-His6 con las fracciones generadas en *E. coli*. Sin embargo, cuando se evalúa en un sistema de ELISA de captura, donde se inmoviliza el Diabody y por tanto permitiendo que varios Diabodies interaccionen con una molécula de aOSM, es posible evidenciar reconocimiento específico. De forma consistente, el dímero mostró una señal mayor que el monómero. De hecho, el reconocimiento del monómero (que no presenta un dominio VH-VL dada la longitud del linker) podría interaccionar con el antígeno a través de la región VH la que se determinó en estudios de modelado estructural sería el principal dominio de unión al antígeno (Babino et al. 1997). Estos resultados nos permiten hipotetizar que el Diabody Tn presenta una baja afinidad por el antígeno, donde varias moléculas tendrían que interaccionar de forma cooperativa para poder retener la molécula de aOSM y así generar una señal detectable por ELISA. Mediante Biacore utilizando como fuente de antígeno Tn glicopéptidos sintéticos, se observó que si bien hay reconocimiento específico, la interacción presenta una rápida disociación y por tanto se podría concluir que el Diabody Tn reconoce de forma específica a su antígeno, pero lo hace con baja afinidad dada por una alta constante de disociación. Las características del sistema donde no es posible determinar si la interacción del Diabody dimérico es con uno o dos dominios y sumado al equilibrio entre dímero y monómero, hace complejo el cálculo de constantes de asociación y disociación y por tanto de afinidad por lo que el análisis presentado es meramente cualitativo. La unión específica entre Diabody y antígeno podría ser evaluada adicionalmente por gel filtración, permitiendo la interacción entre el Diabody y los glicopéptidos utilizados en el ensayo de BiaCore. De esta forma, de existir interacción debería

observarse un desplazamiento de los picos. Esta estrategia fue utilizada como método de caracterización funcional de Fabs expresados en *Drosophila* (Backovic et al. 2010).

El uso de Diabodies en diagnóstico para imagenología se basa en la capacidad de reconocimiento específico de células tumorales respecto a tejido normal. La evaluación del reconocimiento en un contexto celular se realizó utilizando células MCF-7 sobre las cuales está descrito el reconocimiento tanto del 83D4 como el anticuerpo Chi-Tn (Osinaga et al. 1994; Oppezzo et al. 2000). El sistema de detección fue análogo al ELISA utilizando un anticuerpo anti-myc. Si bien se observó marcado difuso, de mayor intensidad que los controles el mismo no corresponde al marcado puntiforme de los controles positivos del 83D4 y Chi-Tn a la misma concentración (Figura 29). Considerando los resultados de ELISA y BiaCore, no podemos determinar si no hay interacción a nivel celular o la misma se da con una rápida disociación sin poder ser detectada por este método. Por otra parte, se ha reportado otras células que expresan una densidad mayor de antígeno Tn a nivel celular como las células Jurkat o TA3Ha, las que podrían utilizarse de forma alternativa a MCF-7. Finalmente cabe destacar que se ha descrito que las células MCF-7 expresan c-Myc (Liu et al. 2012), lo que podría explicar el marcado difuso que se observa en el control negativo. Por lo expuesto anteriormente, no es posible determinar en el ensayo descrito si el Diabody reconoce al antígeno Tn en el contexto celular.

Como perspectiva, sería posible en colaboración con el CUDIM radiomarcarse el Diabody con un radioisótopo de vida corta como por ejemplo ^{68}Ga o ^{18}F . Por una parte se evaluaría la estabilidad de la fracción dimérica al marcado y por otro, permitiría generar otro método directo de detección del reconocimiento del Diabody al antígeno más cercano al método imagenológico.

De los ensayos realizados de caracterización podemos concluir que el Diabody expresado mantiene el reconocimiento por el antígeno Tn, pero lo hace con una alta constante de disociación y en definitiva una menor afinidad. Cabe destacar, que el anticuerpo quimérico Chi-Tn presenta respecto al anticuerpo parental una reducción en la afinidad, poniendo de manifiesto la estrecha relación entre estructura y función (Oppezzo et al. 2000).

Visto que la estructura del fragmento del anticuerpo anti-Tn estaría influyendo en la afinidad, por un lado se podría evaluar generar diabodies más estables como se discutió anteriormente. Por otro lado, se podrían generar otras moléculas que compartan las características del Diabody en cuanto a tamaño y biodistribución y se asemejen a la inmunoglobulina de partida IgG. En ese sentido los minibodies, compuestos por un homodímero de cadenas VH-VL-visagra-CH₁, corresponden a fragmentos de anticuerpos de 80 kDa con una conformación similar al anticuerpo IgG. Los minibodies pueden ser marcados y utilizados en imagenología pudiendo tomarse imágenes de buen contraste a las 21 hs post inyección utilizando por ejemplo ^{124}I en PET/CT como se muestra en la figura 8 (Knowles & Wu 2012). Estas moléculas tienen además una región bisagra que da mayor flexibilidad de los dominios variables y la adición de una región CH₁ que facilita la

detección y evaluación de la funcionalidad sin necesidad de incluir un tag. Estas moléculas por tanto mantendrían por un lado la estructura de la inmunoglobulina de origen y el tamaño deseado para este tipo de finalidad, siendo una alternativa interesante a evaluar.

Las inmunotoxinas orientadas al uso terapéutico no requieren mostrar una alta retención tumoral, sino que su uso está condicionado a la internalización de la fracción toxina al interior celular donde puede detener la síntesis proteica y por tanto inducir apoptosis. A partir de la observación de que el anticuerpo Chi-Tn es internalizado por células tumorales en modelos in vitro (Heitzmann-Daverton 2013; Hubert et al. 2011), se hace interesante la posibilidad de dirigir drogas citotóxicas a través de un fragmento de anticuerpo de tipo Diabody. En este sentido, el trabajo aquí presentado genera una plataforma para la expresión de otros fragmentos de anticuerpos como inmunotoxinas a partir del anticuerpo 83D4. Ensayos preliminares han sido realizados orientados en este sentido. Brevemente, se diseñó de forma paralela una inmunotoxina anti-Tn a partir de la secuencia del Diabody Tn en tándem al cual se le incorporó la secuencia de una forma truncada de la exotoxina A de *Pseudomonas*, denominada PE38 (Weldon & Pastan 2011) en el extremo C-terminal. Esta construcción se clonó de forma análoga en un vector de expresión pET28a y la producción de la misma se efectuó a partir de los resultados de DbTn en cuerpos de inclusión en *E. coli* para luego ser resolubilizados por dilución. Ensayos preliminares mostraron que esta molécula reconoce el antígeno Tn de forma análoga a la del DbTn, siendo detectada la interacción en ensayos de ELISA de tipo sándwich o captura. Ensayos de citotoxicidad celular serán llevados a cabo en células Tn positivas donde se describió la internalización del anticuerpo Chi-Tn (Ta3HA, Jurkat, Ovcar3 o Shin-3) (Heitzmann-Daverton 2013) para así determinar la actividad funcional de esta molécula. De mostrar actividad anti-tumoral in vitro, esta molécula podrá ser utilizada en ensayos de xenotransplante en ratones inmunizados con dichas células tumorales, en la búsqueda de nuevas estrategias anti-tumorales.

Conclusiones

A continuación, se detallan las principales conclusiones extraídas de los resultados presentados en este trabajo.

- Se diseñó una construcción génica de un Diabody anti antígeno Tn a partir de la secuencia de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 83D4.
- Se evaluó la expresión del DbTn en sistemas procariotas y eucariotas, de los cuales el que presentó mejor rendimiento de proteína dimérica pura fue la expresión en células S2 de *D. melanogaster*.
- La caracterización del Diabody Tn indicó que existe reconocimiento específico por el antígeno Tn con una rápida disociación en modelos in vitro, no pudiendo demostrarse en las condiciones evaluadas el reconocimiento a nivel celular.
- Este trabajo permitió ahondar en el conocimiento de plataformas de expresión de fragmentos de anticuerpos y brindar información sobre la relación entre estructura y funcionalidad, abriendo perspectivas en cuanto al desarrollo de fragmentos de anticuerpos anti-Tn con fines imagenológicos que puedan ser evaluados en modelos in vivo.

Referencias bibliográficas

- Alewine, C., Hassan, R. & Pastan, I., 2015. Advances in Anticancer Immunotoxin Therapy. *The oncologist*, 20, pp.176–185.
- An, G. et al., 2007. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), pp.1417–1429.
- Ando, H. et al., 2008. Mouse-human chimeric anti-Tn IgG1 induced anti-tumor activity against Jurkat cells in vitro and in vivo. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31(9), pp.1739–1744.
- Angov, E., 2011. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology Journal*, 6(6), pp.650–659.
- Anon, Molecular cloning of a monoclonal anti-tumor antibody specific for the Tn antigen and expression of an active single chain Fv fragment.
- Arakawa, T. & Ejima, D., 2014. Refolding Technologies for Antibody Fragments. *Antibodies*, 3(2), pp.232–241.
- Avichezer, D. et al., 1997. Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model [published erratum appears in *Int J Cancer* 1997 Sep 4;72(5):918]. *Int J Cancer*, 72(1), pp.119–127.
- Babino, a et al., 2000. Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 86(6), pp.753–759.
- Babino, A. et al., 1997. Molecular cloning of a monoclonal anti-tumor Antibody Specific for the Tn Antigen and Epression of an Active Single-Chain Fv Fragment. *Hibridoma*, 16(4), pp.317–324.
- Backovic, M. et al., 2010. Efficient method for production of high yields of Fab fragments in *Drosophila* S2 cells. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 23(4), pp.169–74.
- Bakema, J.E. & Egmond, M. Van, 2014. Fc Receptors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 382, pp.373–392.
- Balza, E. et al., 2006. Targeted delivery of tumor necrosis factor- α to tumor vessels induces a therapeutic T cell-mediated immune response that protects the host against syngeneic tumors of different histologic origin. *Clinical Cancer Research*, 12(8), pp.2575–2582.
- Berkmen, M., 2012. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 82(1), pp.240–51.
- Berriel, E. et al., 2005. Simple mucin-type cancer associated antigens are pre-cancerous biomarkers during 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Oncology Reports*, 14(1), pp.219–227.
- Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*,

- Beuselin-Yvraut, M. et al., 1995. Immunocytological analysis of the Tn associated antigen 83d4 in serous effusions from patients with cancer: comparison with Tn soluble glycoprotein. *J. Clin. Pathol*, 48, pp.433–437.
- Bhowmick, N., Neilson, E. & Moses, H., 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432, pp.332–337.
- Bibeau, F. et al., 2009. Impact of Fc γ R11a-Fc γ R11a polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(7), pp.1122–1129.
- Bird, R.E. et al., 1988. Single-Chain Antigen-Binding Proteins.
- Blasco, M. a, 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 6(August), pp.611–622.
- Blom, N. et al., 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), pp.1633–1649.
- Borch, T.H. et al., 2015. Reorienting the immune system in the treatment of cancer by using anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *Drug Discovery Today*, 00(00).
- Brockhausen, I., 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports*, 7(6), pp.599–604.
- Brüggemann, M. et al., 1989. A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17), pp.6709–6713.
- Brüggemann, M. et al., 2014. Human Antibody Production in Transgenic Animals. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(2), pp.101–108.
- Cao, Y. et al., 1995. Expression of Thomsen-Friedenreich Related Antigens in Primary and Metastatic Colorectal Carcinomas - a Reevaluation. *Cancer*, 76, pp.1700–1708.
- Challa, D. et al., 2014. FcRn: From Molecular Interactions to Regulation of IgG Pharmacokinetics and Functions. In M. Daeron & F. Nimmerjahn, eds. *Fc Receptors SE - 12. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, pp. 249–272.
- Chames, P., 2012. *Antibody engineering* 2nd ed., Mareille: Humana Press.
- Chan, A.C. & Carter, P.J., 2010. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(5), pp.301–316.
- Charpin, C. et al., 1992. Monoclonal antibody 83D4 immunoreactivity in human tissues: cellular distribution and microcytometric analysis of immunoprecipitates on tissue sections. *Anticancer Research*, 12, pp.209–224.
- Cheng, M. et al., 2013. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & molecular immunology*, 10(3), pp.230–52.
- Coffelt, S.B. & Visser, K.E. De, 2015. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. *Trends in Immunology*, 36(4), pp.198–216.

- Comisión honoraria de lucha contra el cáncer, 2014. *Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer.*
- Conrath, K.E. et al., 2001. Camel Single-domain Antibodies as Modular Building Units in Bispecific and Bivalent Antibody Constructs. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), pp.7346–7350.
- Correa, A. & Oppezzo, P., 2015. Overcoming the Solubility Problem in E. coli: Available Approaches for Recombinant Protein Production. In E. García-Fruitós, ed. *Insoluble Proteins SE - 2. Methods in Molecular Biology*. Springer New York, pp. 27–44.
- Cuesta, A.M. et al., 2010. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends in biotechnology*, 28(7), pp.355–62.
- Cuesta, Á.M. et al., 2009. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. *PLoS ONE*, 4(4).
- Dahr, W., Uhlenbruck, G. & Bird, G.W., 1974. Cryptic A-like receptor sites in human erythrocyte glycoproteins: proposed nature of Tn-antigen. *Vox sanguinis*, 27(1), pp.29–42.
- Dall'Ollio, F. et al., 2012. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 1(17), pp.670–699.
- Danussi, C. et al., 2009. A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology*, 19(10), pp.1056–1067.
- Dausset, J., Moullec, J. & Bernard, J., 1959. Acquired hemolytic anemia with poly-agglutinability of red blood cells due to a new factor present in normal human serum (Anti-Tn). *Blood*, 14, pp.1079–1093.
- Davies, M. a & Samuels, Y., 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41), pp.5545–5555.
- Depinho, R.A., 2000. The age of cancer. *Nature*, 408, pp.248–254.
- Deroose, J.P. et al., 2011. Long-Term Results of Tumor Necrosis Factor - and Melphalan-Based Isolated Limb Perfusion in Locally Advanced Extremity Soft Tissue Sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*, 29(30), pp.4036–4044.
- Desai, P.R., 2000. Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Transfusion medicine reviews*, 14(4), pp.312–325.
- Deyev, S.M. et al., 2003. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nature biotechnology*, 21(12), pp.1486–1492.
- Dimitrov, D. & Marks, J., 2009. Immunogenicity of therapeutic antibodies. *Medecine sciences : M/S*, 25(12), pp.1070–1077.
- Dottorini, T. et al., 2004. Crystal Structure of a Human VH: Requirements for Maintaining a Monomeric Fragment. *Biochemistry*, 43(3), pp.622–628.
- Du, X. et al., 2008. Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity. *Cancer research*, 68(15), pp.6300–5.

- Dumoulin, M. et al., 2002. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 11(3), pp.500–515.
- Dunkelberger, J.R. & Song, W.-C., 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*, 20(1), pp.34–50.
- Edwards, B.K. et al., 2014. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*, 120(9), pp.1290–314.
- Falk, A.T. et al., 2015. Bevacizumab: A dose review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 94, pp.311–322.
- Feige, M.J., Hendershot, L.M. & Buchner, J., 2010. How antibodies fold. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4), pp.189–198.
- Ferrara, N. et al., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(5), pp.391–400.
- Ferrer-Miralles, N. et al., 2015. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In E. García-Fruitós, ed. *Insoluble Proteins SE - 1*. Methods in Molecular Biology. Springer New York, pp. 1–24.
- FitzGerald, K., Holliger, P. & Winter, G., 1997. Improved tumour targeting by disulphide stabilized diabodies expressed in *Pichia pastoris*. *Protein engineering*, 10(10), pp.1221–5.
- Frankel, S.R. & Baeuerle, P. a., 2013. Targeting T cells to tumor cells using bispecific antibodies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3), pp.385–392.
- Franklin, M.C. et al., 2004. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*, 5(4), pp.317–328.
- Freire, T. et al., 2002. Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de Fisiología*, 8, pp.89–107.
- Freire, T. et al., 2003. Biochemical characterization of soluble Tn glycoproteins from malignant effusions of patients with carcinomas. *Oncol Report*, 10(5), pp.1577–1585.
- Freise, A.C. & Wu, A.M., 2015. In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Molecular Immunology*, 67(2), pp.1–11.
- Furuta, M. et al., 1998. Construction of mono- and bivalent human single-chain Fv fragments against the D antigen in the Rh blood group: multimerization effect on cell agglutination and application to blood typing. *Protein engineering*, 11(3), pp.233–241.
- Furuta, T., Ogawa, T. & Yamaji, H., 2012. Production of Antibody Fragments Using the Baculovirus–Insect Cell System. In P. Chames, ed. *Antibody Engineering SE - 22*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, pp. 371–387.
- Galluzzi, L. et al., 2014. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24).
- Gasser, B. & Mattanovich, D., 2007. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? *Biotechnology Letters*, 29(2), pp.201–212.

- Gill, D.J. et al., 2013. Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness.
- Gill, D.J. et al., 2010. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *Journal of Cell Biology*, 189(5), pp.843–858.
- Gilmartin, A. a et al., 2012. High-level secretion of recombinant monomeric murine and human single-chain Fv antibodies from *Drosophila* S2 cells. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 25(2), pp.59–66.
- Glennie, M.J. et al., 2007. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, 44(16), pp.3823–3837.
- Goel, a. et al., 2000. Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: Improved biodistribution and potential for therapeutic application. *Cancer Research*, 60(24), pp.6964–6971.
- Golden, E.B. & Apetoh, L., 2015. Radiotherapy and Immunogenic Cell Death. *Seminars in Radiation Oncology*, 25(1), pp.11–17.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), pp.883–899.
- Hamada, S. et al., 1993. High expression rate of Tn antigen in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Letters*, 74(3), pp.167–173.
- Han, T. et al., 2012. Human Anti-CCR4 Minibody Gene Transfer for the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *PLoS ONE*, 7(9), p.e44455.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70.
- Hart, G.W. & Copeland, R.J., 2010. Glycomics hits the big time. *Cell*, 143(5), pp.672–676.
- Heitzmann-Daverton, A., 2013. *Utilisation d ' un anticorps monoclonal anti-Tn en immunothérapie des cancers*. Université Rene Descartes - Paris V.
- Hess, C. & Neri, D., 2015. The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-13 to syngeneic murine tumors mediates a potent anticancer activity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, pp.635–644.
- Higano, C.S. et al., 2010. Sipuleucel-T. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(7), pp.513–514.
- Hirao, T. et al., 1993. Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells. *Cancer*, 72(1), pp.154–159.
- Hirohashi, S. et al., 1985. Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), pp.7039–7043.
- Holcmann, M., Drobits, B. & Sibilica, M., 2012. How imiquimod licenses plasmacytoid dendritic cells to kill tumors. *Oncoimmunology*, 1(9), pp.1661–1663.

- Holliger, P. & Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology*, 23(9), pp.1126–36.
- Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G., 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), pp.6444–8.
- Van Horssen, R., Ten Hagen, T.L.M. & Eggermont, A.M.M., 2006. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist*, 11(4), pp.397–408.
- Hu, S.Z. et al., 1996. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH₃) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Research*, 56(13), pp.3055–3061.
- Hubert, P. et al., 2011. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer research*, 71(15), pp.5134–43.
- Hudis, C. a, 2007. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. , pp.39–51.
- Huston, J.S. et al., 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), pp.5879–5883.
- Itzkowitz, S.H. et al., 1992. Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. *Gut*, 33(4), pp.518–523.
- Jensen, P.H., Kolarich, D. & Packer, N.H., 2010. Mucin-type O-glycosylation - Putting the pieces together. *FEBS Journal*, 277(1), pp.81–94.
- Johansson, D., Krey, T. & Andersson, O., 2012. Production of Recombinant Antibodies in *Drosophila melanogaster* S2 Cells. In P. Chames, ed. *Antibody Engineering SE - 21*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, pp. 359–370.
- Johnson, P.R. et al., 2009. Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys. *Nat Med*, 15(8), pp.901–906.
- Johnson, S. et al., 2010. Effector cell recruitment with novel Fv-based dual-affinity re-targeting protein leads to potent tumor cytolysis and in vivo B-cell depletion. *Journal of Molecular Biology*, 399(3), pp.436–449.
- Jones, P.T. et al., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), pp.522–525.
- Jones, R.G. & Thompson, C.B., 2009. Tumor suppressors and cell metabolism : a recipe for cancer growth Tumor suppressors and cell metabolism : a recipe for cancer growth. , (514), pp.537–548.
- Joo, W.D., Visintin, I. & Mor, G., 2013. Targeted cancer therapy - Are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas*, 76(4), pp.308–314.
- Ju, T. et al., 2008. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in *Cosmc*. *Cancer Research*, 68(6), pp.1636–1646.
- Ju, T. et al., 2014. The *Cosmc* connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomarkers*, 14(1), pp.63–81.

- Jungbauer, A. & Kaar, W., 2007. Current status of technical protein refolding. *Journal of Biotechnology*, 128(3), pp.587–596.
- Jungbauer, A., Kaar, W. & Schlegl, R., 2004. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(5), pp.487–494.
- Kabat, E.A., (U.S.), N.I. of H. & University., C., 1991. *Sequences of proteins of immunological interest*, Bethesda, MD: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
- Kashmiri, S.V.S. et al., 2005. SDR grafting - A new approach to antibody humanization. *Methods*, 36(1), pp.25–34.
- Katsuda, T. et al., 2012. Production of Antibody Fragments in Escherichia coli. In P. Chames, ed. *Antibody Engineering SE - 18*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, pp. 305–324.
- Kaur, S. et al., 2012. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer letters*, 315(2), pp.97–111.
- Kawai, K. et al., 2013. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Science*, 104(1), pp.22–27.
- Keane, T.E. et al., 2006. The Emergence of for Prostate Cancer Radioimmunoscintigraphy for Prostate Cancer. , 8, pp.20–28.
- Kiesgen, S. et al., 2015. An EGF receptor targeting Ranpirnase-diabody fusion protein mediates potent antitumour activity in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 357(1), pp.364–373.
- Kim, K.M. et al., 2008. Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics*, 7(8), pp.2486–97.
- Kimura, N. et al., 2004. 2D7 diabody bound to the alpha2 domain of HLA class I efficiently induces caspase-independent cell death against malignant and activated lymphoid cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(4), pp.1201–9.
- Kipriyanov, S.M. et al., 1999. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *Journal of molecular biology*, 293(1), pp.41–56.
- Knowles, S.M. & Wu, A.M., 2012. Advances in immuno-positron emission tomography: Antibodies for molecular imaging in oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 30(31), pp.3884–3892.
- Kogelberg, H. et al., 2013. Generation and Characterization of a Diabody Targeting the $\alpha\beta 6$ Integrin. *PLoS ONE*, 8(9), pp.4–12.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), pp.495–497.
- Konno, A. et al., 2002. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 19(1), pp.61–70.
- Kreitman, R.J. et al., 2009. Phase I trial of continuous infusion anti-mesothelin recombinant immunotoxin SS1P. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(16), pp.5274–9.

- Kreitman, R.J. & Pastan, I., 2011. Antibody fusion proteins: Anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox. *Clinical Cancer Research*, 17(20), pp.6398–6405.
- Kroemer, G. et al., 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology*, 31, pp.51–72.
- Kudelka, M.R. et al., 2015. *Simple Sugars to Complex Disease — Mucin-Type O-Glycans in Cancer* 1st ed., Elsevier Inc.
- Laack, E. et al., 2002. Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung: helix pomatia agglutinin binding is an independent prognostic factor. *The American journal of pathology*, 160(3), pp.1001–1008.
- Langkilde, N.C. et al., 1992. Nuclear volume and expression of T-antigen, sialosyl-Tn-antigen, and Tn-antigen in carcinoma of the human bladder. Relation to tumor recurrence and progression. *Cancer*, 69(1), pp.219–227.
- Lesterhuis, W.J., Haanen, J.B. a G. & Punt, C.J. a, 2011. Cancer immunotherapy--revisited. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(8), pp.591–600.
- Lewis Phillips, G.D. et al., 2008. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Research*, 68(22), pp.9280–9290.
- Leyton, J. V. et al., 2009. Engineered humanized diabodies for microPET imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Protein Engineering, Design and Selection*, 22(3), pp.209–216.
- Li, E. et al., 1997. Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP). *Protein engineering*, 10(6), pp.731–736.
- Li, S. et al., 2005. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*, 7(4), pp.301–311.
- Liau, S.L., Connell, P.P. & Weichselbaum, R.R., 2013. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Science translational medicine*, 5(173), p.173sr2.
- Linley, A.J., Ahmad, M. & Rees, R.C., 2011. Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy. *International journal of hematology*, 93(3), pp.263–73.
- List, T. & Neri, D., 2013. Immunocytokines: A review of molecules in clinical development for cancer therapy. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 5(SUPPL. 1), pp.29–45.
- Liu, H. et al., 2012. MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of [alpha]v and [beta]3 integrin subunits. *Nat Cell Biol*, 14(6), pp.567–574.
- Lodish, H., 2008. *Molecular Cell Biology*,
- Lodish, H.F., 2008. *Molecular Cell Biology*,
- Mansfield, E. et al., 1997. Recombinant RFB4 immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors. *Blood*, 90(5), pp.2020–6.
- Marin, M., 2008. Folding at the rhythm of the rare codon beat. , pp.1047–1057.

- Matsumoto-Takasaki, A. et al., 2012. Surface plasmon resonance and NMR analyses of anti Tn-antigen MLS128 monoclonal antibody binding to two or three consecutive Tn-antigen clusters. *Journal of Biochemistry*, 151(3), pp.273–282.
- Mazal, D. et al., 2013. Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective immunotargeting of cancer.
- McCabe, K. et al., 2012. An engineered cysteine-modified diabody for imaging activated leucocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-positive tumors. *Changes*, 14(3), pp.336–347.
- McCafferty, J. et al., 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), pp.552–554.
- Mittal, D. et al., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases- elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, pp.16–25.
- Moore, P. a. et al., 2011. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *Blood*, 117(17), pp.4542–4551.
- Moraes, Â.M. et al., 2012. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. *Biotechnology Advances*, 30(3), pp.613–628.
- Moreno, B.H. & Ribas, a, 2015. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *British Journal of Cancer*, 112(9), pp.1421–1427.
- Moriggl, R. et al., 1999. Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*, 10(2), pp.249–259.
- Morita, N. et al., 2009. Inhibition of cancer cell growth by anti-Tn monoclonal antibody MLS128. *Journal of Dermatology*, 3(1), pp.32–37.
- Morrison, S.L. et al., 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), pp.6851–6855.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., 2008. *Janeway's Immunobiology*,
- Musolino, A. et al., 2008. Immunoglobulin g fragment c receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(11), pp.1789–1796.
- Nagy, J. a. et al., 2010. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(3), pp.321–331.
- Nakamoto, Y. et al., 1998. Three-Step Tumor Imaging with Biotinylated Monoclonal Antibody, Streptavidin and ¹¹¹In-DTPA–Biotin. *Nuclear Medicine and Biology*, 25(2), pp.95–99.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G. & Halazonetis, T.D., 2010. Genomic instability [mdash] an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), pp.220–228.
- Nguyen, V.D. et al., 2011. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of E.coli. *Microbial cell factories*, 10(1), p.1.

- Niv, R., Segal, D. & Reiter, Y., Fv Immunotoxins for Cancer Therapy. In M. Welschof & J. Krauss, eds. *Method in Molecular Biology*. Ttowa, NJ: Humana Press.
- Numata, Y. et al., 1990. A monoclonal antibody directed to Tn antigen. *Biochemical and biophysical resarch communications*, 170(3), pp.981–985.
- Nuñez-Prado, N. et al., 2015. The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discovery Today*, 20(5).
- Okeley, N.M. et al., 2010. Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clinical Cancer Research*, 16(3), pp.888–897.
- Olafsen, T. et al., 2012. ImmunoPET Using engineered antibody fragments: Fluorine-18 labeled diabodies for same-day imaging. *Tumor Biology*, 33(3), pp.669–677.
- Olafsen, T. et al., 2009. Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 50(9), pp.1500–8.
- Oppezzo, P. et al., 2000. Production and Functional Characterization of Two Mouse / Human Chimeric Antibodies With Specificity for the. , 19(3).
- Ortega, C. et al., 2013. High level prokaryotic expression of anti-Müllerian inhibiting substance type II receptor diabody, a new recombinant antibody for in vivo ovarian cancer imaging. *Journal of immunological methods*, 387(1-2), pp.11–20.
- Osako, M. et al., 1993. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer*, 71(7), pp.2191–2199.
- Osinaga, E. et al., 1994. Analysis of a heterogeneous group of human breast carcinoma associated glycoproteins bearing the Tn determinant. *Breast Cancer Research and Treatment*, 32(2), pp.139–152.
- Osinaga, E., Pancino, G., Porchet, N., et al., 1992. Analysis of the carcinoma-associated epitope defined by the monoclonal antibody 83D4. *Journal of tumor marker oncology*, 7(4), pp.13–19.
- Osinaga, E. et al., 2000. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. , 469, pp.24–28.
- Osinaga, E., Pancino, G., Beuselin-Yvraut, M., et al., 1992. Detection of a soluble antigen defined by monoclonal antibody 83D4 in serous effusions associated with breast carcinoma. *Cancer*, 69(7), pp.1745–9.
- Osinaga, E. et al., 1996. Development of an immuno-lectin-enzymatic assay for the detection of serum cancer-associated glycoproteins bearing Tn determinant. *Intrnational journal of Oncology*, pp.401–406.
- Owen, Punt & Stranford, 2013. *Kuby Immunology* 7th ed., New York: W.H. Freeman and Company.
- Pack, P. & Plueckthun, A., 1992. Mini-antibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherichia coli. *Biochemistry*, 31(6), pp.1579–1584.

- Pain, C., Dumont, J. & Dumoulin, M., 2015. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie*, 111, pp.82–106.
- Palm, N. & Medzhitov, R., 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunology Review*, 227, pp.221–233.
- Pancino, G., Osinaga, E., Charpin, C., et al., 1990. Monoclonal antibody 83D4 identifies a breast cancer associated antigen not detected in normal breast. *Bull Cancer*, 77, pp.99–103.
- Pancino, G., Osinaga, E., Vorauer, W., et al., 1990. Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method. *Hybridoma*, 9(4), pp.389–95.
- Paquette, R.L. et al., 1998. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology*, 64(3), pp.358–367.
- Pastan, I. et al., 2006. Immunotoxin therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(7), pp.559–65.
- Pastan, I. et al., 2007. Immunotoxin treatment of cancer. *Annual review of medicine*, 58, pp.221–37.
- Pastan, I. & Ho, M., 2010. *Recombinant immunotoxins for treating cancer* R. E. Kontermann & S. Dubel, eds.,
- Paul W ed., 2008. *Fundamental Immunology 6th Ed*,
- Pawluczkwycz, A.W. et al., 2009. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(1), pp.749–758.
- Pérez-Callejo, D. et al., 2015. Action and resistance of monoclonal CD20 antibodies therapy in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancer Treatment Reviews*.
- Radhakrishnan, P. et al., 2014. Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Reavy, B. et al., 2000. Expression of Functional Recombinant Antibody Molecules in Insect Cell Expression Systems. , 228, pp.221–228.
- Reddy, S. et al., 2011. Evaluation of the anti-HER2 C6.5 diabody as a PET radiotracer to monitor HER2 status and predict response to trastuzumab treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(6), pp.1509–20.
- Reis, C. a et al., 2010. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of clinical pathology*, 63(4), pp.322–329.
- Robinson, M.K. et al., 2005. Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody. *Cancer research*, 65(4), pp.1471–8.
- Rothe, A. et al., 2015. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30 / CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*, 125(26), pp.4024–4032.

- Saeland, E. et al., 2007. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(8), pp.1225–1236.
- Sagawa, M. et al., 2011. A new disulfide-linked dimer of a single-chain antibody fragment against human CD47 induces apoptosis in lymphoid malignant cells via the hypoxia inducible factor-1 α pathway. *Cancer science*, 102(6), pp.1208–15.
- Sahdev, S., Khattar, S.K. & Saini, K.S., 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and cellular biochemistry*, 307(1-2), pp.249–64.
- Schneider, I., 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 27(2), pp.353–365.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J., 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(March), pp.1565–1570.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D. & Old, L.J., 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.278–87.
- Seifert, O. et al., 2012. The IgM CH2 domain as covalently linked homodimerization module for the generation of fusion proteins with dual specificity. *Protein Engineering, Design and Selection*, 25(10), pp.603–612.
- Shahied, L.S. et al., 2004. Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), pp.53907–53914.
- Shapira, A. & Benhar, I., 2010. Toxin-based therapeutic approaches. *Toxins*, 2(11), pp.2519–83.
- Sharma, P. & Allison, J., 2015. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230), pp.56–61.
- Shih, K., Arkenau, H.-T. & Infante, J.R., 2014. Clinical Impact of Checkpoint Inhibitors as Novel Cancer Therapies. *Drugs*, 74(17), pp.1993–2013.
- Shuptrine, C.W., Surana, R. & Weiner, L.M., 2012. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Seminars in cancer biology*, 22(1), pp.3–13.
- Sim, G.C. et al., 2014. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺ Treg expansion in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation*, 124(1), pp.99–110.
- Singh, A., Upadhyay, V. & Panda, A., 2015. Solubilization and Refolding of Inclusion Body Proteins. In E. García-Fruitós, ed. *Insoluble Proteins SE - 15*. Methods in Molecular Biology. Springer New York, pp. 283–291.
- Skerra, a & Plückthun, a, 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4855), pp.1038–1041.
- Sliwkowski, M.X. & Mellman, I., 2013. Antibody therapeutics in cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6151), pp.1192–8.
- Spiro, R.G., 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), p.43R–56R.

- Springer, G.F., 1984. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4654), pp.1198–1206.
- Steiner, M. & Neri, D., 2011. Antibody-Radionuclide Conjugates for Cancer Therapy : Historical Considerations and New Trends Antibody-Radionuclide Conjugates for Cancer Therapy : Historical Considerations and New Trends. , pp.6406–6416.
- Subedi, G.P. et al., 2012. Overproduction of anti-Tn antibody MLS128 single-chain Fv fragment in Escherichia coli cytoplasm using a novel pCold-PDI vector. *Protein Expression and Purification*, 82(1), pp.197–204.
- Takahashi, H.K. et al., 1988. Immunoglobulin G₃ Monoclonal Antibody Directed to Tn Antigen (Tumor-associated α - N -Acetylgalactosaminy Epitope) That Does Not Cross-React with Blood Group A Antigen Immunoglobulin G₃ Monoclonal Antibody Directed to Tn Antigen (Tumor- associated a-. *Cancer research*, 48, pp.4361–4367.
- Talmadge, J.E. & Fidler, I.J., 2010. AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: Historical perspective. *Cancer Research*, 70, pp.5649–5669.
- Tarhini, A. a, Gogas, H. & Kirkwood, J.M., 2012. IFN- α in the treatment of melanoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(8), pp.3789–93.
- Tavaré, R. et al., 2014. Engineered antibody fragments for immuno-PET imaging of endogenous CD8+ T cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), pp.1108–13.
- Teeling, J.L. et al., 2012. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. , 104(6), pp.1793–1800.
- Tettamanti, G. & Pigman, W., 1968. Purification and characterization of bovine and ovine submaxillary mucins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 124, pp.41–50.
- Todorovska, a et al., 2001. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *Journal of immunological methods*, 248(1-2), pp.47–66.
- Unger, T. et al., 2010. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of structural biology*, 172(1), pp.34–44.
- Vacchelli, E. et al., 2014. Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. , (January), pp.1–14.
- Vacchelli, E. et al., 2013. Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*, 2(8), p.e25238.
- Vaquero, C. et al., 2002. A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *The FASEB journal*, (5).
- Variki, A., Cummings, R. & JD, E., 2009. *Essentials of Glycobiology* 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vavasseur, F. et al., 1995. Synthesis of O-glycan core 3: characterization of UDP-GlcNAc: GalNAc-R beta 3-N-acetyl-glucosaminyltransferase activity from colonic mucosal tissues and lack of the activity in human cancer cell lines. *Glycobiology*, 5(3), pp.351–357.

- Vera, A. et al., 2007. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), pp.1101–1106.
- Verma, R., Boleti, E. & George, a J., 1998. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of immunological methods*, 216(1-2), pp.165–81.
- Völkel, T. et al., 2001. Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain diabodies. *Protein engineering*, 14(10), pp.815–823.
- Wandall, H.H. et al., 2010. Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Research*, 70(4), pp.1306–1313.
- Ward, S. et al., 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. *Nature*, 341, pp.544–546.
- Wayne, A.S. et al., 2014. Immunotoxins for leukemia. *Blood*, 123(16), pp.2470–7.
- Weidle, U.H. et al., 2013. The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer. *Cancer Genomics and Proteomics*, 10(1), pp.1–18.
- Weinberg, R. a, 2014. *The biology of Cancer* 2nd ed. T. & F. G. Garland Science, ed., New York.
- Weiner, G.J., 2015. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), pp.361–370.
- Weiner, G.J., 2011. Rituximab : mechanism of action. , 47(2), pp.115–123.
- Weiner, L.M., Surana, R. & Wang, S., 2010. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 10(5), pp.317–27.
- Weldon, J.E. & Pastan, I., 2011. A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer. *The FEBS journal*, 278(23), pp.4683–700.
- Weng, W.K. & Levy, R., 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(21), pp.3940–3947.
- Wesolowski, J. et al., 2009. Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), pp.157–174.
- Wolf, E. et al., 2005. BiTEs: Bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug Discovery Today*, 10(18), pp.1237–1244.
- Wu, A.M., 2014. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods (San Diego, Calif.)*, 65(1), pp.139–47.
- Wu, A.M. & Olafsen, T., 2008. Antibodies for molecular imaging of cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 14(3), pp.191–7.
- Yamaguchi, H. & Miyazaki, M., 2014. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 4(1), pp.235–251.

- Yao, Z. et al., 1995. Radioimmunoimaging of colon cancer xenografts with anti-Tn monoclonal antibody. *Nuclear Medicine and Biology*, 22(2), pp.199–203.
- Yuasa, N. et al., 2012. Construction and expression of anti-Tn-antigen-specific single-chain antibody genes from hybridoma producing MLS128 monoclonal antibody. *Journal of Biochemistry*, 151(4), pp.371–381.
- Yuasa, N. et al., 2013a. Expression and structural characterization of anti-T-antigen single-chain antibodies (scFvs) and analysis of their binding to T-antigen by surface plasmon resonance and NMR spectroscopy. *Journal of Biochemistry*, 154 (6), pp.521–529.
- Yuasa, N. et al., 2013b. Expression and structural characterization of anti-T-antigen single-chain antibodies (scFvs) and analysis of their binding to T-antigen by surface plasmon resonance and NMR spectroscopy. *Journal of Biochemistry*, 154 (6), pp.521–529.
- Zamri, N. et al., 2013. Characterization of anti-Tn-antigen MLS128 binding proteins involved in inhibiting the growth of human colorectal cancer cells. *BioScience Trends*, 7(5), pp.221–229.
- Zamri, N. et al., 2012. Effects of two monoclonal antibodies, MLS128 against Tn-antigen and 1H7 against insulin-like growth factor-I receptor, on the growth of colon cancer cells. *BioScience Trends*, 6(6), pp.303–312.
- Zhang, M. et al., 1998. Effect of Administration Route and Dose of Streptavidin or Biotin on the Tumor Uptake of Radioactivity in Intraperitoneal Tumor with Multistep Targeting. *Nuclear Medicine and Biology*, 25(2), pp.101–105.
- Zugmaier, G. et al., 2015. Clinical overview of anti-CD19 BiTE® and ex vivo data from anti-CD33 BiTE® as examples for retargeting T cells in hematologic malignancies. *Molecular Immunology*, 19.

Anexos

Secuencias de genes Diabody anti antígeno Tn

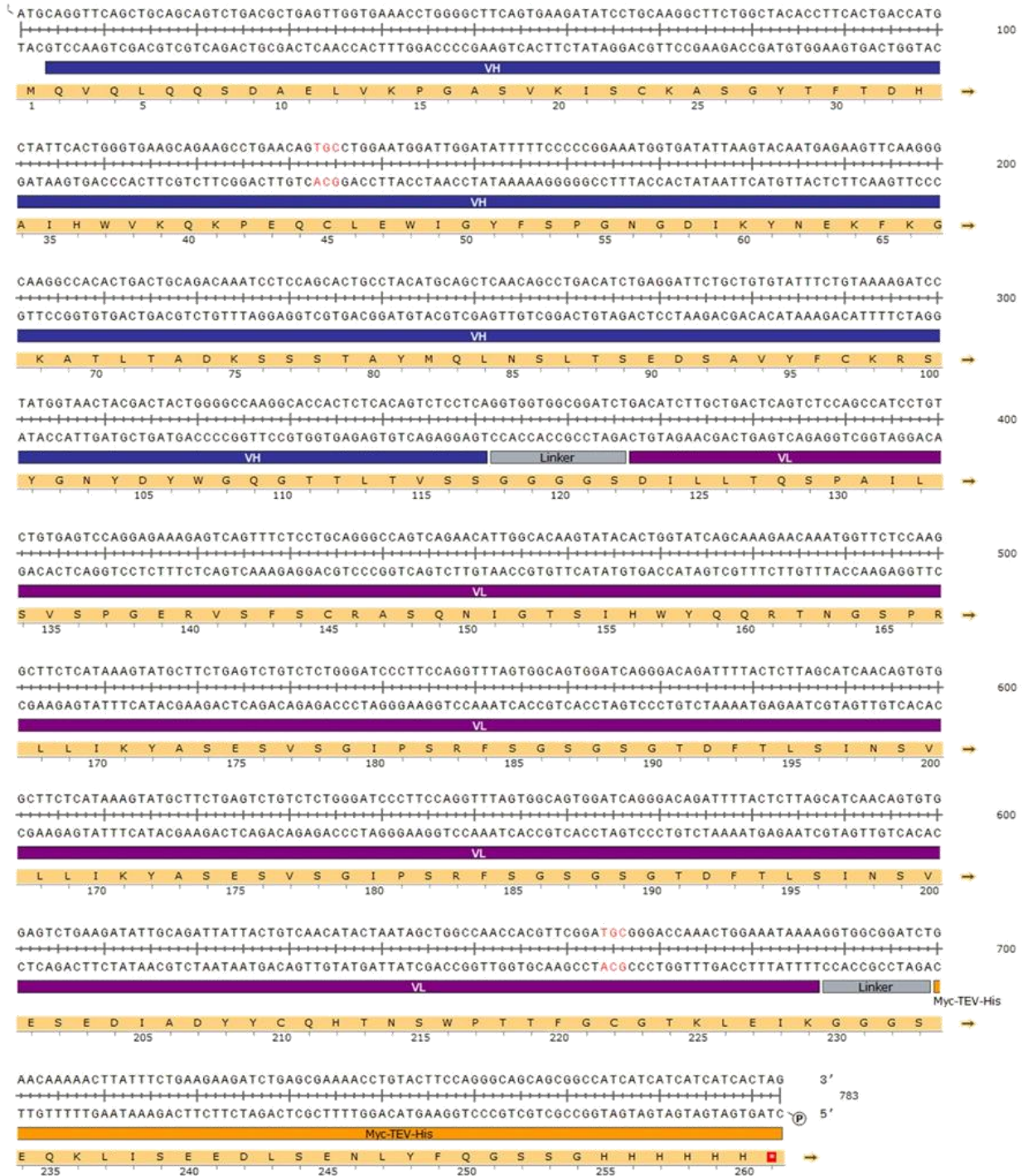
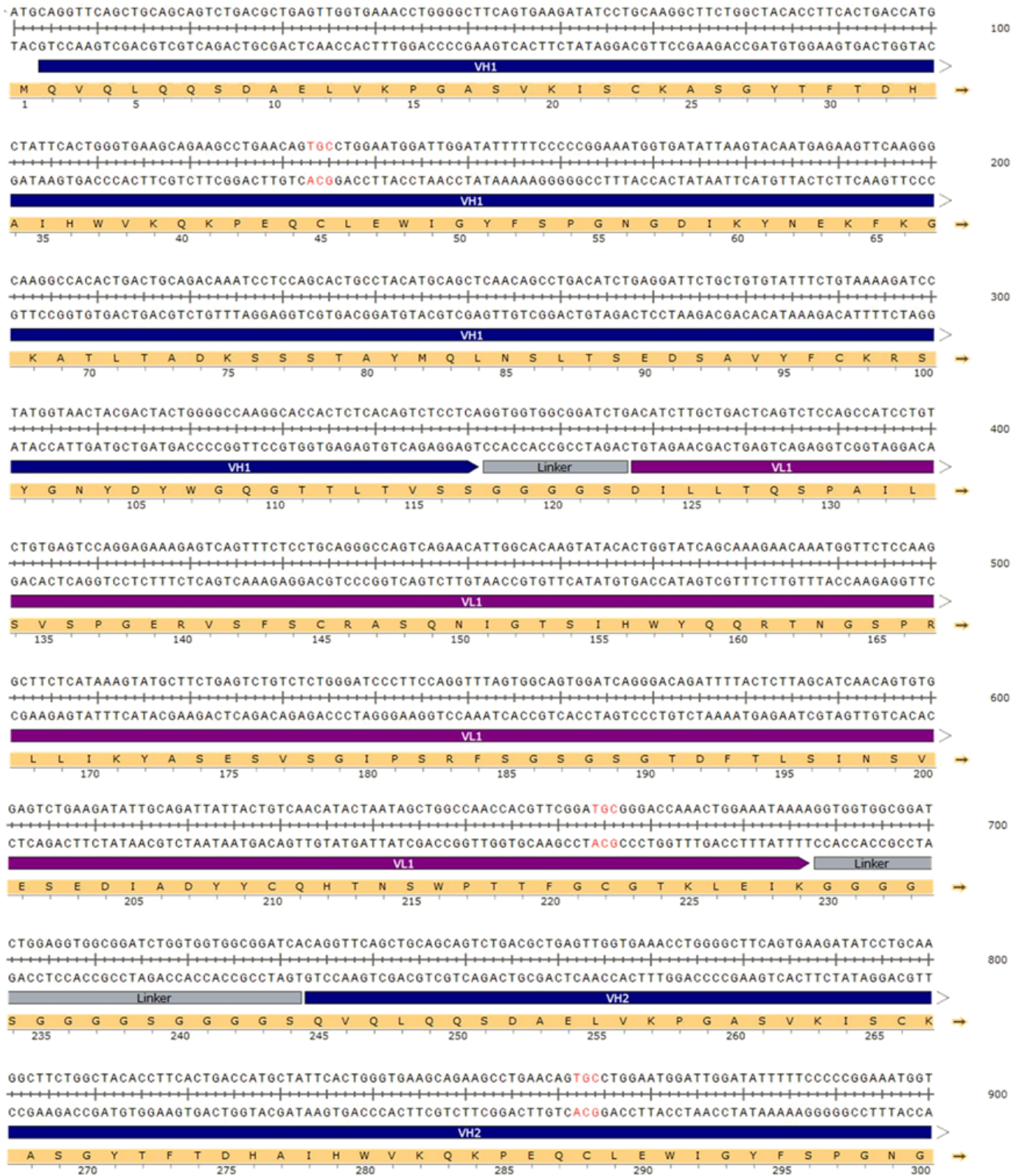


Figura 30 Secuencia de Diabody Tn (sin optimizar). Se detalla secuencia nucleotídica y aminoacídica de la construcción DbTn . VH región variable de la cadena pesada (azul), VL Región variable de la cadena liviana (violeta), y Myc-TEV-His, secuencia de reconocimiento Myc, sitio de clivaje proteolítico TEV y cola de histidina para purificación (anaranjado).



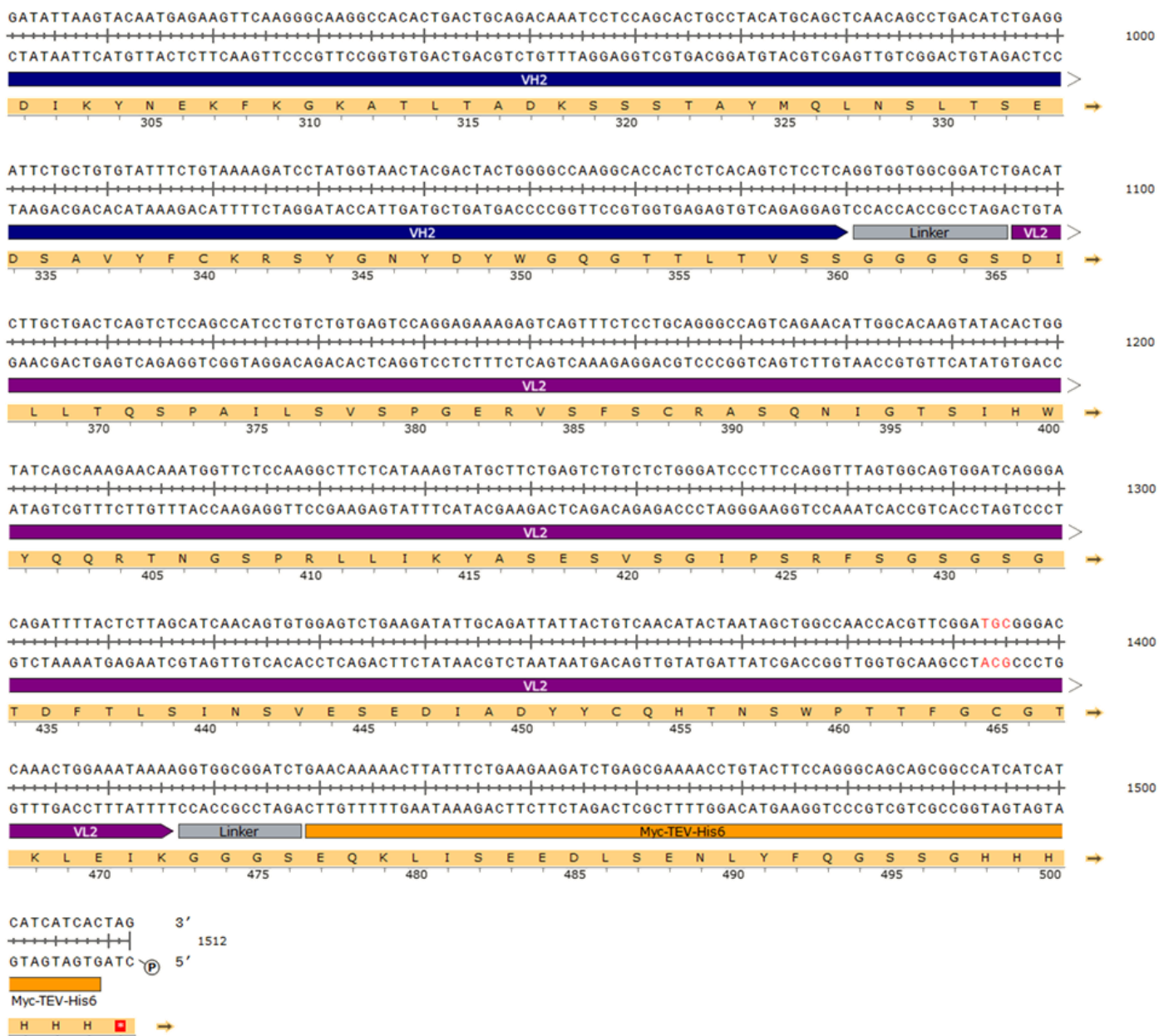


Figura 31 Secuencia de Diabody TnT (sin optimizar). Se detalla secuencia nucleotídica y aminoácídica de la construcción DbTnT. VH región variable de la cadena pesada (azul), VL Región variable de la cadena liviana (violeta), Linker, y Myc-TEV-His, secuencia de reconocimiento Myc, sitio de clivaje proteolítico TEV y cola de histidina para purificación (anaranjado).

2. Optimización de codones

Expresión en *E. coli*

Optimized	7	ATG CAAGTGCAA CTG CAA CAGAGCGATGCGGAACTGGTGAAGCCGGGTGCGAGCGTGAAG
Original	7	ATGCAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAG
Optimized	67	ATTAGCTGCAAGGCGAGCGGTTAT ACCTT CA CCGACCACGCGATCCACTGGGTGAAGCAG
Original	67	ATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACCATGTATTCACTGGGTGAAGCAG
Optimized	127	AAACCGGAGCAA TGCCTGGAATGGATCGGTTACTT CAGCCCCGGCAA CGGTGACATCAAG
Original	127	AAGCCTGAACAGTGCCTGGAATGGATTGGATATTTTCCCGGAAATGGTGATATTAAG
Optimized	187	TACAACGAGAAGTTCAAGGGCAAG GCGACC CTG ACCGGGATAAGAGCAGCAGCACCGCG
Original	187	TACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCC
Optimized	247	TACATGCAG CTG AACAGCCTG ACCAGCGAAGACAGCGCGGT TACTTCTG CAAA CGTAGC
Original	247	TACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCTGTGTATTTCTGTAAAAGATCC
Optimized	307	TATGGTAACTAC GATTAT TGGGGCC AGGGT ACC ACCCTGACCGTTAGCAGCGGTGGCGGT
Original	307	TATGGTAACTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGTGGTGGC
Optimized	367	GCGAGCGACATCCTGCTG ACC CAAAGCCCGCGATTCTGAGCGT GAGCCCGGGCGAGCGT
Original	367	GGATCTGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGA
Optimized	427	GTTAGCTTTAGCTG CC GTGCGAGCCAAAACATCGGTACCAGCATT CACTGGTACCAGCAA
Original	427	GTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGTATACACTGGTATCAGCAA
Optimized	487	CGTACCAACGGCAGCCCGCTCTGCTGATCAA TATGCGAGCGAAAGCGTGAGCGGTATT
Original	487	AGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTGTCTCTGGGATC
Optimized	547	CCGAGCCGTTT CAGCGGTAGCGGTAGCGGTACC GATTTTACCCTGAGCATCAACAGCGTT
Original	547	CCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTG
Optimized	607	GAGAGCGAAGACATTGCGGAT TACTATTGCCAGCACACCAAC AGCTGGCCGACC ACCTTT
Original	607	GAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACATACTAATAGCTGGCCAACCAAGTTC
Optimized	667	GGTTGCGGC ACCAA ACTG GAGAT CAAGGGTGGCGGTAG CGAACAAAGCTGATTAGCGAG
Original	667	GGATGCGGGACCAA ACTG GAAATAAAAGGTGGCGGATCTGAACAAA ACTTATTTCTGAA
Optimized	727	GAAGATCTGAGCGAAA AT CTGTACTTCCAG GGT AGCAGCGGT CATCAC CATCATCATCAC
Original	727	GAAGATCTGAGCGAAA ACTG TACTTCCAGGGCAGCAGCGGCCATCATCATCATCATCAC
Optimized	787	TAA
Original	787	TAG

Figura 32. Optimización de codones de DbTn para expresión en *E. coli*. Secuencia optimizada por la empresa GenScript, en rojo se denotan los codones modificados frente a la secuencia original.

Expresión en *Drosophila S2*

Optimized	1	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGACGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGAGCCAGTGTGAAGATT
Original	1	CAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGAGTTGGTGAACCTGGGGCTTCAGTGAAGATA
Optimized	61	AGTTGCAAGGCCAGTGGATATACATTTACCGATCACGCCATCCATTGGGTGAAGCAGAAG
Original	61	TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGAAG
Optimized	121	CCAGAGCAGTGCCTGGAGTGGATCGGCTACTTCTCCCCCGGAACGGCGATATCAAGTAC
Original	121	CCTGAACAGTGCCTGGAATGGATTGGATATTTTTCCCCCGGAAATGGTGAATTAAGTAC
Optimized	181	AACGAGAAGTTCAAGGGAAAGGCCACGCTGACAGCCGACAAGAGCTCCTCGACAGCCTAC
Original	181	AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTAC
Optimized	241	ATGCAGCTGAACAGTCTGACCAGCGAGGATTCGGCCGTGTACTTCTGCAAGCGCTCGTAT
Original	241	ATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGATCTGTCTGTGATTCTGTAAAGATCCTAT
Optimized	301	GGCAATTACGACTATTGGGGACAGGGCACCACGCTGACCGTGAGTAGCGGAGGAGGGGC
Original	301	GGTAACTACGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCAGGTGGTGGCGGA
Optimized	361	AGCGACATCTGCTGACGACAGTCCAGCCATTCTGTCCGTGTCGCCAGGAGAGCGCGTG
Original	361	TCTGACATCTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGATC
Optimized	421	AGTTTACGCTGC CGCGCCAGTCAAGCATCGGCACGAGCATTCACTGGTATCAGCAGCGC
Original	421	AGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGCATTGGCACAAAGTATACTGGTATCAGCAAAGA
Optimized	481	ACAAATGGAAGCCCGCGCCTGCTGATCAAGTATGCCTCCGAGTCCGTGAGTGGCATTCCA
Original	481	ACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTGTCTCTGGGATCCCT
Optimized	541	TCCCGCTTCAGCGGCAGCGGCTCGGGAACCGATTTTACGCTGTGATCAACAGTGTGGAG
Original	541	TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAG
Optimized	601	AGCGAGGATATTGCCGACTACTATTGCCAGCATACCAATTCGTGGCCCAACCTTCGGC
Original	601	TCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACATACTAATAGCTGGCCAACCACGTTCCGA
Optimized	661	TGCGGAACGAAGCTGGAGATCAAGGGCGGAGGCAGCGAGCAGAAGCTGATTTCCGAGGAG
Original	661	TGCGGGACCAAACCTGGAAATAAAAGGTGGCGGATCTGAACAAAACTTATTTCTGAAGAA
Optimized	721	GACCTGTCGGAGAACCTGTACTTTCAGGGC
Original	721	GATCTGAGCGAAAACCTGTACTTCCAGGGC

Figura 33. Optimización de codones de DbTn para expresión en *Drosophila*. Secuencia optimizada por la empresa Genscript, en rojo se denotan los codones modificados frente a la secuencia original.

3. Espectrometría de masa

DbTn fracción soluble *E. coli*

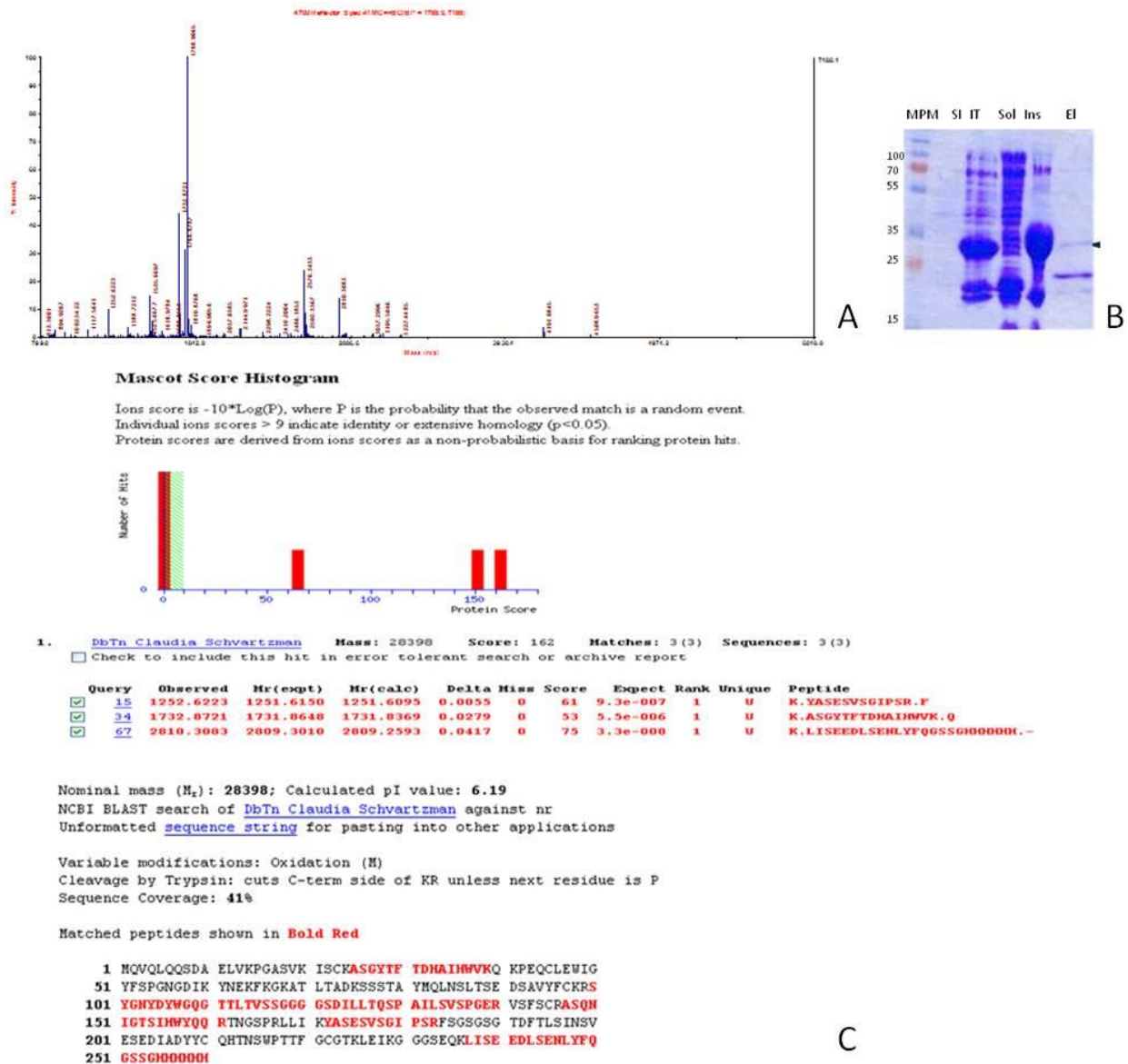
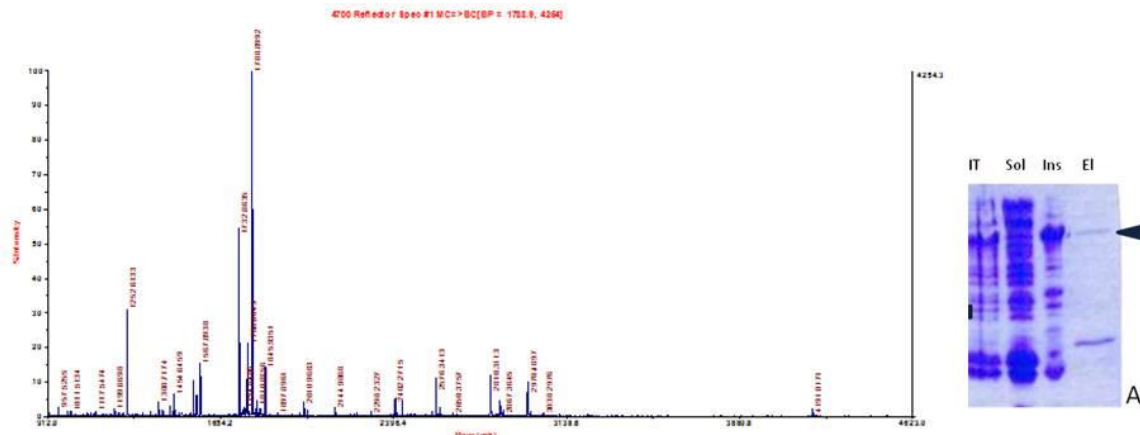


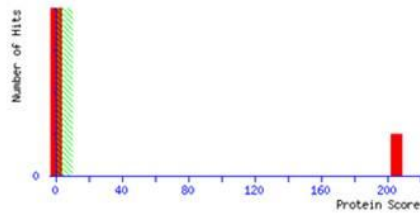
Figura 34 Análisis por espectrometría de masa de banda obtenida en fracción soluble DbTn. **A.** Espectro de masa obtenido en modo reflector. **B.** Banda analizada flecha azul gel SDS-PAGE **C.** Análisis de los péptidos identificados con el software MASCOT donde se compararon los péptidos experimentales con fragmentos teóricos de digestión con Tripsina a partir de la secuencia aminoacídica de DbTn. Se identificó de forma significativa que la proteína analizada corresponde a DbTn con una cobertura de secuencia del 41%. Los péptidos identificados se describen en rojo.

DbTnT fracción soluble *E. coli*



Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 10 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Search Parameters

Type of search: Sequence Query
 Enzyme: Trypsin
 Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)
 Mass values: Monoisotopic
 Protein Mass: Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance: ± 0.1 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.35 Da
 Max Missed Cleavages: 1
 Instrument type: MALDI-TOF
 Number of queries: 53

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
9	1252.6133	1251.6060	1251.6095	-0.0035	0	73	5.3e-008	1	U	K.YASEVSGIPSR.F
23	1732.8635	1731.8562	1731.8369	0.0193	0	72	6.3e-008	1	U	K.ASGYTFDHAIHVVK.Q
29	1788.8992	1787.8919	1787.8703	0.0216	0	86	2.5e-009	1	U	R.ASQNIGTSDHWYQQR.T

Proteins matching the same set of peptides:

Nominal mass (M_r): **54157**; Calculated pI value: **6.40**
 NCBI BLAST search of [TnT Claudia Schwartzman](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: **28%**

Matched peptides shown in Bold Red

```

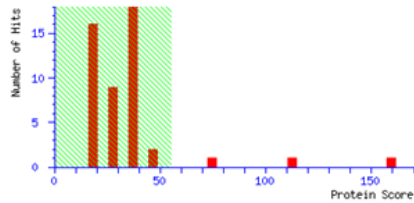
1  MQVQLQOSDA ELVKPGASVK ISCKASGYTF TDHAIHWVKQ KPEQCLEWIG
51 YFSPGNGDIK YNEKFKGKAT LTADKSSSTA YHQLNSLTSE DSAVYFCKRS
101 YGNVDYWGQG TLLTVSSGGG GSDILLTQSP AILSVSPGER VSFSCRASQN
151 IGTSDHWYQQR RTNGSPRLLI KYASEVSGI PSRFSGSGSG TDFTLINSV
201 ESEDIADYYC QHTNSWPTTF GCGTKLEIKG GGGSGGGSG GGGQVQLQQ
251 SDAELVKPGA SVKISCKASG YTFDHAHW VKQKPEQCLE WIGYFSPGNG
301 DIKYNEKFKG KATLTADKSS STAYHQLNSL TSEDSAVYFC KRSYGNYDYW
351 GQGTTLTVSS GGGSDILLT QSPAILSVSP GERVVFSCRA SQNIGTSDHW
401 YQQRINGSPR LLIKYASESV SGIPSRFSGS GSGTDFTLIS NVESEDIAD
451 YYCQHTNSWP TTFGCGTKLE IRGGGSEQKL I SEEDLSENL YFQSSGHQII
501 HHH
    
```

B

Figura 35 Análisis por espectrometría de masa de banda obtenida en fracción soluble DbTnT. **A.** Espectro de masa obtenido en modo reflector y banda analizada flecha azul gel SDS-PAGE **B.** Análisis de los péptidos identificados con el software MASCOT donde se compararon los péptidos experimentales con fragmentos teóricos de digestión con Tripsina a partir de la secuencia aminoacídica de DbTn. Se identificó de forma significativa que la proteína analizada corresponde a DbTnT con una cobertura de secuencia del 28%.

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 55 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Search Parameters

Type of search: Sequence Query
 Enzyme: Trypsin
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Mass values: Monoisotopic
 Protein Mass: Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance: ± 0.1 Da
 Fragment Mass Tolerance: ± 0.35 Da
 Max Missed Cleavages: 1
 Instrument type: MALDI-TOF-TOF
 Number of queries: 53

```

Search title      :
Database         : NCBI nr 20130407 (24070523 sequences; 8281664780 residues)
Timestamp        : 8 Apr 2013 at 14:38:49 GMT
Protein hits     : gi|9944334 anti-Tn immunoglobulin light chain monoclonal antibody [Mus musculus]
                  gi|1421648 Chain A, Conformational Variability In The Refined Structure Of The Chaperonin GroEL At 2.8 Angstrom Resolution
                  gi|193217  unnamed protein product, partial [Mus musculus]
                  gi|383782875 putative chaperonin GroEL [Actinoplanes missouriensis 431]
                  gi|400534734 MaoC like domain-containing protein [Mycobacterium colombiense CECT 3035]
                  gi|421471839 hypothetical protein BURMUCF1_2007 [Burkholderia multivorans ATCC BAA-247]
                  gi|398398702 putative beta-glucosidase [Zymoseptoria tritici IPO323]
                  gi|66361247 Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment From The Monoclonal Antibody CetuximabERBITUXINC-C225
                  gi|320105202 CheW protein [Isosphaera pallida ATCC 43644]
                  gi|367005729 hypothetical protein TPHA_OK00280 [Tetrapisispora phaffii CBS 4417]
                  gi|389604008 conserved hypothetical protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904]
                  gi|56478162 carbamoyl phosphate synthase large subunit [Aromatoleum aromaticum EbN1]
                  gi|118602846 carbamoyl-phosphate synthase large subunit [Candidatus Ruthia magnifica str. Cm (Calyptogenia magnifica)]
                  gi|389750362 hypothetical protein STEHIDRAFT_108065 [Sterium hirsutum FP-91666 SS1]
                  gi|374629218 formylmethanofuran dehydrogenase, subunit E [Methanoplanus limicola DSM 2279]
                  gi|91774304 mevalonate kinase [Methanococcoides burtonii DSM 6242]
                  gi|5596987 immunoglobulin light chain variable region [Mus musculus]
                  gi|254976839 hypothetical protein CdifQC_16063 [Clostridium difficile QCD-66c26]
                  gi|167526222 hypothetical protein [Monosiga brevicollis MX1]
                  gi|302540559 conserved hypothetical protein [Streptomyces hygroscopicus ATCC 53653]
  
```

1. [gi|9944334](#) Mass: 13876 Score: 159 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
anti-Tn immunoglobulin light chain monoclonal antibody [Mus musculus]

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 9	1252.6133	1251.6060	1251.6095	-0.0035	0	73	0.0012	1	U	K.YASESVSGIPSR.F
<input checked="" type="checkbox"/> 29	1788.8992	1787.8919	1787.8703	0.0216	0	86	5.2e-05	1	U	R.ASQNIGTSIHVYQQR.T

Proteins matching the same set of peptides:

[gi|52082665](#) Mass: 23562 Score: 159 Matches: 2(2) Sequences: 2(2)
monoclonal antibody light chain [Mus musculus]

2. [gi|1421648](#) Mass: 57031 Score: 114 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
Chain A, Conformational Variability In The Refined Structure Of The Chaperonin GroEL At 2.8 Angstrom Resolution

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 33	1845.9351	1844.9278	1844.9116	0.0162	0	114	8.3e-08	1	U	K.DTTTIIDGVGEEAAIQGR.V

Figura 36 Análisis de los péptidos correspondientes a la digestión de la muestra DbTnT comparados con bases de datos públicas. En este caso se identificó de forma significativa la región variable del anticuerpo monoclonal anti-Tn así como un fragmento de la chaperonina Groel. Se detalla la descripción para las dos primeras proteínas.

DbTn expresado en *Drosophila*

Identificación por espectrometría de masa de DbTn expresado en *Drosophila*. Pico correspondiente al dímero diferenciando dos bandas denominadas "up" y "down".

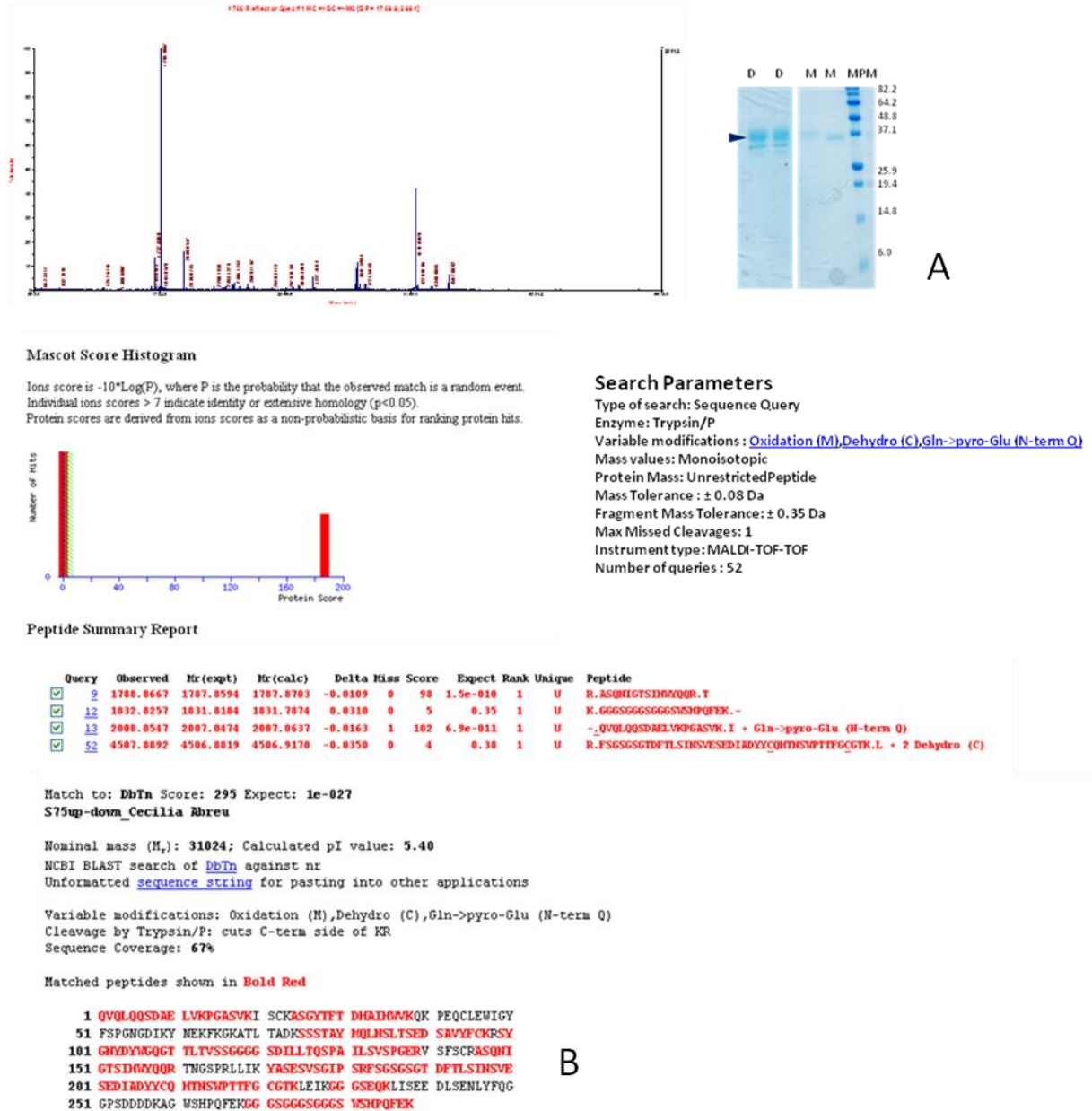


Figura 37. Análisis por espectrometría de masa de la banda procedente de la fracción dimérica de DbTn de mayor peso molecular. **A.** Espectro de masa obtenido en modo reflector y gel de SDS-PAGE desde el cual se purificó. **B.** Análisis de los péptidos identificados con el software MASCOT, se detalla la comparación de los resultados experimentales con fragmentos teóricos de digestión con Tripsina a partir de la secuencia aminoacídica de DbTnT. Se identificó de forma significativa que la proteína analizada corresponde a DbTnT con una cobertura de secuencia del 67%.

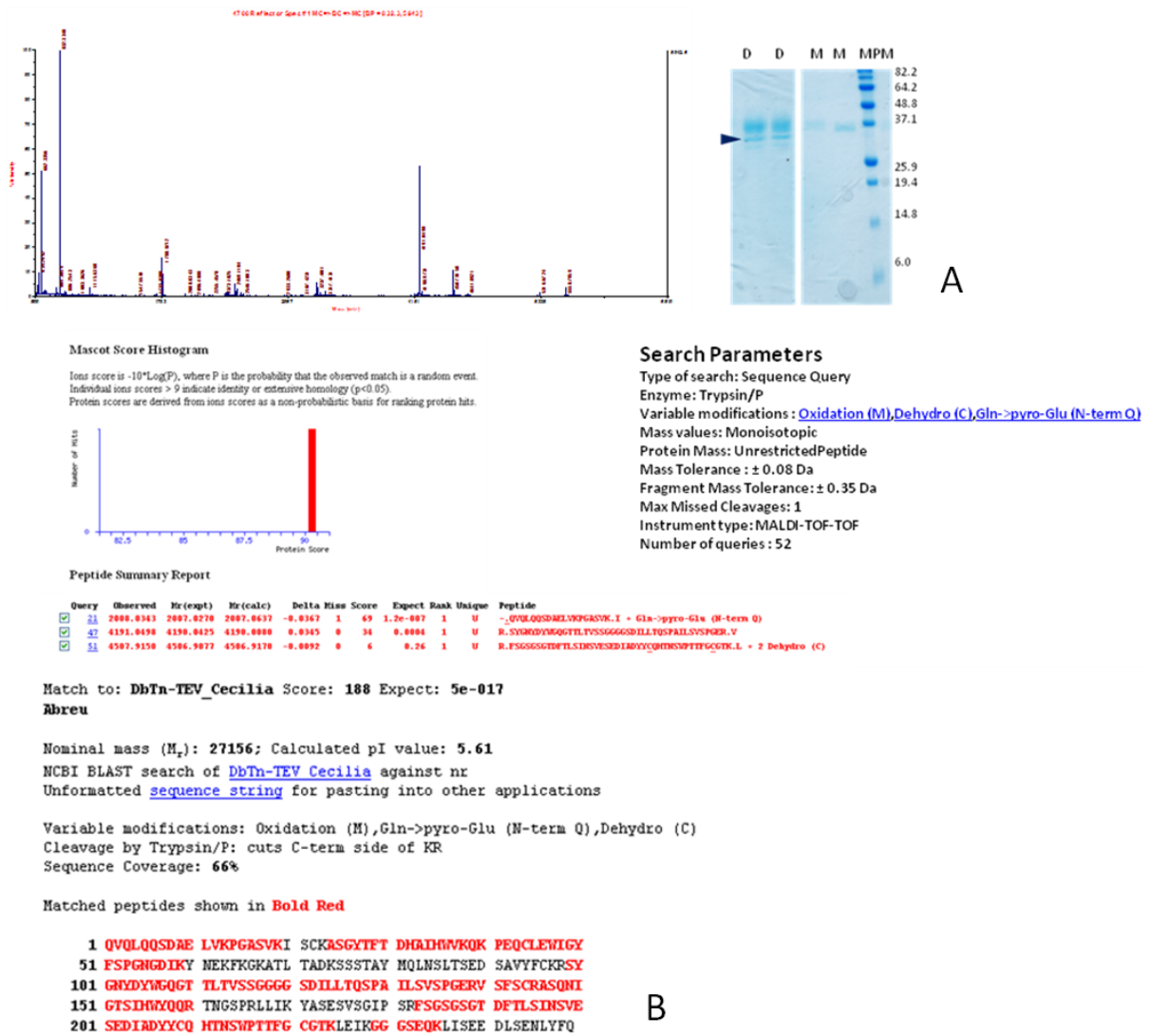


Figura 38 Análisis por espectrometría de masa de la banda procedente de la fracción dimérica de DbTn de mayor peso molecular. **A.** Espectro de masa obtenido en modo reflector y gel de SDS-PAGE desde el cual se purificó. **B.** Análisis de los péptidos identificados con el software MASCOT, se detalla la comparación de los resultados experimentales con fragmentos teóricos de digestión con Tripsina a partir de la secuencia aminoacídica de DbTnT. Se identificó de forma significativa que la proteína analizada corresponde a DbTn sin el doble streptag denominada "DbTn-TEV" con una cobertura de secuencia del 66%.