
GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO QUIMÉRICO ANTI-IL-23

Lic. Diana Pérez Etcheverry

*Tutora: Dra. Carmen Lorenzo
Laboratorio de Biotecnología del Polo
Tecnológico de Pando. Facultad de Química-
UDELAR.*

*Maestría en Biotecnología. Facultad de
Ciencias-UDELAR*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis hubiese sido imposible sin el aporte y la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a concluirse. Por ello, dedico este espacio para expresar mi firme agradecimiento con ellas.

El primer agradecimiento quiero hacerlo llegar a mi principal impulsora la Dra Carmen Lorenzo. Quiero agradecerle no solo por aceptarme para realizar esta tesis de maestría bajo su dirección, sino por su apoyo y confianza en mi trabajo, esto me sirvió para el desarrollo de esta tesis pero principalmente en mi formación como investigadora. Quiero recalcar su importante aporte, su disponibilidad, paciencia y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Su actuación como tutor, sin ninguna duda ha enriquecido el trabajo realizado y mi persona.

Quiero agradecer a María del Carmen Molina, Roberto Zuñiga y Pablo Sotelo del laboratorio de “Unidad de Anticuerpos Recombinantes y del Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune del ICBM”, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que me proporcionaron material, pero principalmente fueron un constante apoyo de conocimiento y experiencia para el desarrollo de esta tesis.

Quisiera extender mis agradecimientos a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología del Polo Tecnológico de Pando: Susana Cáceres, Iris Miraballes, Geraldine Rinsky, Sandra Pérez y Alberto Nieto, por su apoyo y colaboración. Un agradecimiento especial a Silvina Rossi por su aporte en la revisión de la redacción de este documento y en la síntesis del péptido. También al resto de los integrantes del IPTP, especial a la Dra. Alejandra Rodríguez del área de analítica por su aporte en el análisis de HPLC MS/MS.

Por último y no menos importante un agradecimiento muy especial para mi familia y amigos.

Se agradece a las partes financiadoras. Este trabajo fue financiado por:

- 2007. Proyecto de Generación de un Anticuerpo Quimérico. PEDECIBA-Química.
- 2008 Fondo PEDECIBA- Química del Dr. Alberto Nieto.
- 2009. Fondo de Investigador Nivel I de la Dra. Carmen Lorenzo.
- 2009. Proyecto CSIC iniciación.
- 2010. Beca de Movilidad, CSIC. Pasantía a realizarse en octubre-noviembre de 2010 en la Unidad de Anticuerpos Recombinantes y del Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune del ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

ÍNDICE

Abreviaturas	7
Resumen	9
Introducción	10
Objetivos	27
Materiales y Métodos	29

Generación de un anticuerpo monoclonal anti-p19

<i>1) Producir la proteína blanco p19 recombinante</i>	29
Análisis informático de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la p19.....	29
Clonado de la secuencia codificante de p19 en TOPO TA.....	29
Clonado de la secuencia codificante de p19 en pGEX 2T	30
Expresión de GST-p19.....	31
Solubilización de cuerpos de inclusión.....	32
Purificación de GST-p19.....	33
Clonado de p19 en pET28a.....	34
Expresión de his-p19.....	34
Solubilización de cuerpos de inclusión.....	35
Purificación de his-p19.....	36
<i>2) Seleccionar y generar un péptido sintético de la secuencia de la p19</i>	37
a) Análisis computacional de la secuencia de la p19 para seleccionar un péptido a sintetizar	37

b) Realizar la síntesis química del péptido seleccionado.....	37
c) Realizar conjugaciones del péptido	37
Conjugación del péptido con proteínas portadoras.....	37
Conjugación del péptido con si mismo.....	38
Conjugación del péptido con un polímero sintético	38
Purificación de conjugados	38
3) <i>Generar un mAc anti-p19</i>	38
a) Obtener respuesta frente a la p19 inmunizando ratones Balb/C	38
b) Generar células híbridas con la fusión de células eucariotas SP2/0 con linfocitos B de ratones inmunizados	39
Fusión.....	39
c) Seleccionar hibridoma productor de mAc específico frente a la p19.....	40
Determinación del Isotipo por ELISA de captura.....	41
Derivatización con Iodoacetamida	41
Evaluación de la reactividad del mAc por Western Blot.....	42

Generación de un anticuerpo quimérico recombinante anti-IL-23

4) <i>Quimerización del mAc obtenido</i>	42
a) Clonar las regiones variables del mAc seleccionado	42

Purificación de ARN.....	42
Diseño de cebadores para amplificar la secuencias variables μ y k del mAc.....	43
Amplificación y clonado de las regiones variables.....	43
b) Generar los plásmidos quimérico.....	44
5) Expresión del Ac quimérico.....	48
a) Determinación de la concentración de antibiótico para la selección de los transfectomas en células CHO-K1.....	48
b) Co-transfección de los plásmidos quiméricos en células CHO-K1 para la generación de transfectomas estables secretores de Ac quiméricos.....	48
c) Evaluación del Ac quimérico obtenido.....	49
Resultados y Discusión.....	51

Generación de un anticuerpo monoclonal anti-p19

<i>Generación de la p19 recombinante</i>	<i>51</i>
Clonado de la secuencia codificante de p19 en pGEX 2T	52
Clonado de p19 en pET28a.....	55
<i>Generación del péptido sintético de la secuencia de la p19.....</i>	<i>57</i>
Conjugación del péptido con proteínas portadoras	59
Conjugación del péptido con si mismo.....	59
Conjugación péptido con un polímero sintético	59
<i>Generación del mAc anti-p19.....</i>	<i>59</i>

Generación de un anticuerpo quimérico recombinante anti-IL-23.

<i>Quimerización del mAc obtenido.....</i>	<i>61</i>
--	-----------

Expresión del Ac quimérico.....65

Figuras.....67

Conclusiones.....99

Anexo I.....101

Bibliografía.....106

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

ACF: Adyuvante completo de Freund

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ADNcs: Ácido desoxirribonucleico copia simple cadena

Ag: antígeno

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

ARN: Ácido ribonucleico (ARNr -ribosómico; ARNt-transferencia; ARNm-mensajero)

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolyfosfato p-Toluidino Sal

BrEt: Bromuro de Etidio

BSA: Sigla en inglés de Seroalbumina bovina

Cadena H: Cadena pesada

Cadena L: Cadena liviana

CDR: Sigla en inglés de Región Determinante de Complementariedad.

CPAs: Células presentadoras de antígenos

DEMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMF: Dimetilformamida

DO: Densidad óptica

DTT: Ditiotreitól

E.coli: *Escherichia coli*

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Sigla en inglés de Enzimoimmunoensayo

EMBL-EBI: Sigla en inglés de Instituto Europeo Bioinformático

EtOH: Etanol

FA: Fofatasa alcalina

FDA: Siglas en Inglés de la Administración de Drogas y Alimentos ¹

GST: Sigla en inglés de Glutación S-Transferasa

h: horas

HAMA: Sigla en inglés de Respuesta de anticuerpos humanos frente a Ac de ratón

HAT: Hypoxantina de Sodio (5 mM), aminopterina (20 µM), timidina (0.8 mM)

HEPES: Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico)

HT: Hypoxantina de Sodio (10 mM), timidina (1.6 mM)

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

K_A : Constante de Afinidad

K_D : Constante de Disociación

KLH: Sigla en inglés de Hemocianina de Keyhole Limpet

LB: Luria Bertani

mAc: Anticuerpo monoclonal

MES: ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico

min: minutos

Mr: Masa relativa

NBT: Sigla en inglés de Cloruro de Nitro-Blue Tetrazolio

o/n: toda la noche

OPD: o-dianazina, o-fenilenodiamina

pb: Pares de bases

PBS: Sigla en inglés de Tampón Fosfato Salino

PBS-T: Sigla en inglés de Tampón Fosfato Salino-Tween 20.

PCR: Sigla en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa

pI: Punto isoeléctrico.

P(MAMVE): Sigla en inglés de copolímero Maleico anhídrido-alt-metil vinil éter.

PO: Peroxidasa

RACE: Sigla en inglés de Amplificación Rápida de extremos de ADNc.

RPMI: Sigla en inglés de Instituto Roswell Park Memorial

SFB: Suero Fetal Bovino.

SDS-PAGE: Sigla en inglés de Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SOC: Sigla en inglés de Medio Super Optimo

SPDP: N -Succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato

TAE: Tampón Tris-Acético-EDTA

T_m : Temperatura de unión de los cebadores.

TMB: Tetra metil Benzidina

T20: Tween 20

V_k: Variable k

V_μ: Variable μ

RESUMEN

El desarrollo de anticuerpos con fines terapéuticos ha crecido de forma importante en la última década y ya están establecidos como una valiosa opción terapéutica². Técnicas moleculares, han permitido la generación de anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos (comparten estructura ratón-humana o son totalmente humanos) que presentan menor inmunogenicidad y a su vez son más eficientes en desencadenar los mecanismos efectores^{3,4}. En este trabajo se planteó la construcción y expresión de un anticuerpo quimérico capaz de reconocer selectivamente la interleuquina 23 (IL-23), una interleuquina clave en enfermedades autoinmunes con inflamación crónica⁵⁻⁹. Para ello se partió de un obteniendo un hibridoma secretor de un monoclonal de ratón generado contra la subunidad menor de la IL-23, (IL23p19), que la distingue dentro de su familia. El anticuerpo quimérico ratón-humano se creó usando dos plásmidos eucariotas; uno de ellos portando la construcción quimérica para cadena liviana ratón-humano y el otro el gen quimérico para cadena pesada ratón-humano. La expresión de la inmunoglobulina quimérica se logró por cultivo de transfectomas estables de células CHO-K1 transfectadas con ambos plásmidos simultáneamente. El anticuerpo quimérico expresado mostró reconocimiento específico no solo de la subunidad p19, contra la cual fue generado, sino también de la molécula completa de IL-23 recombinante y biológicamente activa, mostrándose como candidato para desarrollar una terapia dirigida en enfermedades con inflamación crónica.

INTRODUCCIÓN

USO DE LOS Ac EN TERAPIA

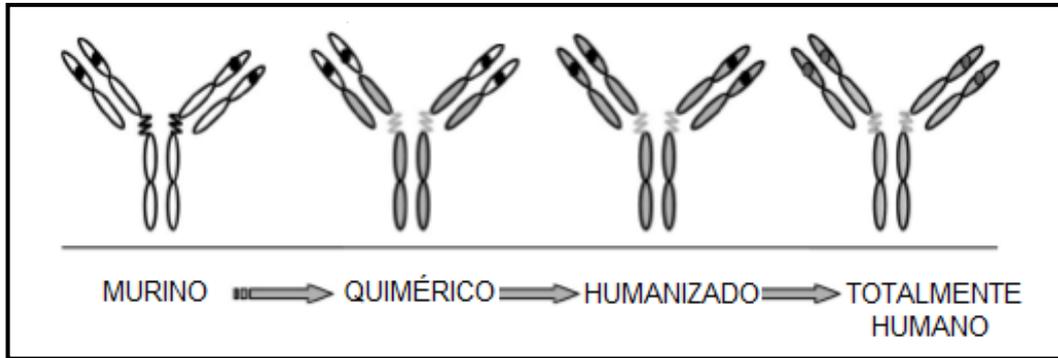
Los anticuerpos han sido utilizados para tratamiento de enfermedades en humanos ya desde finales del siglo XIX. A partir de 1893 se comercializa el primer suero de oveja contra difteria para uso clínico¹⁰ y esta práctica continúa por varios años, pero a partir de la década de 1930 comienza a perder importancia para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Ésta, va siendo reemplazada paulatinamente por terapia con antibióticos, más segura con respecto a las desventajas que significaban las reacciones adversas generadas por el uso de sueros animales en humanos. Se realizaron varios intentos de mejora para superar esas limitaciones, como por ejemplo la utilización de preparaciones de inmunoglobulinas (Igs) o sueros humanos, pero a su vez estos presentaban desventajas como la variación entre lotes y la transmisión de enfermedades^{2,11}.

La aparición de los anticuerpos mAcs al final de los 70 llegó con la promesa de salvar estas limitaciones, ya que al ser una técnica de producción *in vitro*, se contaría con un producto final totalmente controlado y estandarizado¹². El éxito clínico fue escaso, el 50% de los pacientes tratados con mAcs generaron una respuesta de anticuerpos frente a los anticuerpos de ratón⁴ (respuesta HAMA), a su vez las funciones efectoras desarrolladas por los mAcs no eran eficientes, al igual que la vida media de los mismos^{13,14}.

Usando ingeniería genética se comenzó a tratar de mejorar estas limitaciones, con estrategias como la quimerización (sustitución de la región constante del monoclonal de ratón por la región constante humana^{15,3}), lo cual teóricamente disminuiría la respuesta HAMA y a su vez las funciones efectoras serían más eficaces¹⁶⁻¹⁹. Si bien muchos estudios demostraron que algunos anticuerpos quiméricos pueden eludir la respuesta HAMA, aún siguen siendo inmunogénicos por su región variable de ratón²⁰, por lo cual se pasó a la humanización parcial o total de los Ac terapéuticos². La humanización implica transferir los CDRs del mAcs de ratón a la IgG humana, mientras que los anticuerpos totalmente humanos^{21,22} se obtienen a partir de bibliotecas de Anticuerpos humanos construidas artificialmente en distintos sistemas de expresión (Fagos²³, de ARNm, ribosomas, y de levaduras²³) o usando ratones transgénicos para Ig humana^{24 25}.

Estas estrategias han hecho que en los últimos años los Ac emerjan nuevamente como un importante fármaco para terapias frente a enfermedades, ya no frente a enfermedades infecciosas sino a enfermedades autoinmunes y cáncer (*Tabla 1*).

El potencial beneficioso de este tipo de terapia para dichas enfermedades está dado por la especificidad que ofrece el Ac terapéutico, frente a la molécula blanco. De esta manera se evita el daño de células normales o la inmunosupresión del paciente, como sucede con la mayoría de los fármacos usados para el tratamiento de estas enfermedades (quimioterapia, corticoides)^{26,27}.



Sharkey, R. M. & Goldenberg, D. M. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin* 56, 226-243 (2006).

Figura 1: Representación esquemática del proceso involucrado en la reducción de la inmunogenicidad de los mAc de ratón. En el Ac quimérico son transferidas las regiones V_L y V_H del mAc de ratón a la IgG humana. En un Ac humanizado solo se transfieren los CDRs con algunas regiones flanqueantes que mantienen la estructura conformacional de los CDRs, desde el mAc de ratón a la IgG humana. Los Ac completamente humanos pueden obtenerse mediante el procedimiento de obtención de mAc, inmunizando ratones transgénicos que producen IgGs humanas o seleccionarse a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos expresadas en fagos²⁸.

Tabla 1: Nuevos medicamentos en estudio para enfermedades autoinmunes e inflamatorias²⁷.

Aps: artritis psoriásica; AR: artritis reumatoide; ES: esclerosis sistémica; LES: lupus eritematoso sistémico; PDE-4: fosfodiesterasa-4; sGC:gualinato ciclasa soluble.

AR	LES	ES	Espondiloartropatías y Aps	Vasculitis sistémica
Mavrilimab (anti-GM-CSF)	Epratuzumab	Riociguat (estimulantes de la sGC)	Apremilast (anti-PDE4)	Alemtuzumab (anti-CD52)
Tabalimab (anti-BlyS)	Anti-CD22	Macitentan (antagonista de la Endotelina 1)	Ustekinumab (anti-IL12/23)	
Anti-interleucina-1beta	Rontalizumab (anti-INF alfa)	Anti-TGF-Beta 1	Secukinumab (anti-IL-17a)	
Clazakizumab (anti-IL-6)	Tabalumab (anti-BLyS)			
Ixekizumab (anti-IL-17)				
Sarilumab (anti-IL-6 subunida alfa)				
Sarilumab (anti-IL-6)				
Secukinumab (anti-IL-17a)				

Gómez-Puerta, J. A. & Quintana L, G. Nuevos medicamentos en el "Pipeline" para las enfermedades autoinmunes: nuevas opciones y nuevos retos. *Revista Colombiana de Reumatología* 21, 51-56 (2014).

GENERACIÓN DE UN Ac TERAPÉUTICO

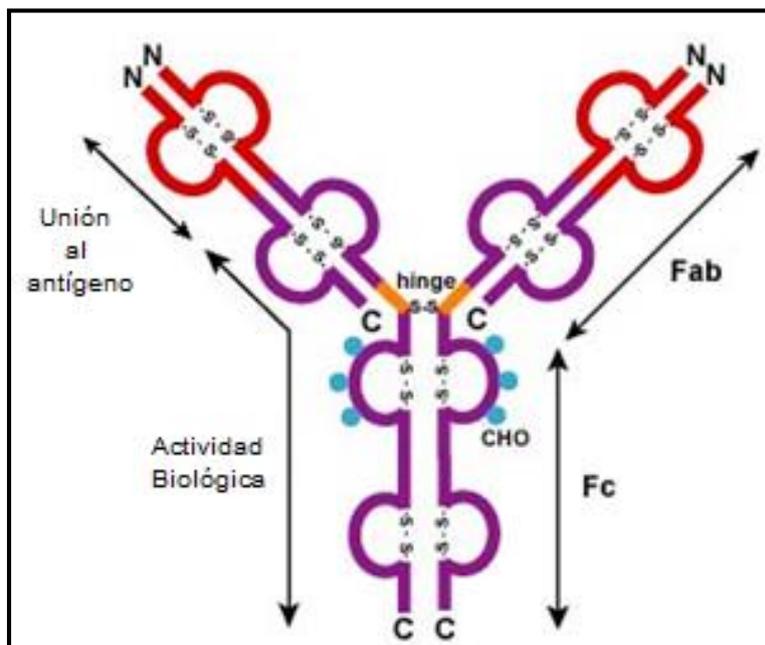
El primer paso para la generación de un Ac terapéutico es definir cuál será el blanco sobre el cual se pretende ejercer una acción terapéutica. Para ello, se seleccionarán potenciales moléculas involucradas en la enfermedad de interés, cuyo rol patogénico esté estudiado y definido. Seguidamente, se procederá a obtener un Ac con las características de especificidad, afinidad, subtipo de Ig necesarias para lograr el mecanismo efector más adecuado. Posteriormente, se realizarán los ensayos *in vitro*, luego ensayos *in vivo* con animales y finalmente a ensayos clínicos con pacientes²⁹.

La acción terapéutica dependerá entonces directamente de las características estructurales del anticuerpo conseguido; afinidad por el antígeno (molécula blanco) y funciones efectoras de la cadena pesada. A continuación se reporta una breve descripción de la estructura de los anticuerpos.

SUPERFAMILIA DE INMUNOGLOBULINAS

ESTRUCTURA

Los Ac constituyen una familia de proteínas plasmáticas conocida como Inmunoglobulinas. La estructura básica de las Igs, está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) idénticas entre sí (de unos 55 a 70kDa) y dos cadenas livianas (L) idénticas entre sí (de aproximadamente 24kDa). Las dos cadenas pesadas están unidas covalentemente por uno o varios puentes disulfuro y cada cadena H está unida a una cadena L a través de otros puentes disulfuros (*Figura 2*)³⁰.



http://patoral.umayor.cl/inmunodef/ap_inmuno/Image13.jpg

Figura 2: Estructura básica de una Ig. Una molécula de Ig está formada por cuatro polipéptidos; dos polipéptidos idénticos de tamaño mayor (cadenas polipeptídicas pesadas) y dos polipéptidos idénticos de tamaño menor (cadenas polipeptídicas livianas), unidas por puentes disulfuro (S-S) y otros enlaces no covalentes. El contacto con el epítipo del antígeno se establece en un punto de unión específico: el paratope, ubicado en la región variable de cada anticuerpo, formada por los extremos N-ter de las cadenas pesadas y livianas (V_H , V_L). Existen dos regiones variables y dos paratopes por estructura básica de las moléculas de Ig. El resto de la molécula presenta una estructura constante, común a todas las Igs de la misma clase. El punto de bifurcación, donde existen dos (o más) puentes disulfuro, constituye la región de la bisagra.

La estructura tridimensional permite reconocer en cada una de las cadenas que la conforman, regiones de 110 aminoácidos aproximadamente, que adoptan un plegamiento compacto particular y exclusivo de la superfamilia de las Igs que comprende éstas y otras proteínas del Sistema Inmunológico, denominado dominio de Ig.

La estructura terciaria de las cadenas polipeptídicas de las Igs forma dominios globulares característicos que son compartidos por muchas otras moléculas relevantes en el sistema inmune. A todas estas moléculas con dominios globulares semejantes a los de las Igs, se les engloba en la llamada superfamilia de las Igs. Tanto las cadenas L como las cadenas H presentan estos motivos estructurales de unos 110 aminoácidos de longitud, que se pliegan independientemente en un dominio globular común, denominado dominio de inmunoglobulina. Este dominio, está formado por dos capas de hoja β compuestas por tres a cinco hebras de cadenas polipeptídicas antiparalelas. La asociación entre las

cadenas H y L es tal que los dominios V respectivos (V_H y V_L) están emparejados y lo mismo ocurre con los dominios constantes C_{H1} y C_L . La variabilidad de secuencia a lo largo de los dominios V no está distribuida regularmente. Muchos aminoácidos están conservados, particularmente aquellos importantes para el mantenimiento de la estructura de plegamiento del dominio. Para las cadenas H como para las L pueden identificarse tres regiones de alta variabilidad de secuencia, que se han denominado regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Los segmentos de secuencia entre las regiones hipervariables son relativamente invariantes y se denominan regiones flanqueantes (FR). Las regiones CDR se encuentran alejadas en la secuencia lineal, pero quedan muy próximas cuando la secuencia se pliega para formar la región V tridimensional. Cuando los dominios V_H y V_L se emparejan, las regiones CDR de cada dominio quedan muy próximas creando una zona o región hipervariable en el extremo del fragmento V, que constituye el sitio de unión al antígeno³⁰. Las regiones constantes de las cadenas H y L definen los isotipos. Existen cinco clases o isotipos de Igs en humanos (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE) definidas por la secuencia nucleotídica de la región constante de su cadena H (μ , γ , α , δ o ϵ) y dos clases de cadena L, κ y λ . Las distintas clases de Igs presentan localización anatómica diversa y funciones biológicas características.

FUNCIÓN

Las Igs tienen dos funciones separables desde el punto de vista de su estructura. El dominio variable (V) que permite el reconocimiento y unión al antígeno se denomina fragmento Fab y el dominio de la molécula de Ig que asume las funciones efectoras (Activación de Complemento; Oponización; Citotoxicidad mediada por Ac (ADCC)³¹) se denomina región constante (C) o fragmento Fc. Las diversas clases de Igs tienen distinta localización anatómica, tiempo de vida media y además se distinguen por desempeñar en mayor o menor grado cada una de las funciones asociadas al fragmento Fc.

CARACTERÍSTICAS DE LA MOLÉCULA DE Ac A TENER EN CUENTA PARA EL DESARROLLO DE UN Ac TERAPÉUTICO

MECANISMOS EFECTORES

Las líneas de acción para un Ac terapéutico son muy amplias, por ejemplo: Transporte y liberación de radioisótopos ó citostáticos en blancos celulares; Inducción de apoptosis de la célula marcada por el anticuerpo; Neutralización de toxinas en infección o citoquinas en enfermedades crónicas; Eliminación de células tumorales u organismos; Intervención en la actividad celular². Por lo mismo, cuando se está desarrollando una molécula de Ac con fines terapéuticos hay que tener claro varios aspectos tecnológicos además del reconocimiento específico del blanco terapéutico, a saber: en que extensión se pretende hacer uso de los mecanismos efectores propios o inducidos por la Ig ó si se quiere utilizar como portadora de otra molécula efectora, además de determinar la importancia de la vida media a la que se aspira para el potencial fármaco.

Una de las características a tener en cuenta es el mecanismo efector que se desee lograr.;

Neutralización: Este mecanismo consiste en que el anticuerpo se une al antígeno y no le permite unirse a un receptor para causar daño. El Ac terapéutico puede neutralizar toxinas en infección, como citoquinas en enfermedades crónicas. Este mecanismo efector depende del fragmento Fab y no requiere la participación de la porción Fc del anticuerpo.

Activación del complemento: Cuando están formando complejos con antígenos, los anticuerpos pueden iniciar por medio de su fragmento Fc la cascada del complemento.

Opsonización: Este es el mecanismo mediante el cual una molécula facilita la fagocitosis de una partícula al “etiquetarla” para que los fagocitos la reconozcan. Los anticuerpos pueden realizar esta función porque sus fragmentos Fab se unen a los antígenos de las partículas a fagocitarse y por su fragmento Fc se unen a los fagocitos, ya que estos expresan receptores para este fragmento llamados receptores para Fc (FcR). Existen receptores para los isotipos IgG, IgA e IgE. Cuando la partícula opsonizada por el anticuerpo se une a los receptores para Fc y los entrecruza se activa la fagocitosis de la partícula o célula que contiene el antígeno.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos: Cuando los anticuerpos cubren a una célula que expresa en su membrana antígenos que el anticuerpo reconoce con sus fragmento Fab, esta puede ser reconocida por células NK, macrófagos o eosinófilos que expresan receptores para la porción Fc. Estas células se activan y liberan el contenido de sus gránulos hacia la célula que está cubierta de anticuerpos. Esto produce la muerte de esta célula por apoptosis por lo que el mecanismo efector se llama citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Otra característica a tener en cuenta es el isotipo de Ig con el que se va a quimerizar, ya que estos tienen distintas funciones y distribución biológica:

IgM: Este isotipo es muy eficiente para activar el complemento y también puede realizar neutralización y opsonización.

IgD: En humanos se secreta una cantidad muy pequeña y no se conoce si la forma secretada tiene alguna función.

IgA: Esta tiene una forma que circula en la sangre y el líquido extracelular y otra forma que se sale en las secreciones corporales (leche materna, sudor, lágrimas, secreciones del tracto digestivo, respiratorio y génito-urinario). La forma que circula en la sangre es un monómero, a forma que sale en las secreciones es un dímero y se llama IgA secretoria (sIgA). Esta sale a través de las células epiteliales que tienen un receptor en su lado basal llamado receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR). Este receptor se une al fragmento Fc de la sIgA, el complejo pIgR-sIgA entra a la célula epitelial y sale al exterior. Al salir se corta el pIgR y una parte queda unida a la sIgA, este fragmento se llama componente secretor. La IgA es eficiente para neutralización y opsonización.

IgE: La IgE se encuentra en cantidades muy pequeñas en el organismo, su concentración está aumentada en infecciones por parásitos, especialmente helmintos, y en alergias. Su principal acción es inducir la activación y degranulación de células que expresan receptores para su porción Fc (células cebadas, basófilos y eosinófilos).

IgG: Es el isotipo más abundante en la sangre y el líquido extracelular. Se produce luego de varios días de haber iniciado la respuesta inmune adaptativa porque requiere el cambio de isotipo. Su vida media es larga y tienen afinidad alta por los antígenos. Pueden ser transportados a través de la placenta al feto por medio de un receptor llamado FcRn que reconoce su fragmento Fc. Las IgG son muy eficientes para activar el complemento, neutralización, opsonización e inducción de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Debido a estas características la IgG es la base de la mayoría de los anticuerpos terapéuticos.

Existen 4 subtipos diferentes (IgG1, 2, 3 y 4) que tienen diferencias pequeñas en su estructura y función. La IgG1 y 3 son los subtipos más eficientes en desarrollar los distintos mecanismos efectoros que llevan a cabo este tipo de Ig, a su vez la IgG1 es la que presenta mayor vida media de estos dos subtipos.³²

Las funciones efectoras se pueden manipular variando la región Fc del Ac; un ejemplo lo ofrece la IgG1 humanizada a la cual se le realiza mutaciones puntuales en la región Fc, incrementando la afinidad de unión con FcγIIIa lo que promueve un aumento en el mecanismo efector ADCC (según

ensayos *in vitro*)³³. Variar la interacción entre IgG y su receptor, también es una manera de incrementar o disminuir la vida media de la IgG terapéutica³⁴.

INGENIERIA DE ANTICUERPOS

Otro aspecto a tener en cuenta para el desarrollo de un Ac terapéutico es si se quiere desarrollar y trabajar con toda la molécula de Ac o con fragmentos de los mismos, esto está muy relacionado con el tipo de mecanismo efector que se necesita.

Las ventajas de utilizar Ac completos incluyen el hecho de que la región Fc desencadena la respuesta inmune, determinando la destrucción de las moléculas unidas. Las desventajas de estos incluyen su inhabilidad para penetrar en ciertos tejidos debido a su tamaño relativamente grande.

Existen varios tipos de fragmentos de Ac:

-Fab, Fab', (Fab')₂, y Fv: Fragmentos monovalentes F(ab) poseen un solo sitio de unión a antígeno, mientras que los fragmentos divalentes F(ab')₂ poseen dos regiones de unión a antígeno unidas por puentes disulfuro. La reducción de los fragmentos F(ab')₂ produce dos fragmentos monovalentes Fab', los cuales poseen un grupo sulfhidrilo libre el cual es útil para la conjugación con otras moléculas. Los fragmentos Fv son los fragmentos más pequeños conseguidos por digestión enzimática de anticuerpos clase IgG e IgM.

-ScFv, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, Bis-scFv, minicuerpo, Fab₂, Fab₃: Métodos de ingeniería genética permiten la producción de fragmentos variables de cadena única (ScFv), los cuales son fragmentos tipo Fv que incluyen los dominios VH y VL unidos por un péptido flexible. La manipulación de la orientación de los dominios V y el largo del conector y diferentes asociaciones crean diferentes formas de moléculas Fv: diacuerpo divalente, triacuerpos o tetracuerpos. Los minicuerpos son proteínas de fusión entre los fragmentos ScFv y CH₃ que se ensamblan en dímeros bivalentes, los fragmentos bis-ScFv son biespecíficos. Los métodos genéticos también son utilizados para crear dímeros Fab biespecíficos (Fab₂) y trímeros Fab trispecíficos (Fab₃).

-Anticuerpos de camélidos y nanocuerpos: Además de los anticuerpos convencionales, los camélidos poseen un subgrupo de anticuerpos de cadena pesada (hcAb) peculiares compuestos exclusivamente por homodímeros de cadena pesada, faltando las cadenas livianas. La porción Fab de estos anticuerpos es llamada VHH (dominio variable de anticuerpos de cadena pesada). Los nanocuerpos son dominios recombinantes derivados de VHH capaces de unir antígenos. Son muy estables y pueden ser producidos fácilmente en enormes cantidades utilizando sistemas tradicionales tales como las bacterias, representando una herramienta prometedora para la investigación y la terapéutica. Los nanocuerpos también pueden ser expresados directamente *in vivo* y reconocer sus blancos *in vivo*.

Los fragmentos ofrecen ventajas sobre los anticuerpos de tamaño completo en algunas aplicaciones, una ventaja es que los fragmentos son lo suficientemente pequeños como para infiltrarse en algunos tejidos en los cuales los anticuerpos de tamaño completo no pueden penetrar, lo cual ayuda en procedimientos terapéuticos. Otra ventaja es que los fragmentos de anticuerpos generalmente carecen de glicosilación, permitiendo su producción en sistemas de expresión procariotas, lo cual permite ahorrar tiempo y costos. Sin embargo, los fragmentos que carecen del dominio Fc tiene una baja vida media al ser administrados al paciente y son incapaces de desencadenar los mecanismos efectores mediados por los Fc ³².

SELECCIÓN DEL BLANCO PARA LA GENERACIÓN DEL Ac TERAPÉUTICO PARA ESTE TRABAJO

En la respuesta inmune adaptativa la diferenciación de células T colaboradoras (o CD4+) vírgenes en células T efectoras, se caracteriza por el conjunto de citoquinas que secretan; diferentes tipos o linajes de células T efectoras, secretarán conjuntos diferentes de citoquinas también denominado perfil. El tipo de célula T efectora resultante, está dirigido a su vez, por la activación del Sistema Inmune Innato y las citoquinas secretadas por las CPAs^{35,36}.

El linaje Th17 surgió por el descubrimiento de una nueva familia de citoquinas, la familia IL-17 ³⁷⁻³⁹. La IL-17 es una familia de citoquinas que incluyen 6 miembros, de los cuales los últimos 3 son potentes proinflamatorios. Las IL-17 se designan como: IL-17A hasta IL-17F, la IL-17E también es llamada IL-25. La IL-17A y la IL-17F pueden ser secretadas por células Th17, células T CD8+ , células T $\gamma\delta$, células NK y neutrófilos, sin embargo la IL-17B y la IL-17C no son producidas por los linfocitos. La IL-25 estaría involucrada en la respuesta tipo Th2. IL-17 estimula a células epiteliales, endoteliales y fibroblastos a producir otras citoquinas proinflamatorias y quimoquinas, como: IL-6, IL-8, GM-CSF y MCP-1. También sinergiza otras citoquinas como TNF- α y IL-1 β .

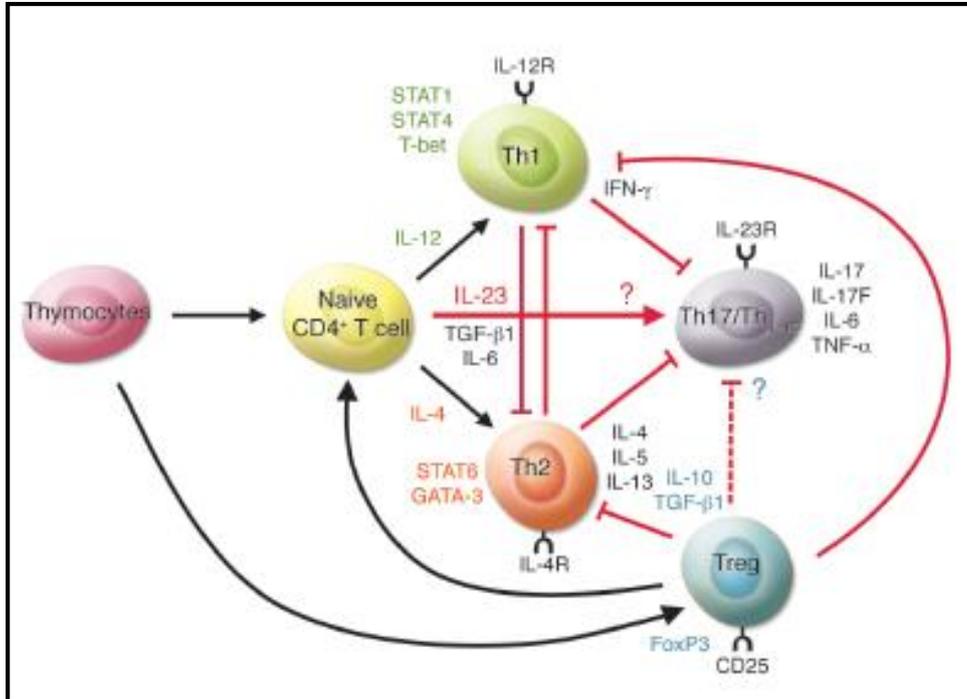
Este linaje aparece como una nueva arma del sistema inmune adaptativo especializada en aumentar la protección del hospedador frente a algunos hongos y bacterias extracelulares, los cuales probablemente no pueden ser eliminados por los linajes Th1 y Th2 ⁴⁰⁻⁴⁵. La diferenciación y expansión de células T CD4+ vírgenes a este linaje, resumidamente están estimuladas por la combinación de la acción del Factor de Crecimiento Tumoral (TGF- β), la IL-21, la IL-6 y la IL-23, que son secretadas por las CPAs. Se ha comprobado que el IFN- γ inhibe potencialmente el desarrollo de las Th17, al igual que la IL-4. El TGF- β reduce los niveles de IFN- γ (reduciendo células IFN- γ +) y como consecuencia induce el desarrollo de una pequeña pero apreciable fracción de Th17. Se ha

demostrado que la combinación el TGF- β y la IL-21 es suficiente para inducir la diferenciación de células T nativas en células Th17 y que la IL-1 β e IL-6 son importante para potenciar la expansión de las células Th17 de memoria⁴⁶.

Si se adiciona luego del TGF- β la IL-23, se incrementa la población de Th17. De la misma manera, la IL-23 por sí sola no promueve un desarrollo robusto de Th17, aunque esto se logra con la adición de TGF- β (tienen una cooperación sinérgica, pero actúan independientemente)^{47,48}. El receptor de IL-23 (IL-23R) es un heterodímero, en el cual la subunidad IL-12R β 1 se expresa constitutivamente en las células, pero no así el heterodímero completo. La función de TGF β en el desarrollo de Th17, es actuar como inductor de la expresión del IL-23R (heterodímero completo)⁴⁷. La IL-23 estimula fuertemente la producción de IL-17 en células T memoria (CD44^{high} y CD62^{low}) y estimula minoritariamente o no estimula la producción de IL-17 en células T indiferenciadas (CD44^{low} o CD62^{high}) (*Figura 3*)^{39,40}. Las Th17 también producen otros factores involucrados en la respuesta inflamatoria como son: IL-22, IL-21, IL-26, IL-8, IL-10, Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF9), CXCL1 y CCL20⁴⁶⁻⁴⁸. La IL-23/IL-17 tienen un papel importante en el desarrollo de inflamación crónica y en la defensa del hospedador frente a infecciones bacterianas^{6,49}.

En la inflamación crónica, el antígeno estimula las células dendríticas y macrófagos, las cuales producen IL-23, promoviendo así el desarrollo de células Th17. Las células Th17 producen IL-17, que amplifica el “priming”, lo que conlleva a una potente respuesta inflamatoria, por la inducción de una variedad de mediadores inflamatorios. La IL-23 también actúa en las células dendríticas y en los macrófagos en una manera autócrina o parácrina, estimulando la generación de citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- α . La IL-12 estimula a las células Th1 a producir IFN- γ y suprimir la diferenciación de Th17. Las Th1 podrían tener un papel en la regulación en el desarrollo de inflamación crónica. En una infección bacteriana, la IL-23 es rápidamente producida por los macrófagos activados y las células dendríticas en el sitio de la infección. Ésta, activa a células residentes en el sitio de la infección como Th17, células T CD8⁺ y células T $\gamma\delta$ a producir IL-17. La producción de IL-17 por dichas células, estimula la producción de GM-CSF en las células del estroma. IL-23/IL-17/GM-CSF reclutan neutrófilos en el sitio de infección, contribuyendo a la eliminación de las bacterias extracelulares. El IFN- γ aumenta la presentación antigénica por la inducción de la expresión de moléculas de MHC de clase II y activa células que producen moléculas citolíticas como perforinas y granzimas, las cuales promueven la eliminación de bacterias intracelulares (*Figura 4*).^{6,49,50}

Altos niveles de IL-17 se asocian con enfermedades inflamatorias crónicas como: Artritis Inducida por Colágeno (enfermedad inducida experimentalmente), Artritis Reumatoidea, Psoriasis, y Esclerosis Múltiple. ^{36,40,42-45,49}



Wakura, Y. & Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest 116, 1218-22 (2006).

Figura 3: La IL-23 promueve la producción de IL-17 por las células T colaboradoras CD4+. Los factores transcripcionales críticos para el desarrollo de Th1 (STAT1, STAT4, y T-bet) y Th2 (STAT6) no son requeridos para la inducción de Th17. IFN-γ e IL4, antagonistas entre sí, dirigen la diferenciación en Th1 y Th2 respectivamente y promueven su función. IFN-γ también suprime la diferenciación de Th17. Las T reguladoras son células CD4+ que suprimen la diferenciación y las funciones efectoras de las Th1 y Th2. Algunos estudios sugieren que las T reguladoras, secretoras de TGF-β inducen la diferenciación de Th17 a partir de células indiferenciadas en presencia de IL-6 (*in vitro*). 50,51

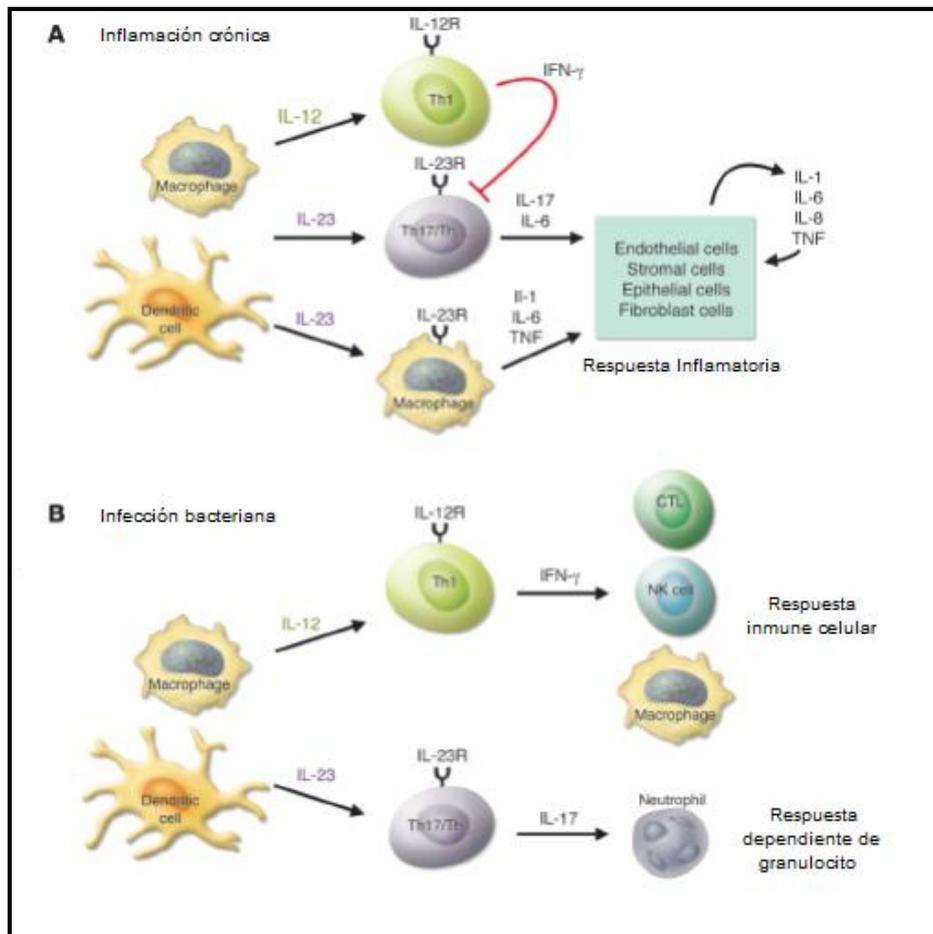


Figura tomada y modificada de Wakura, Y. & Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest 116, 1218-22 (2006).

Figura 4: Esquema del papel de IL-23/IL-17 en la inflamación crónica y en la infección bacteriana ⁵⁰.

Interleuquina 23 como blanco terapéutico

Analizando el rol de la IL-23 en el desarrollo de la respuesta del linaje Th17, y a su vez comprobado el rol patogénico de las IL-17 en algunas enfermedades autoinmunes, se propuso para este trabajo esta interleuquina como blanco terapéutico. A su vez, ya se ha elucidado el rol de la IL-23 en algunas enfermedades autoinmunes, estos estudios se han realizado con ratones knockout y con anticuerpos anti-p19 y anti-p40. Usando ratones knockout para IL-23 pero no para IL-12, se observó resistencia al desarrollo de Encefalomielitis Autoinmune experimental (EAE) y Artritis inducida por colágeno (CIA). ^{6,52,53}

Tratamientos como por luz UV, anti- TNF α o alefacepto (LFA-3/Ig), los cuales resultan en un detrimento de las citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-23, IL-12, IL-1, IL-18 e IFN γ , muestran una eficacia clínica. ^{62,63}

Artritis Reumatoidea (RA)

Bajo condiciones normales (personas sanas) la IL-17A está presente en el suero en bajas concentraciones, pero en algunos estudios, se reporta alto niveles en pacientes con RA ⁶⁴. In vitro, se demostró la producción de IL-17 junto con otras citoquinas como IL-6, TNF e IL-1 β , por parte del tejido sinovial de pacientes con RA. También se observó en estos pacientes la infiltración de linfocitos productores de IL-17 en el sinovio (70% de los pacientes). ^{36,56}

Esclerosis Múltiple (MS)

Estudios de células de sangre periférica de pacientes con MS, muestran que los monocitos derivados de células dendríticas, secretan más IL-23 comparado con los pacientes sanos, pero igual cantidad de IL-12 ⁶⁵.

Comparando los pacientes con MS en remisión versus los que están en estado clínico de exacerbación, estos últimos tienen más expresión IL-17 y además presentan infiltración de Th17 en el lugar de la inflamación ⁶⁶.

Enfermedades Inflamatorias Intestinales

Los niveles de p19 en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa son elevados en áreas inflamadas, mientras que no se observan diferencias en los niveles de p35. Aquí también se ven niveles elevados de otras citoquinas como: TNF α e IFN γ .

Los niveles en suero de IL-17 son significativamente más altos en pacientes con la enfermedad activa que en los pacientes con la enfermedad inactiva. ^{58,59}

Miastenia gravis (MG)

En esta enfermedad los síntomas son causados por la proliferación de IgG de gran afinidad contra receptores de acetilcolina en los músculos esqueléticos.

Se observó que ratones deficientes en IL-12, IL-23 y STAT-4 (factor de transcripción necesario para la señal intracelular de IL-12 y IL-23), son resistentes a la MG luego de la inducción de la enfermedad⁵⁵.

ANTICUERPOS DESARROLLADOS PARA LA VÍA TERAPÉUTICA IL-23/Th17

Hoy en día ya se encuentran en estudio avanzado o en el mercado varios anticuerpos que utilizan la vía terapéutica IL-23/Th17 (*Tabla 2*). El éxito obtenido con algunos de estos Ac hasta el momento, es otra de las razones por la cual se decidió seguir adelante utilizando la IL-23 como blanco terapéutico.

Con estos estudios se determinó que cuando se usan antagonistas de la vía IL-17A e IL-17AR estos actúan bien frente a Psoriasis, pero exacerban la enfermedad de Crohn⁶⁷. No está claro el mecanismo que lleva a esto, pero estudios en ratones muestran que las células linfoides de ratón producen IL-17A e IL-22 de manera independiente de IL-23 en respuesta a organismos intestinales. Estos niveles de expresión constitutivos parecen ser cruciales para el mantenimiento de la función de la barrera epitelial⁶⁸. Sin embargo, altos niveles de IL-17A e IL-22 inducida por IL-23 pueden ser patogénicos, produciendo lesiones de tejidos, en presencia de citoquinas inflamatorias adicionales, como IL-1, IL-6, GM-CSF y TNF α . La supresión de IL-23 a través de anti-IL-23p19 inhibe parcialmente la IL-17A y reduce la inflamación, mientras que la terapia anti-IL-17A neutraliza todas IL-17A protectoras⁶.

Tabla 2: Nuevos medicamentos y fase de estudio para enfermedades autoinmunes por la vía de acción terapéutica IL23/IL12. F1: Fase 1; F2: Fase 2; F3: Fase 3⁶.

Blanco terapéutico	IL-12/23p40					
Droga	Ustekinumab (CNTO 1275)	Briakinumab (ABT-874)				
Psoriasis	Aprobado	F3				
Artritis Psoriatica/	Aprobado					
Enfermedad de Crohn	F3	F2 TERMINADA				
Espondilitis anquilosante	F2					
Artritis Reumatoidea	F2					
Esclerosis múltiple	F2	F2				
Enfermedad de injerto contra huésped	F2					
Dermatitis Atópica	F2					
Hidradenitis supurativa	F2					
Cirrosis biliar primaria	F2					
Sarcoidosis	F2					
Lupus eritematoso sistémico	F2					
Enfermedad de behcet, uveítis						
Asma						
Síndrome del ojo seco						
Polimialgia reumática						
Diabetes tipo 1						
Blanco terapéutico	IL-23p19					
Droga	Tildrakizumab (SCH 900222/MK-3222/)	Guselkizumab(CNTO 1959)	BL-655066	AMG 139; MEDI-2070	LY3074828	LY2525623a
Psoriasis	F3	F3	F2	F1	F1	F1 TERMINADA
Artritis Psoriatica/		F2				
Enfermedad de Crohn	F1		F2	F2		
Espondilitis anquilosante			F2			
Artritis Reumatoidea		F2				
Esclerosis múltiple						
Enfermedad de injerto contra huésped						
Dermatitis Atópica						
Hidradenitis supurativa						
Cirrosis biliar primaria						
Sarcoidosis						
Lupus eritematoso sistémico						
Enfermedad de behcet, uveítis						
Asma						
Síndrome del ojo seco						
Polimialgia reumática						
Diabetes tipo 1						
Blanco terapéutico	IL-17A; IL-17RA					
Droga	Secukinumab (AIN 457)	Ixekizumab (LY2439821)	Brodalumab (AMG 827)			
Psoriasis	Aprobado	F3	F3			
Artritis Psoriatica/	F3	F3	F3			
Enfermedad de Crohn	F2 TERMINADA		F2 TERMINADA			
Espondilitis anquilosante	F3	F3				
Artritis Reumatoidea	F3	F2	F2 TERMINADA			
Esclerosis múltiple	F2					
Enfermedad de injerto contra huésped						
Dermatitis Atópica						
Hidradenitis supurativa						
Cirrosis biliar primaria						
Sarcoidosis						
Lupus eritematoso sistémico						
Enfermedad de behcet, uveítis	F3 TERMINADA					
Asma	F2		F2 TERMINADA			
Síndrome del ojo seco	F2					
Polimialgia reumática	F2					
Diabetes tipo 1	F2 TERMINADA					

Teng, M. W. L. *et al.* IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med* **21**, 719-729, doi:10.1038/nm.3895 (2015)

Basándonos en los datos presentados arriba se seleccionó la IL-23, una interleuquina clave en las enfermedades inflamatorias crónicas, como antígeno para la generación de un Ac quimérico con fines terapéuticos. Se generó un Ac completo dirigido contra un epítipo lineal de la subunidad p19 que es selectiva de la IL-23 . Si bien al momento de esta tesis, no hay evidencia de que el péptido seleccionado participe de la interacción con el receptor de interleuquina, el mismo está expuesto en la superficie de la proteína, con lo cual se espera que el Ac pueda ser de todas maneras neutralizante, por efecto estérico. Se decidió construir una molécula completa de Ac quimérico ratón-isotipo IgG1 humano para favorecer los procesos de eliminación de los inmunocomplejos y prolongar la vida media del fármaco

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la generación de un anticuerpo quimérico anti-IL-23, usando como estrategia la quimerización de un monoclonal de ratón reactivo contra una región definida de la IL-23p19

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Generación de un anticuerpo monoclonal anti-p19.

Se plantea la obtención de un anticuerpo monoclonal específico frente a la subunidad menor de la IL-23 usando como inmunógeno un péptido sintético de una región determinada de la p19. En esta etapa se proyecta obtener la p19 de forma recombinante, el péptido sintético y el monoclonal específico frente a dicho péptido.

1) Producir la proteína blanco p19 recombinante

- 1a) Clonar la p19 a partir de ADNc comercial.
- 1b) Expresión de la proteína recombinante.
- 1c) Purificación de la proteína recombinante.

2) Seleccionar y generar un péptido sintético de la secuencia de la p19.

- 2a) Análisis computacional de la secuencia de la p19 para seleccionar un péptido a sintetizar
- 2b) Realizar la síntesis química del péptido seleccionado.
- 2c) Realizar conjugaciones del péptido.

3) Generar un mAc anti-p19.

- 3a) Obtener respuesta frente a la p19 inmunizando ratones Balb/C.
- 3b) Generar células híbridas con la fusión de células eucariotas SP2/0 con linfocitos B de ratones inmunizados.

3c) Seleccionar hibridoma productor de mAc específico frente a la p19.

Generación de un anticuerpo quimérico recombinante anti-IL-23.

Para este objetivo se generarán 2 plásmidos conteniendo: uno, la secuencia quimérica ratón-humana correspondiente a la cadena H y otro la secuencia correspondiente a la cadena quimérica ratón-humana L. Posteriormente, se co-trasfectarán los plásmidos quiméricos en una línea celular eucariota adecuada para su expresión.

4) Quimerización del mAc obtenido.

4a) Clonar las regiones variables del mAc seleccionado.

4b) Generar los plásmidos quiméricos.

5) Expresión del Ac quimérico.

5a) Determinación de la concentración de antibiótico para la selección de los transfectomas en células CHO-K1.

5b) Co-transfección de los plásmidos quiméricos en células eucariotas para la generación de transfectomas estables secretores de Ac quiméricos.

5c) Evaluación del Ac quimérico obtenido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de un anticuerpo monoclonal anti-p19

1) Producir la proteína blanco p19 recombinante

1a) Clonar la p19 a partir de ADNc comercial.

1b) Expresión de la proteína recombinante.

1c) Purificación de la proteína recombinante.

Se trabajó con la secuencia nucleotídica codificante de la subunidad p19 de la interleuquina IL-23 humana, clonada en el plásmido pCMV6-XL5 (OriGene Technologies, Inc.).

Se creó un stock de transformantes con pCMV6-XL5/p19, transformando células XL-1 blue (Invitrogen, USA) competentes (Anexo I, A y F). Los transformantes se crecieron en LB agar /Ampicilina (0.1mg/mL) (Sigma, USA). Se verificó por PCR de colonia (Anexo I, G) la presencia de p19 en el plásmido pCMV6-XL5/p19 en las colonias crecidas, utilizando los cebadores Sentido v1.5 (5'GGACTTTCCAAAATGTCG3') y el Antisentido XL39 (5'TAATCCTGTTCCGACCACCC3') provistos por OriGene Technologies, Inc. La PCR se realizó usando una Tm de 59.5°C. Los resultados de la misma se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% (Anexo I, C). Se confirmaron las colonias positivas con un ensayo de restricción. Brevemente, se realizó la extracción del plásmido a dichas colonias con Isolate Plasmid Mini Kit (Anexo I, M), siguiendo las indicaciones del proveedor. Se digirió 100ng de pCMV6-XL5/p19 con *EcoRI* (Fermentas, USA), luego de la inactivación se agregó *NotI* (Fermentas, USA) a la reacción, repitiendo el ciclo de incubación e inactivación (Anexo I, B). Paralelamente, se realizaron 2 controles, digiriendo 100ng de pCMV6-XL5/p19 con cada enzima por separado. Las mezclas de digestión se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% con BrEt (Anexo I, C). Las colonias positivas se aislaron y almacenaron en LB 20% Glicerol a -80°C. Se secuenció el plásmido pCMV6-XL5/p19 con los cebadores v1.5 y XL39 (Anexo I, N).

Análisis informático de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la p19

Se analizó la secuencia aminoacídica p19 (GenBank ®: AAH67511.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con los programas SignalP 3.0 Server y NetNGlyc 1.0

Server (Technical University of Denmark, ExPASy Bioinformatics Resource Portal) y nucleotídica (GenBank®: NM_016584) con NEB cutter (Biolab Inc, New England).

Clonado de la secuencia codificante de p19 en TOPO TA

Se diseñaron los cebadores sentido y antisentido (P19 F y P19 R) para clonar la secuencia en el plásmido de clonado TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA), según las especificaciones del proveedor.

P19 F: 5'GGGAGAGCTGTG 3'

P19 R: 5'GGGTTAGGGACTCAGGG 3'

La reacción de PCR se realizó a una Tm de 56°C (Anexo I, G2). El producto de la misma se visualizó en un gel de agarosa 1.5% con BrEt (Anexo I, C). Brevemente, se mezcló 1 µL de producto de PCR; 4 µL de Agua*; 1 µL de Solución salina * y 1 µL de vector TOPO * (*componentes del Kit Topo TA Cloning). La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se transformaron células XL-1 blue competentes, con 4 µL de mezcla de ligación por choque térmico (Anexo I, A y F). Los transformantes se sembraron en LB agar/Kanamicina (0.02 mg/mL) (Sigma, USA) y se incubaron o/n a 37°C.

Se evaluaron los transformantes por PCR de colonia (Anexo I, G) utilizando los cebadores provistos por el Kit^x, la reacción se llevó a cabo a una Tm de 55°C.

^x M13F: 5'GTAAAACGACGGCCAG3'

^x M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'

Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% con BrEt (Anexo I, C). Se creció una de las clonas positivas en LB/Kanamicina o/n a 37°C, 200rpm de agitación, y se realizó un stock del cultivo con 20% de glicerol a -80°C.

Clonado de la secuencia codificante de p19 en pGEX 2T

Se clonó la secuencia codificante de p19 en el plásmido pGEX 2T (GE Healthcare, USA) (*Figura 13*). Para esto se diseñó un cebador que cuenta con una base (marcada en rojo; G) antes del inicio de la secuencia de la proteína. El cebador antisentido (P19EcoRIpGEX2T R) al igual que el de sentido, tienen un sitio de restricción para *EcoRI* (se muestran subrayados).

P19EcoRIpGEX2T F: 5´GGGAATTCT**G**AGAGCTGTG 3´

P19EcoRIpGEX2T R: 5´GGGAATTCTTAGGGACTCAGGG 3´

La reacción de PCR se realizó a una T_m de 56°C (Anexo I, G2), usando TOPO TA/p19 como molde. El producto de PCR se purificó por Kit (Anexo I, M) y se digirió 250ng del mismo con *EcoRI* (Anexo I, B).

Paralelamente, se digirió 100ng pGEX2T con *EcoRI*, con un paso final de desfosforilación (Anexo I, B y D). El producto de digestión-desfosforilación de pGEX 2T y de la digestión del producto de PCR se analizaron en un gel de agarosa 1% (Anexo I, C). Las bandas correspondiente al plásmido linealizado y a la secuencia codificante de p19, se purificaron desde el gel por kit (Anexo I, M). Posteriormente, se llevó a cabo la ligación con una relación molar inserto:plásmido de 6:1, en función de pmoles de extremos disponibles (32ng inserto p19:50ng pGEX2T) (Anexo I, E).

Se transformaron células XL-1 blue (Invitrogen, USA) competentes con 7µL de las mezclas de ligación (Anexo I, A y F). Los transformantes se crecieron en LB agar/Ampicilina (0.1 mg/mL), o/n a 37°C y se evaluaron por PCR de colonia (T_m de 56°C) (Anexo I, G), utilizando los cebadores P19EcoRIpGEX2T F y P19EcoRIpGEX2T R. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa 1.5% (Anexo I, C). Se realizó la extracción del plásmido por kit (Anexo I, M) de algunas colonias para secuenciar con el cebador universal pGEX3.

Expresión de GST-p19

Se transformaron por choque térmico BL-21 Star (DE3) (Invitrogen, USA) competentes con pGEX2T/p19, para los ensayos de expresión (Anexo I, A y F).

De los transformantes crecidos en LB agar/ampicilina (0.1 mg/mL), o/n a 37°C, se cultivó un clon en LB/ampicilina (0.1mg/mL) durante 5h a 37°C y 200rpm de agitación (Incubator Shaker LOM-150-2/150D, mrc), hasta una DO_{600nm} de 0.6 aproximadamente (UV/visible Spectrophotometer Utrospec.

3100pro, Amersham Biosciences). Se indujo con IPTG 0.1mM (Sigma, USA) durante 4h a 37°C y 200rpm de agitación.

La expresión se analizó según especificaciones del proveedor de pGEX 2T. Brevemente, se centrifugó el cultivo a 5000g por 10min a 4°C (Sigma 3-30K, USA) y el paquete celular se resuspendió en PBS (1/20 del volumen de cultivo). Se sonicó durante 10min, a 18KHz y ciclos de 0.5s en frío (Ultrasonic Processor UP200S, hielscher). Posteriormente, se agregó Triton X-100 (Sigma, USA) a la suspensión hasta concentración final de 1%, agitando durante 30min a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 10000g durante 10min a 4°C; el sobrenadante y el precipitado obtenidos, se analizaron por SDS-PAGE 12% (Anexo I, H).

Solubilización de cuerpos de inclusión

Se realizó una inducción (como se describe arriba) partiendo de 500mL de cultivo. El cultivo se centrifugó 5000g por 10min a 4°C, el paquete celular se resuspendió en 50mL de PBS y se sonicó durante 10min como se describió anteriormente. Seguidamente, la suspensión se centrifugó a 10000g por 10min a 4°C, la fracción insoluble se resuspendió en 50mL de PBS y se fraccionó en alícuotas de 2.5mL. Cada alícuota se centrifugó a 10000g por 10min a 4°C, se descartó el sobrenadante. Con los precipitados obtenidos, se evaluó la solubilización de la proteína recombinante en diferentes soluciones.

Cada fracción insoluble se resuspendió en 2.5mL del solvente o tampón ensayado para mantener constante el volumen, culminado el tratamiento se separó el sobrenadante del precipitado por centrifugación a 10000g por 10min a 4°C y el precipitado se resuspendió en igual volumen de PBS. De esta manera, para cada tratamiento se obtuvo una fracción soluble y una insoluble que se analizaron por SDS-PAGE (Anexo I, H), sembrando volúmenes iguales de cada una, para estimar el porcentaje de proteína solubilizada.

Se ensayaron los siguientes tratamientos:

UREA

Para cada ensayo se usó una alícuota de los cuerpos de inclusión (como se describe arriba). Se retomó una fracción en 2.5mL de Urea 2M (Amresco, USA) y otra en Urea 8M, se incubaron durante 1h a 37°C y 250rpm de agitación.

UREA Y ALCOHOLES

Se ensayaron distintos alcoholes en combinación con Urea⁶⁹. Se realizaron 4 ensayos, cada uno resuspendiendo los cuerpos de inclusión en 2.5mL de Urea 2M con alcohol 6M. Se trabajó con

Metanol, Etanol, Isopropanol y Butanol (Dorwil, Argentina). Las suspensiones se incubaron 1h a temperatura ambiente y 250rpm de agitación. Además, se realizaron 3 ensayos con Metanol 6M y diferentes concentraciones de Urea (4M, 6M y 8M). Cada ensayo se incubó durante 1h a temperatura ambiente y 250rpm de agitación.

GUANIDINA

Se resuspendió una fracción de los cuerpos de inclusión en 2.5mL de Guanidina 6M⁷⁰ (IBI, USA), se incubó 1h a 37°C y 250rpm de agitación.

SARCOSYL

Se llevaron a cabo 2 ensayos, uno resuspendiendo los cuerpos de inclusión en 2.5mL de Sarcosyl 2% (p/v) (N-Lauroylsarcosine sodium salt solution; Sigma, USA)⁷¹ incubando 1h a 37°C y 250rpm de agitación.

Para el segundo ensayo, se utilizaron diferentes concentraciones de Sarcosyl (entre 0 y 2%, p/v) en combinación con DTT 5mM (Sigma, USA)⁷². Cada suspensión de 2.5mL se sonicó durante 10min a 18KHz y ciclos de 0.5s en frío.

Purificación de GST-p19

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con Glutación usando Gluthatione Sepharose™ 4B (GE Healthcare, USA). Se equilibró la columna de Gluthatione Sepharose™ 4B con 10 mL de PBS DTT 5mM. La muestra se aplicó con un flujo de 1mL/min, se lavó la columna con 5mL de PBS DTT 5mM. La elución se hizo a 1mL/min con Tris 50mM pH8 (Baker, Argentina) Glutación 5mM (Sigma, USA) DTT 5mM, recogiendo fracciones de 1mL. A las mismas se les midió la DO_{280nm} y se analizaron por SDS-PAGE 12% (Anexo I, H).

En el caso del tratamiento con Sarcosyl, se ensayaron distintas condiciones para neutralizar el Sarcosyl con Triton X-100 para la purificación de la GST-p19⁷³. Para esto se tomaron 4 alícuotas de cuerpos de inclusión solubilizados con Sarcosyl 0.2 % (como se describe arriba) y se agregó Triton X-100 en una relación 2:1; 1:1, 1:2,5 y 1:3 respectivamente.

Para hacer el re-plegamiento de la proteína antes de su aplicación en la columna, se diluyeron las suspensiones hasta obtener una concentración de Sarcosyl 0.008% en tampón de equilibrio (PBS 5mM DTT). Brevemente, se colocó 62.5mL del tampón de equilibrio con agitación suave, se agregó gota a gota los 2.5mL de GST-p19 en Sarcosyl 0.2% con Triton X-100 y se dejó con agitación leve o/n.

Clonado de p19 en pET28a

Se trabajó con el plásmido de expresión pET28a (Novagen, Germany) (*Figura 25*). Se clonó la p19 entre los sitios *EcoRI* y *Sal I*, para esto se diseñaron dos cebadores:

P19 *EcoRI* pET28a F: 5'GGGAATTCAGAGCTGTG 3'

P19*SalHind*pET28aR: 5'GGGAAGCTTGTCGACTTAGGGACTCAGGGTTGC3'

Se amplificó la p19 usando TOPO TA/p19 como molde, la reacción de PCR se realizó a una T_m de 56°C (Anexo I, G). El producto de PCR se purificó por precipitación con Isopropanol (Dorwil, Argentina), para esto se agregó 1 volumen de Isopropanol a la mezcla de PCR, se precipitó 2min a temperatura ambiente y se centrifugó 10000g por 10min a 4°C⁷⁴. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 10µL de agua libre de nucleasas.

Se digirió pET28a y producto de PCR p19 con *EcoRI* y *SalI* simultáneamente (Anexo I, B). Ambas muestras se analizaron en un gel de agarosa 1% (Anexo I, C). Las bandas correspondientes al plásmido linealizado y al producto de PCR p19 se purificaron desde el gel por kit comercial (Anexo I, M).

Posteriormente, se ligó la secuencia p19 con pET28a usando una relación molar inserto:plásmido de 3:1, en función de pmoles de extremos disponibles (Anexo I, E). Se transformaron células XL-1 blue competentes con 5µL de la mezcla de ligación (Anexo I, A y F). Los transformantes se crecieron en LB agar/Kanamicina (0.02 mg/mL) o/n a 37°C.

Para evaluar los transformantes, se realizó la extracción del plásmido a 8 clonas y cada uno se digirió con *EcoRI* (Anexo I, B). Los resultados se corrieron en un gel de agarosa 1% (Anexo I, C). Se secuenció el ADN obtenido de 2 de dichas clonas, con el cebador universal T7 (Anexo I, N).

Expresión de his-p19

Se transformaron células BL-21 Star (DE3) competentes con la construcción pET/p19 para comenzar con los ensayos de expresión (Anexo I, A y F).

Se cultivó una clona en 5mL LB/Kanamicina (0.02 mg/mL) o/n a 37°C, 200rpm de agitación. Se expandió 100µL del cultivo en 10mL de LB/Kanamicina (0.02 mg/mL), hasta una DO_{600nm} de 0.5-0.6. Se ensayaron distintas condiciones de inducción, variando la concentración de IPTG y el tiempo

de inducción (IPTG: 0.1, 0.4, 0.8 y 1mM; tiempo de inducción: 2, 3 y 4 h); la temperatura y agitación se mantuvieron constantes a 37°C y 200rpm, respectivamente. Además, se realizaron dos ensayos de inducción con IPTG 0.1mM, incubando toda la noche a 35°C y a 25°C. La expresión de la proteína se analizó por SDS-PAGE 15% (Anexo I, H) y Espectrometría de masa (MALDI-TOF/TOF 4800 Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, USA) de las bandas con peso molecular esperado (Anexo I, N).

Solubilización de cuerpos de inclusión

Se inoculó 500mL de LB/Kanamicina (0.02 mg/mL) con 10mL de cultivo de BL-21 pET28a/p19 crecido o/n en LB/Kanamicina (0.02 mg/mL), se incubó a 37°C y 200rpm de agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de aproximadamente 0.5. Seguidamente, se realizó la inducción con IPTG 0.1mM, durante 2h a 37°C y 200rpm de agitación. El cultivo se centrifugó a 5000g por 10min a 4°C, el paquete celular se resuspendió en 50mL de PBS y se sonicó durante 10min a 18KHz y ciclos de 0.5s en frío. Se centrifugó a 10000g por 10min a 4°C, el precipitado se resuspendió en 50mL de PBS y se fraccionó en alícuotas de 2.5mL. Cada alícuota se centrifugó a 10000g por 10min a 4°C, se descartó el sobrenadante y los precipitados obtenidos se utilizaron para los ensayos de solubilización con diferentes tratamientos.

Para todos los análisis de solubilización, la fracción insoluble se resuspendió en 2.5mL de solvente o tampón para seguir trabajando con el mismo volumen. Para finalizar el tratamiento se separó el sobrenadante del precipitado por centrifugación y el precipitado se resuspendió en igual volumen de PBS. Para cada tratamiento la fracción soluble e insoluble se analizaron por SDS-PAGE 15% (Anexo I, H), sembrando volúmenes iguales de cada una, para estimar el porcentaje de proteína solubilizada. Se ensayaron los siguientes tratamientos:

UREA

Se resuspendió una alícuota de la fracción insoluble en 2.5mL Urea 2M (en solución acuosa), incubando durante 1h 37°C 250rpm de agitación. Se centrifugó a 10000g por 10min a 4°C, el botón se retomó en 2.5mL de Urea 8M, y se trabajó igual que anteriormente. Paralelamente, se resuspendió una alícuota en Urea 8M con DTT 5mM⁷², tratándose de la misma forma.

SDS

Se llevaron a cabo dos ensayos usando SDS 0.2% y SDS 2%⁷⁵ (Sigma, USA). Las muestras se trabajaron en las mismas condiciones (volúmenes, incubaciones y demás) que en el ensayo con Urea.

TRITON X-100 Y SARCOSYL

Se realizaron ensayos de solubilización utilizando Triton X-100 y Sarcosyl 1%⁷¹. Se retomó una alícuota de cuerpos de inclusión en 2.5mL de NaH₂PO₄ 50mM (Mallinckrodt, México) NaCl 300mM (Dorwin, Argentina) pH8 con Triton X-100 1%, se incubó 30min a 37°C 250rpm de agitación. Se separó por centrifugación a 10000g 20min 4°C la fracción soluble de la insoluble. El precipitado se lavó 3 veces con NaH₂PO₄ 50mM NaCl 300mM pH8.

Posteriormente, el precipitado se retomó en 2.5mL de NaH₂PO₄ 50mM NaCl 300mM pH8 con Sarcosyl 1%, se incubó 30min a 37°C y 250rpm de agitación.

Purificación de his-p19

La purificación se realizó por afinidad con Ni usando la resina de Ni-NTA His•Bind® Resin (Quiagen, USA).

Se llevó a cabo un re-plegamiento por dilución de la his-p19. Se agregó gota a gota 2.5mL de his-p19 soluble en Sarcosyl 1% a 10mL NaH₂PO₄ 50mM NaCl 300mM Imidazol 5mM (Sigma, USA) pH8, obteniendo una concentración final de Sarcosyl 0.2%. La solución se incubó o/n con agitación suave a temperatura ambiente.

La resina (2mL) se equilibró con 10mL de NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 5mM, pH8. Los 12.5mL de muestra se incubaron con los 2mL de resina durante 1h agitando suavemente a temperatura ambiente. Dicha suspensión se colocó en un estuche descartable de polipropileno para cromatografía (Pierce, USA) y se recogió la fracción no retenida. La resina se lavó con 10mL de NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 20mM, Sarcosyl 0.25%, pH8 y se eluyó el material retenido con NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 600mM, Sarcosyl 0.25%, pH8 a un flujo de 1mL/min. El material eluído se recogió en fracciones de 1mL, el contenido de proteína en las fracciones se determinó por absorbancia a 280nm y luego se analizó por SDS-PAGE 15% (Anexo I, H).

2) Seleccionar y generar un péptido sintético de la secuencia de la p19.

2a) Análisis computacional de la secuencia de la p19 para seleccionar un péptido a sintetizar

La identificación de péptidos lineales potencialmente antigénicos a partir de la secuencia primaria de la proteína (GenBank®: AAH67511.1) se realizó utilizando los programas PotScale, ProtParam del servidor ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>) y realizando un modelo teórico de la estructura cuaternaria de la IL-23 en EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/).

2b) Realizar la síntesis química del péptido seleccionado.

El péptido se obtuvo mediante síntesis Fmoc en Fase sólida (Sintetizador automático ResPep Intravis AG, Bioanalytical Instrument).

Se analizó la muestra obtenida de la síntesis peptídica por HPLC MS/MS (Esquire 6000, Bruker DALTONIOS, USA), (Servicio del Laboratorio de Analítica del ITP).

2c) Realizar conjugaciones del péptido.

Conjugación del péptido con proteínas portadoras

El péptido se conjugó a 2 proteínas, BSA y KLH (Sigma, USA). Para esto, por cada reacción, se incubó 2mg de péptido en 1mL de PBS conteniendo EDTA 1mM con 25µL de SPDP 20mM en DMSO (Sigma, USA) durante 1h a temperatura ambiente. Se trabajó con una relación mol a mol de péptido y SPDP. Paralelamente, se realizó lo mismo con 2mg de cada proteína (BSA y KLH), cada proteína activada se dializó en tubo de membrana de celulosa (corte de 14kDa; Sigma, USA) con Acético 0.1M, NaCl 100mM, pH 4.5. A las soluciones de proteínas se les agregó DTT 50mM en Acético 0.1M NaCl 100mM pH 4.5 y se incubaron 30min a temperatura ambiente. El DTT se removió por gel filtración con una columna PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare, USA) según especificaciones del proveedor, usando PBS EDTA 1mM como tampón.

Por último se mezcló el péptido y la proteína activados (2mL totales) y se incubó 18h a temperatura ambiente, 250 rpm de agitación.

Conjugación del péptido con sí mismo

Para la conjugación péptido-péptido, se incubaron 2mg de péptido en 500 μ L de MES 0.1M pH5, con 50 μ L de EDC 10mg/mL (Pierce, USA) en H₂O ultrapura, durante 2h a temperatura ambiente, 250 rpm de agitación.

Conjugación del péptido con un polímero sintético

Se utilizó el polímero sintético P(MAMVE) (Sigma, USA). La conjugación se llevó a cabo incubando 7.2 μ L de una solución de péptido 2.5mg/mL en H₂O ultrapura, 5 μ L de P(MAMVE) 1mg/mL en DMSO anhidro (Sigma, USA) y 92.8 μ L de KH₂PO₄ 0.1M pH 6.8 (Sigma, USA), durante 3h a 37°C, 250rpm de agitación.

Purificación de conjugados

La purificación de los conjugados se realizó por Gel filtración usando una columna BIOSEP-SEC-S3000 (Phenomenex, USA) (670kDa-1.35kDa) en PBS, con un flujo de 0.5mL/min. La detección se realizó por medida de DO_{280nm} y DO_{220nm}.

3) Generar un mAc anti-p19.

El protocolo usado en esta etapa está aceptado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (Consejo de Facultad de Química, UDELAR; Exp. N° 101900-000502-11).

3a) Obtener respuesta frente a la p19 inmunizando ratones Balb/C.

Se inmunizaron 5 ratones Balb/C (Servicio de Animales de Laboratorio Facultad de Ciencias Veterinarias, La Plata-Argentina). Primeramente, se inoculó con BSA-péptido, seguido del conjugado KLH-péptido, culminando con péptido-péptido en intervalos de 7 días. Como adyuvante se usó inicialmente Hidróxido de Aluminio (Sigma, USA) y para las subsiguientes inmunizaciones se usó Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma, USA) (Tabla 3). Los sueros se evaluaron por ELISA⁷⁶ y Dot Blot⁷⁶.

Tabla 3: Cronograma y protocolo de inmunización.

Día	µg de proteína	Vía de administración	Hidróxido de Aluminio	AIF	Extracción de Sangre (50µL)
0	30	Subcutáneo	Si	No	Si
7	30	Subcutáneo	No	Si	No
14	30	Subcutáneo	No	Si	No
21			No	No	Si

ELISA

La placa de ELISA fue sensibilizada con BSA 5µg/mL, KLH 5µg/ml y con P(MAMVE)-péptido 20µg/ml en PBS (en pocillos separados). Los sueros hiperinmunes y preinmunes se incubaron en una dilución 1/1000. Se incubó el conjugado anti γ de ratón:PO (Sigma, USA) en una dilución 1/5000 y se reveló con el sustrato H₂O₂/TMB (Anexo I, L).

Dot Blot

Se sensibilizaron 3 tiras de membrana Hybond-C Extra, Nitrocellulose (Amersham, USA) con cantidades crecientes de IL-23 recombinante (eBioscience, USA) (1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100ng) en PBS. Una de las membranas se incubó con una mezcla de los sueros hiperinmunes (preparada a partir de alícuotas de volúmenes iguales), en una dilución 1/200, otra se utilizó de manera similar con una mezcla de los sueros preinmunes (preparada a partir de alícuotas de igual volumen) y la tercer membrana se incubó con diluyente. Luego de lavar las membranas varias veces, se incubó el conjugado anti γ de ratón:FA (Sigma, USA) en una dilución 1/5000 en PBS. Se reveló con el sustrato NBT/BCIP (Anexo I, K).

3b) Generar células híbridas, con la fusión de células eucariotas SP2/0 con linfocitos B de ratones inmunizados.

Fusión

La fusión de la células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC, USA) con las células B de bazo de ratón inmunizado, se llevó a cabo según el protocolo descrito por Gavilondo J., 1995⁷⁷.

Brevemente, se prepararon $6-10 \times 10^6$ células de mieloma, se lavaron con 50mL de medio de lavado⁷⁸ y se centrifugaron a 1000g por 10min a 4°C (Sigma 3-30K, USA). El botón celular se resuspendió en 10mL de ML, las células se contaron en cámara de Neubauer.

Paralelamente, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazos. Los órganos se disgregaron mecánicamente, las células (aproximadamente $60-100 \times 10^6$ células) se lavaron con 50mL de ML y se centrifugaron a 1000g por 10min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 10mL de ML y las células se contaron en cámara de Neubauer.

Se mezclaron ambas suspensiones celulares en una relación célula mieloma/células de bazo de 1/10 y se centrifugó a 1000g por 10min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó gota a gota PEG (Sigma, USA) 42%, en una relación de 500µL para 10×10^6 células de mieloma ó 100×10^6 células de bazo. Con agitación leve se adicionó 5mL de ML precalentado a 37°C, en una segunda etapa se agregó 15mL de ML y por último se llevó a 50mL de ML. La suspensión se centrifugó a 900g 10min. El botón celular se resuspendió en RPMI (PAA Cell Culture Company,UK), HAT 1X (Sigma, USA), suplemento Hybridoma cloning 1X (GE Life Sciences/PAA, UK), SFB 10% (v/v) (PAA Cell Culture Company,UK), Gentamicina 40mg/mL (PAN BIOTECH, Germany) y se sembraron 10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo (Greiner, Austria), se cultivaron a 37°C CO₂ 5%. El cultivo se creció durante 4 días y se cambió el 50% del volumen de medio con RPMI, HAT 1X, SFB 10% (v/v), Gentamicina 40mg/mL. A los 7 días nuevamente se cambió el 50% del medio con RPMI, HT 1X, SFB 10%, Gentamicina 40mg/mL y se siguió haciendo cambios con este medio cada 3 días, durante 15 días. Posteriormente, se cambió el medio a RPMI cocteniendo SFB 10% (v/v) y Gentamicina 40mg/mL.

*Medio de lavado⁷⁸: Medio RPMI con Gentamicina 80mg/mL.

3c) Seleccionar hibridoma productor de mAc específico frente a la p19.

A los 10 días se evaluaron los sobrenadantes de cultivo por ELISA frente a his-p19, en búsqueda de Ac específicos contra p19. A los 20 días, se realizó un ELISA confirmatorio de los positivos (Anexo I, L).

Los hibridomas con reactividad positiva frente a la his-p19, se subclonaron por dilución límite. Brevemente, se preparó una suspensión de 1×10^4 células de hibridoma en RPMI, SFB 10% (v/v), Gentamicina 40mg/mL, las cuales se contaron en cámara de Neubauer.

A partir de esta suspensión, se prepararon diluciones para sembrar 1 célula/pocillo y 0.5 célula/pocillo en placas de 96 pocillos de cultivo (Greiner, Austria) y se cultivaron a 37°C, CO₂ 5%. El cultivo se

creció durante 4 días y se reemplazó el 50 % del medio por medio fresco (igual composición). Esta operación se repitió a los 7 días y cada 3 días durante los siguientes 10 días.

La producción de anticuerpos específicos se evaluó por ELISA, utilizando his-p19, KLH y BSA, separadamente. Todos los antígenos se utilizaron a 5µg/mL. La reacción Ag-Ac se reveló con un conjugado anti- γ de ratón:PO (Sigma, USA) en una dilución 1/5000, utilizando H₂O₂ y OPD * (Sigma, USA) como sustrato y cromógeno respectivamente. La reacción se frenó luego de 20min con H₂SO₄ 2N y se midió el desarrollo de color a DO_{492nm} (Anexo I, L).

* OPD 5 mg

12.5mL de tampón citrato sódico 0,15 M pH 5

5µl de H₂O₂ 33%

Determinación del Isotipo por ELISA de captura

Brevemente, la placa de ELISA (Nunc, Nalgene) fue sensibilizada 2h a 37°C, con 100µL/pocillo de Ac de cabra anti- γ de ratón a 5µg/mL (Sigma, USA), en tampón Fosfato 0.1M, pH6.8. Se bloqueó con PBS-T 20 1% (v/v) durante 2h a 37°C y se realizaron 3 lavados de 5min c/u con PBS-T 20 0.05%. Se incubó 100µL/pocillo del sobrenadante de cultivo del hibridoma seleccionado sin diluir, 1h a 37°C. Se lavó como se describe arriba y se incubaron 3 pocillos con el conjugado anti-IgG de ratón:PO (Sigma, USA) y 3 pocillos con el conjugado anti-IgM de ratón:PO, ambos en una dilución 1/5000 durante 1h a 37°C. Se lavó nuevamente y se reveló con H₂O₂ y TMB como sustrato y cromógeno respectivamente. La reacción se frenó a los 20min con H₂SO₄ 2N y se midió a DO_{450nm}.

Derivatización con Iodoacetamida

Se realizó una derivatización de 200µg del mAc, para esto primero se realizó una reducción parcial con DTT 50mM, se incubó 30min a 37°C. Por último, se derivatizó con Iodoacetamida (Sigma, USA), agregando 2 veces la cantidad de moles de DTT agregados en la reducción e incubando 1h a 37°C. La muestra se dializó en tubo de membrana de celulosa (corte de 14kDa) con PBS.

Evaluación de la reactividad del mAc por Western Blot

El mAc se analizó por Western Blot (Anexo I, J), con 10µg de his-p19 y 10µg de BSA por tira de membrana de nitrocelulosa. Una tira de la membrana se incubó con 0.1µg/mL del monoclonal derivatizado, otra con una dilución 1/200 del suero hiperinmune anti-péptido de ratón y otra fue usada como control del conjugado. La membrana con el monoclonal, se incubó con el conjugado anti-IgM de ratón:FA 1/5000, la membrana con el suero hiperinmune de ratón con el conjugado anti-γ totales de ratón:FA y la membrana usada de control se incubó con ambos conjugados en dichas concentraciones. Se reveló con NBT/BCIP (Anexo I, J).

Generación de un anticuerpo quimérico recombinante anti-IL-23

4) Quimerización del mAc obtenido.

4a) Clonar las regiones variables del mAc seleccionado.

Purificación de ARN

Se purificó el ARN a partir de células del hibridoma 3D7 guardadas en TRIzol® (ThermoFisher Scientific, USA) a -20°C, usando 1mL de TRIzol® cada 10x10⁶ células. La muestra se incubó a 30°C por 5min, se agregó 200µL de Cloroformo (Dorwil, Argentina) cada 1mL de TRIzol®, se mezcló y se incubó a 30°C por 3min. La fase acuosa conteniendo el ARN, se recuperó centrifugando a 12000g por 15min a 4°C (Sigma 3-30K, USA). Se agregó 0.5mL Isopropanol (Dorwil, Argentina) por cada mL de TRIzol® y se incubó a 30°C por 10min. Se centrifugó nuevamente a 12000g por 15min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con Etanol 75% (Dorwil, Argentina) en H₂O-DEPC (agua tratada con DEPC). El precipitado se recuperó por centrifugación como se describió anteriormente y se disolvió en 100µL de H₂O-DEPC incubando a 60°C por 10min. Se determinó la concentración y pureza del ARN purificado por DO_{260nm} y DO_{280nm}, y se analizó en un gel de agarosa 1% (Anexo I, I y C).

Diseño de cebadores para amplificar las secuencias variables de las cadenas μ y κ del mAc

Los cebadores se diseñaron a partir de secuencias correspondientes a las regiones constantes de las cadenas μ y κ murinas, disponibles en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Las mismas se alinearon usando el programa Clustal W (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html/>). Los cebadores se analizaron con el programa Oligo Analyzer - 1.5 (www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware). En un principio se partió diseñando cebadores para la cadena liviana κ murina, ya que la relación de esta con la cadena λ es de 20:1³¹.

Amplificación y clonado de las regiones variables

Para la amplificación de las regiones variables μ y κ del mAc, se utilizó el sistema 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen, USA). Para esto se diseñaron 4 cebadores antisentidos utilizando las secuencias de las cadenas constantes H y L correspondientes, disponibles en el GenBank®.*

*

Cebadores para la cadena μ :

MIgMR:

5'-ACAGGGGGCTCTCGCAGGA-3'

MIgMR N:

5'-CATTGGGAAGGACTGACTCTC-3'

Cebadores para la cadena κ :

MCKR:

5'-AGAAGCACACGACTGAGGC-3'

MCKR_N:

5'-ACTGGATGGTGGGAAGATG-3'

Las PCRs se llevaron a cabo con la enzima ADN polimerasa Pfu (Invitrogen, USA), a una T_m de 55°C (Anexo I, G2).

Los ADNc amplificados con la transcriptasa reversa ProtoScript® II (BioLabs, NE) se clonaron en el vector TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA), según las especificaciones del proveedor. Se transformaron células XL-1 blue competentes, con 4 μ L de mezcla de ligación por choque térmico (Anexo I, F). Los transformantes se sembraron en LB agar/Kanamicina (0.02 mg/mL) y se incubaron

o/n a 37°C. Se evaluaron los mismos por PCR de colonia (Anexo I, G) utilizando los cebadores provistos por el proveedor, la reacción se llevó a cabo a una T_m de 55°C.

× M13F: 5'GTAAAACGACGGCCAG3'

× M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'

Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa 1.5% con BrEt (Anexo I, C). Posteriormente, los clones fueron secuenciados (Anexo I, N) y se guardaron en LB Glicerol 20% (v/v) a -80°C.

Las secuencias variables μ y κ se analizaron usando distintos programas: Translate Tool, SignalP 4.0 Server del servidor ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/>) y IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>).

4b) Generar los plásmidos quiméricos.

Generación de los plásmidos quiméricos para la cadena pesada y liviana

Los plásmidos quiméricos para la cadena H y L de Inmunoglobulina anti-péptido se generaron por PCR de extensión por sobreposición⁷⁹. Las secuencias codificantes de las cadenas constantes de IgG1 humanas γ_1 y κ , fueron proporcionadas por Patricia Langjahr Penayo (ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile, 2006)⁸⁰.

Brevemente, los fragmentos de ADN codificantes de las regiones variables μ y κ murinas y de las regiones constantes γ_1 y κ humanas, fueron amplificados por PCR (Anexo I, G2) a partir de los plásmidos que los contienen utilizando ADN polimerasa HotStart (Bioline, UK). Para la PCR de extensión, se diseñaron los cebadores necesarios para poder introducir secuencias complementarias en los extremos 3' de las regiones variables de las cadenas μ y κ murinas, con los extremos 5' de las regiones constantes de las cadenas γ_1 y κ humanas, respectivamente *. Las cadenas variables murinas, se amplificaron con una T_m 61°C para la cadena μ , T_m 58°C para la cadena κ (Figura 6, PCR1). Las cadenas constantes humanas, se amplificaron usando una T_m 61°C para la cadena γ_1 , T_m 69°C para la cadena κ (Figura 6, PCR2).

Los amplificados fueron analizados y purificados a partir de geles de agarosa 1.5% (Anexo I, C y M). Posteriormente, se llevó a cabo la PCR de extensión por sobreposición, para esto se trabajó con cantidades equimolares de las secuencias a fusionar, teniendo una cantidad de 3ng de ADN final en la mezcla de PCR (25 μ L) (Figura 6, PCR3) (Anexo I, G2). La PCR para generar la secuencia

quimérica μ - γ se llevó a cabo a una T_m de 53°C con los cebadores VmuMF y Cg1HR; en el caso de la secuencia κ - κ se realizó a una T_m de 51°C con los cebadores VkMF y CkHR. Los productos obtenidos se analizaron y purificaron mediante geles de agarosa 1% (Anexo I, C y M). Las secuencias quiméricas μ - γ y κ - κ , se digirieron con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* (Anexo I, B) y se ligaron en los plásmidos de expresión eucariotas pcDNA 3.1 (-) y pSecTag2B (Invitrogen, USA) (Figura 7), obteniéndose las construcciones pcDNA3.1(-)/ μ - γ y pSecTag2B/ κ - κ (Anexo I, E). Se transformaron células XL-1 blue competentes, con cada mezcla de ligación por choque térmico (Anexo I, F). Los transformantes se sembraron en LB agar/Ampicilina (0.1mg/mL) y se incubaron o/n a 37°C. Se evaluaron los mismos por PCR de colonia (Anexo I, G), utilizando los pares de cebadores VmuMF/Cg1HR para la cadena quimérica H y VkMF/CkHR para la cadena quimérica L. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa 1% con BrEt (Anexo I, C). Posteriormente, los clones fueron secuenciados (Anexo I, N) y se guardaron en LB, 20% Glicerol a -80°C.

*Cebadores diseñados para la PCR de extensión por sobreposición:

Cadena variable μ murina:

VmuMF: 5'AAAAGCTAGCCACCATGGGATGGAGCTCTA3' (subrayado-sitio de corte para *NheI*; cursiva- secuencia Kozak; negro- secuencia complementaria al extremo 5' de la cadena variable μ murina).

FusVmuM/CgHR: 5'TGAGGAGACTGTGAGAGTGGT3' (negro- secuencia complementaria al extremo 3' de la cadena variable μ murina).

Cadena variable κ murina:

VkMF: 5'AAAAGCTAGCACCATGATGTCCTCTGCTC3' (subrayado- sitio de corte para *NheI*; cursiva- secuencia Kozak; negro- secuencia complementaria al extremo 5' de la cadena variable κ murina)

FusVkM/CkHR: 5'GGATACAGTTGGTGCAGCAT3' (negro- secuencia complementaria al extremo 3' de la cadena variable κ murina).

Cadena constante $\gamma 1$ Humana:

FusV μ M/CgHF: 5'ACCACTCTCACAGTCTCCTCAC**CAAGGGCCC**3' (negro- secuencia complementaria al extremo 3' de la variable μ murina; azul-secuencia complementaria al extremo 5' de la constante $\gamma 1$ humana).

Cg1HR: 5'GGGGG**GATCCTCATT**TACCCGGAGAC3' (subrayado- sitio de corte para *Bam*HI; azul- secuencia complementaria al extremo 3' de la final constante $\gamma 1$ humana).

Cadena constante κ Humana:

FusV κ M/CkHF: 5'ATGCTGCACCAACTGTATCC**ACTGTGGCTGCA**3' (negro- secuencia complementaria al extremo 3' de la variable κ murina; azul-secuencia complementaria al extremo 5' de la constante κ humana)

CkHR: 5'CCCC**GGATCCTCAACACTCT**CCCC3' (subrayado- sitio de corte para *Bam*HI; azul-secuencia complementaria al extremo 3' de la final constante κ humana)

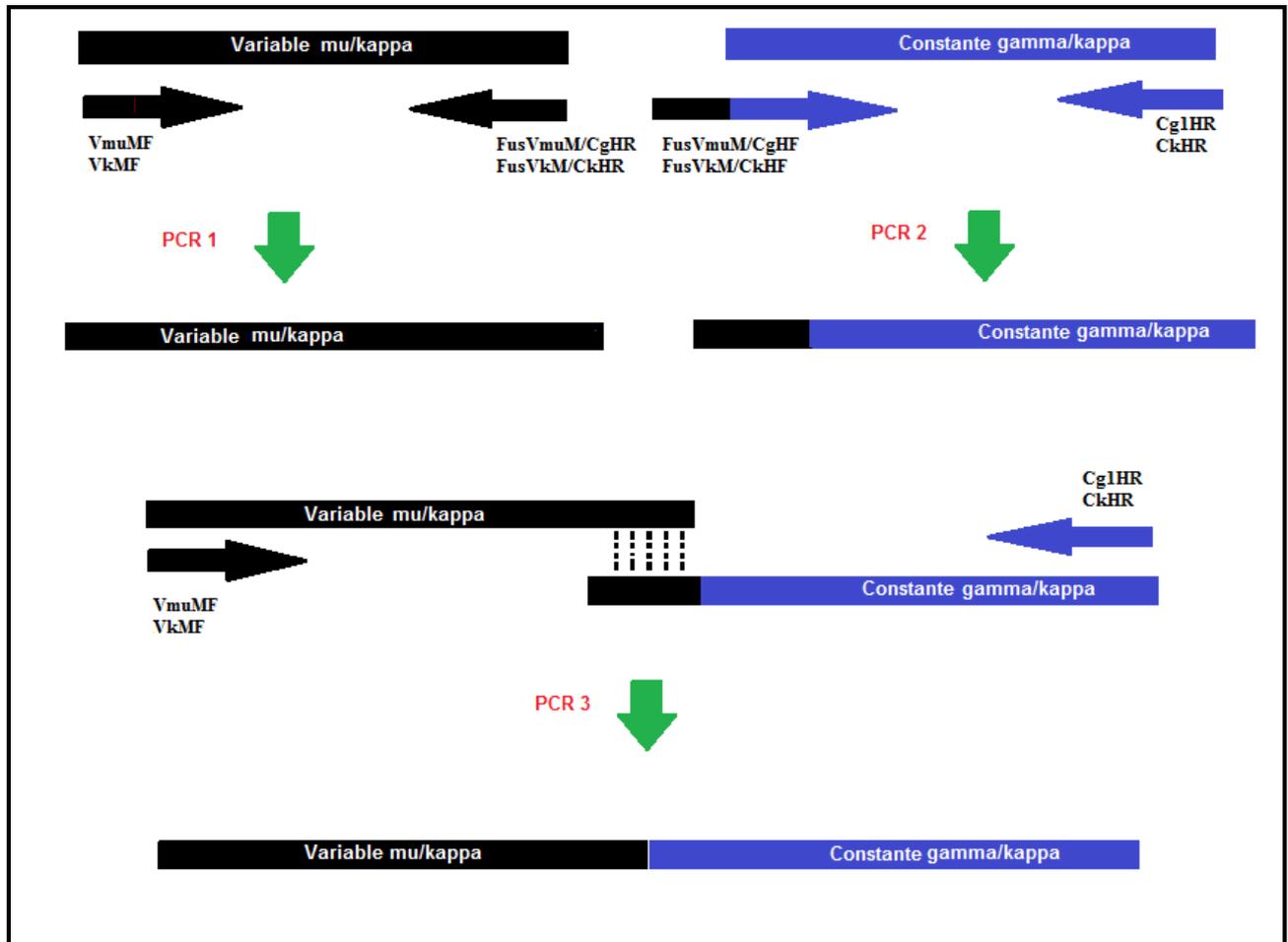


Figura 6: Esquema de PCR de extensión por sobreposición para generar las secuencias quiméricas pesadas y livianas. PCR 1- Amplificación de la secuencia variable μ ó κ ; PCR 2- Amplificación de la secuencia constante γ ó κ agregando en el extremo 5' un segmento complementario a la secuencia 3' de la secuencia variable μ ó κ según corresponda; PCR 3- Fusión de la secuencia variable con la secuencia constante, resultando en la secuencia quimérica variable murina-contante humana.

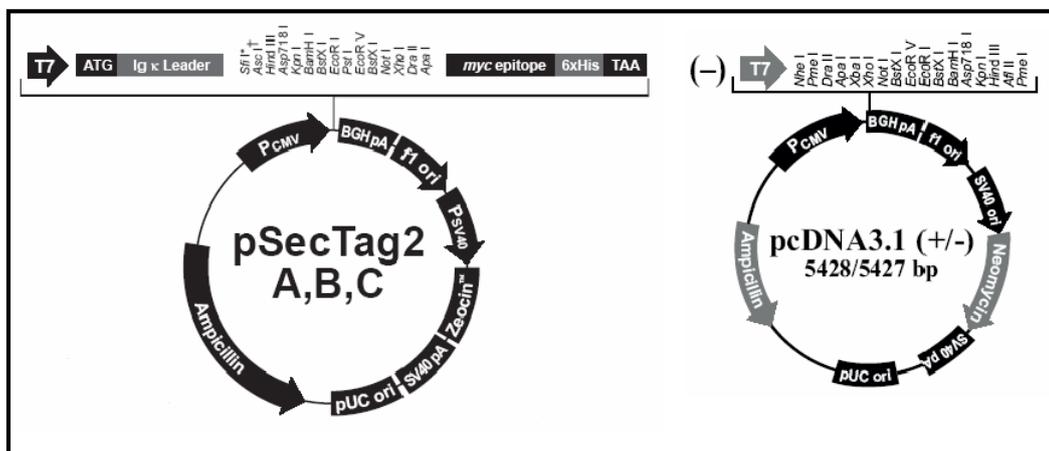


Figura 7: Mapa de los plásmidos pcDNA 3.1 (-) y pSecTag2B (Invitrogen, USA).

5) Expresión del Ac quimérico.

5a) Determinación de la concentración de antibiótico para la selección de los transfectomas en células CHO-K1.

Se cultivaron 10^5 células/pocillo de CHO-K1 (ATCC, USA) en medio Ham's F12 (PAN Biotech, Germany) con SFB 10% (v/v) (PAA Cell Culture Company, UK) en placas de cultivo de 48 pocillos (Greiner, Austria), a 37°C y CO₂ 5%. El cultivo se creció 4 días hasta obtener un 70% de confluencia en el pocillo. Se cambió el 100% del medio en cada pocillo, por medio Ham's F12 SFB 10% (v/v) con distinta concentración de antibiótico/pocillo. Se ensayó Zeocina (Invitrogen, USA) a 50000, 10000, 1000, 500, 250, 200, 166, 142, 125 y 100 µg/mL y Neomicina (Sigma, USA) a 7000, 3500, 1750, 1400, 930, 700, 625, 500, 403, 312, 156 y 78 µg/mL. Cada concentración de antibiótico se trabajó por triplicado y se incluyó un control sin antibiótico (3 pocillos). Las células se cultivaron durante 15 días con cambios de medio cada 48h. Se tomó como concentración de uso, la menor concentración donde se constató muerte celular en el período estudiado.

5b) Co-transfección de los plásmidos quiméricos en células eucariotas para la generación de transfectomas estables secretores de Ac quiméricos.

Se cultivaron células CHO-K1 en placas de 24 pocillos (Greiner, Austria) a 37°C y CO₂ 5% hasta un 70% de confluencia. Se trabajó con una relación 2:1 de Lipofectamina:ADN. Por un lado se preparó una solución de 75µL de DMEM:HamF12 1:1 con 2µg de pSecTag2B/κ-κ y 2µg de pcDNA3.1(-)/µ-γ, y por otro lado una de 75µL de DMEM:HamF12 1:1 con 8µg de Lipofectamina. Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 20min a temperatura ambiente; seguidamente se agregó 350µL de DMEM:HamF12 1:1. Las células se lavaron con DMEM:HamF12 1:1, y se agregó la solución con el complejo Lipofectamina:ADN, incubando 4h a 37°C en CO₂ 5%. Se realizó lo mismo en paralelo sólo con lipofectamina como control. Luego de la incubación se retiró el sobrenadante del pocillo, se agregó medio Ham's F12, SFB10% (v/v) y se cultivó a 37°C en CO₂ 5%. A las 72hs se recolectó el sobrenadante y se analizó por Western Blot (Anexo I, J). Se comenzó con la presión de selección, cultivando las células en Ham's F12, SFB10% (v/v), Neomicina 1.4mg/mL y Zeocina 1mg/mL⁸¹. El medio de las células se cambió cada 72h y se recolectó el sobrenadante.

Llegado al 100% de confluencia en el pocillo, las células se expandieron a un frasco de cultivo de 10mL (Greiner, Austria). Para esto, las células se decolaron con 200 μ L de una solución de Hepes 10mM (Sigma; USA), NaHCO₃ 25mM (Sigma; USA), EDTA 5mM, pH7.5 (Sigma; USA), incubando 5min a 37°C. Los 200 μ L se agregaron a 10mL de Ham's F12, SFB 10% (v/v), Neomicina 1.4mg/mL y Zeocina 1mg/mL y las células se cultivaron a 37°C en CO₂ 5%. El medio de las células se cambió cada 72h y se recolectó el sobrenadante.

5c) Evaluación del Ac quimérico obtenido

PURIFICACIÓN

A partir de sobrenadante de cultivo colectado se purificó el Ac quimérico con HiTrap Protein G HP (GE, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El purificado fue analizado por SDS-PAGE 12% (Anexo I, H) y por Western Blot (Anexo I, J), usando como antígeno células transformadas con pGEX/p19 e inducidas, tratadas con buffer muestra y transferidas a la nitrocelulosa luego de la electroforesis.

ELISA de competencia

Se llevó a cabo un ELISA de competencia, sensibilizando la placa con his-p19 5 μ g/mL, la misma se bloqueó con PBS-T 1%. Se incubaron 100 μ L de 0,43mg/mL del Ac quimérico en PBS con distintas concentraciones de his-p19 durante 1h a 37°C; 0,225 - 0,175 - 0,105 - 0,056 - 0,00 M. Posteriormente, cada ensayo se sembró por duplicado en la placa y se incubó 2h a 37°C (Anexo I, L). En paralelo, se realizó el mismo ensayo para el mAc original (3D7*).

INMUNOCROMATOGRAFÍA

El Ac quimérico se conjugó a oro coloidal de 30nm (preparado en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo de Bioconjugate Techniques G. Hermanson⁸²). Brevemente, 110 μ g de Ac quimérico se mezclaron con 2mL de oro coloidal 30nm (con una DO₅₂₀ de 1/100 = 0.032), se agregó Ovalbúmina (Sigma, USA) a una concentración final de 0.25% (p/v), se incubó durante 5min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 5min a 4°C y se descartó el sobrenadante, las partículas se retomaron con 2mL de NaH₂PO₄ 0.01M pH7.4 con 0.25% de Ovalbúmina y se

centrifugaron nuevamente como se describe arriba. Se descartó el sobrenadante y las partículas se retomaron en NaH_2PO_4 0.01M pH 7.4 con 0.25% de Ovalbúmina.

Se sensibilizaron por duplicado 2 membranas de nitrocelulosa (Memb UniSart CN140 Polyester Backing 100ym, Sartorius Biotech-Germany) con 50ng de BSA y 50ng de IL-23 recombinante (eBioscience, USA). Se armó el dispositivo uniendo en la parte inferior de la membrana, papel de Muestra (Millipore, Brasil) y en la parte superior papel absorbente (Millipore, Brasil), por último se colocaron en el dispositivo plástico. El ensayo se llevó a cabo colocando 100 μ l de Ac quimérico conjugado a Oro y se dejó migrar durante 5min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de un anticuerpo monoclonal anti-p19

Como objetivo general de este trabajo nos planteamos la generación de un Ac quimérico frente a la IL-23, que la reconozca selectivamente por la subunidad menor IL-23p19, para lo cual partimos por la generación de un mAc anti-p19.

Para la inmunización de los ratones, las fuentes del inmunógeno podrían ser tres: 1-p19 nativa; 2-p19 recombinante; 3- péptido sintético de la secuencia de p19. La primera opción fue descartada por las complicaciones técnicas (trabajar con donantes, estar en muy bajas concentraciones y demás) por lo que se trabajó con las otras dos opciones.

Generación de la p19 recombinante

Para generar la p19 recombinante se partió del plásmido comercial pCMV6-XL5/p19. Se creó un stock de transformantes y se verificó por PCR de colonia la presencia del inserto p19 en el plásmido pCMV6-XL5/p19, con su posterior análisis en un gel de agarosa. En el gel se observó la presencia de un inserto de aproximadamente 700pb (*Figura 8*) que corresponde al tamaño de la secuencia codificante de la subunidad p19.

El proveedor declara que la secuencia está clonada entre los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*, se pensó liberar la secuencia de la p19 con dichas enzimas y pasar directamente a un sistema de expresión procariota. Se realizó la extracción del pCMV6-XL5/p19 y se liberó el inserto p19 utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en forma secuencial. En la *Figura 9* se puede observar que en los controles de cada enzima, se constata la liberación del inserto. Esto era esperable para el caso de la *NotI*, ya que hay 2 sitios para la misma descritos en el mapa de restricción del plásmido, no así en el caso de la *EcoRI*, donde sólo se esperaba observar la linealización del plásmido, ya que hay sólo un sitio *EcoRI* descrito por el proveedor (*Figura 10*).

La secuenciación del plásmido pCMV6-XL5/p19 mostró que la secuencia codificante de p19 no presentaba mutaciones comparada con la secuencia reportada en el GenBank ®: NM_016584. También se constató la presencia de 2 sitios de restricción *EcoRI* no descritos, lo cual explica por qué al realizar el control de la enzima *EcoRI* se liberó un inserto; ambos sitios se presentan en una secuencia extra a la secuencia codificante de p19 (*Figura 11*).

Para pasar a trabajar con un sistema de expresión procariota se analizó la secuencia aminoacídica de la p19 con el programa SignalP 3.0 Server, con el cual se identificó el sitio de corte del péptido señal entre los aminoácidos 19 y 20. Además, el análisis con el programa NetNGlyc 1.0 Server no identificó sitios de N-glicosilación (dato no mostrado). Paralelamente, se llevó a cabo un estudio informático de la secuencia nucleotídica utilizando el programa NEBcutter para determinar enzimas de restricción que cortan dentro de la secuencia de p19. En la Figura 12 se muestra un esquema de las enzimas que cortan la secuencia de la p19, indicando la ubicación de dichos sitios de restricción.

Clonado de la secuencia codificante de p19 en pGEX 2T

Para la expresión de la p19, se seleccionó *E. coli*. como sistema de expresión. Se realizó el clonado de la secuencia p19 en el plásmido de expresión para procariotas pGEX 2T. Se trabajó con este plásmido porque la proteína se expresa unida a una proteína de fusión⁸³, lo cual permite la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad. A su vez, este sistema teóricamente facilitaría la expresión de la proteína en forma soluble, ya que ayudaría al correcto plegamiento de la misma.

Analizando los sitios de policlonado del pGEX 2T (Figura 13) se determinó que el único sitio compatible con la secuencia de p19 era el de *EcoRI*, ya que la secuencia de p19 tiene sitio de corte para *SmaI* y *BamHI* (Figura 12), que son los otros dos sitios del policlonado. Debido a que el sitio *EcoRI* en este plásmido está fuera del marco de lectura, se diseñó un cebador sentido con una inserción antes del codón de inicio (P19EcoRIpGEX2T F), permitiendo así, clonar la secuencia de la p19 en el marco de lectura correcto del plásmido pGEX 2T.

Se digirió la secuencia amplificada por PCR de p19 y el pGEX 2T con *EcoRI*, este último con un paso final de desfosforilación. El producto de digestión-desfosforilación de pGEX 2T y de la digestión del producto de PCR se analizaron en un gel de agarosa (Figura 14), donde se observaron las bandas correspondientes para pGEX 2T (tamaño de 4900pb) y para p19 (tamaño 700pb). Las bandas se purificaron desde el gel para realizar la ligación y posterior transformación de células XL-1 Blue competentes. Los transformantes se evaluaron por PCR de colonias usando los cebadores P19EcoRIpGEX2T F y P19EcoRIpGEX2T R (Figura 15). De los 7 clones testeados, todos presentaron una banda a 700pb, indicando que contienen la construcción pGEX2T/p19. Dado que la ligación se realizó de forma no dirigida, o sea sólo se usó un sitio de restricción, la p19 puede presentarse clonada en sentido 3'-5' ó 5'-3'. Para determinar si alguno de los clones presenta la secuencia p19 en sentido 5'-3' se realizó la extracción del plásmido de estos clones y se secuenciaron

con el cebador universal pGEX3. Los resultados mostraron que de los 7 clones, 4 estaban clonados en sentido 3'-5' y 3 en sentido 5'-3'. Estos resultados mostraron que la secuencia clonada no tiene mutaciones no deseadas (dato no mostrado), pero sí presentaba la inserción (G) que se introdujo antes del codón de inicio para que quedara en el marco de lectura del pGEX 2T (*Figura 16*).

Una vez confirmado el correcto clonado de la secuencia p19 en el plásmido pGEX2T, se comenzaron los ensayos de expresión. Se transformaron células BL-21 Star (DE3) competentes con el pGEX2T/p19 y se indujeron. Una vez lisadas las células, se separaron las fracciones soluble e insoluble y se analizaron por SDS-PAGE. En el SDS-PAGE (*Figura 17*) se pudo ver que hay inducción de la proteína GST-p19 (carril 3), la banda correspondiente a GST-p19 se observa con un peso molecular de 45kDa, siendo lo esperado ya que es la suma de la GST (26kDa) y la p19 (19kDa). Comparando las fracciones soluble e insoluble resultantes del tratamiento con Triton X-100, se observa que la proteína GST-p19 se encuentra en ambas fracciones (carriles 4 y 5), en una relación aproximada 1:10 respectivamente.

Debido a que la GST-p19 se expresa mayoritariamente de forma insoluble (*Figura 17*) (carril 5) se trabajó con los cuerpos de inclusión y se buscó un método apropiado de solubilización de la proteína. Se realizaron ensayos de solubilización usando distintos compuestos como agentes desnaturizantes, ya sean caotrópicos, detergentes y/o alcoholes:

UREA

El tratamiento con Urea^{70,72} resultó en nula solubilización de la proteína cuando se trabajó con una concentración de Urea 2M (carril 3 vs carril 4, *Figura 18*), mientras que una concentración de Urea 8M, logró solubilizar una cantidad muy pequeña de la proteína (carril 5 vs carril 6, *Figura 18*). Los carriles 4 y 5, contienen las fracciones que permanecieron insolubles luego del tratamiento con Urea 2M y 8M, respectivamente. Como en el ensayo Urea 8M no se observó una solubilización total de GST-p19, no se analizaron concentraciones de Urea intermedias entre 2 y 8M.

UREA Y ALCOHOLES

Se realizó un tratamiento combinando Urea 2M y alcohol 6M (metanol, etanol, propanol y butanol)⁶⁹. En los cuerpos de inclusión se mantiene la estructura secundaria, los alcoholes alquílicos se reportan como caotrópicos a altas concentraciones, que desestabilizan la estructura terciaria sin modificar la secundaria, y a su vez, a bajas concentraciones tienen un efecto cosmotrópico. Esto último, teóricamente, ayudaría obtener un re plegamiento correcto de la proteína solubilizada y purificada de los cuerpos de inclusión. Este tratamiento combina el efecto de la Urea a bajas

concentraciones para reducir las interacciones hidrofóbicas de los agregados, con el efecto de alcoholes alquílicos. La mezcla Urea y Metanol, permitió solubilizar parcialmente la GST-p19 (45kDa) presente en los cuerpos de inclusión, estimándose una solubilización cercana al 40% (Carril 2, *Figura 19*). Las mezclas de Urea con los demás alcoholes lograron una solubilización mucho menor de la proteína, tal como se muestra en la *Figura 19*. Cuando se aumentó la concentración de Urea en la mezcla (4M, 6M y 8M) manteniendo constante la concentración de Metanol (6M), no se observó solubilización de la proteína. Al aumentar la concentración de Urea, se hace que el tratamiento pase de ser desnaturizante leve a ser totalmente desnaturizante, pero esto no favoreció la solubilización de la proteína (*Figura 20*).

GUANIDINA y SARCOSYL

Se realizaron nuevos ensayos con dos condiciones desnaturizantes, por un lado se utilizó el agente caotrópico Cloruro de Guanidinio 6M y por otro lado el detergente aniónico Sarcosyl al 2%. En el análisis de las fracciones solubles e insolubles por SDS-PAGE se observa solubilización en ambos casos, siendo mayor en el ensayo con Sarcosyl (aproximadamente 70%) (Carriles 2 y 4, *Figura 21*).

Se ensayaron distintas concentraciones de Sarcosyl entre 0 a 2% en combinación con DTT 1mM y sonicación. Los resultados muestran que hay casi un 100% de solubilización en todos los ensayos con Sarcosyl (*Figura 22*). Se ajustó el porcentaje de Sarcosyl a usar, de manera de seleccionar la mínima cantidad de Sarcosyl necesaria. Para esto, se realizaron ensayos con 0; 0.1; 0.2; 0.3; y 0.4% de Sarcosyl con DTT 1mM. Analizando la figura (Carriles 5 y 6, *Figura 23*) se observa que a partir de 0.2% de Sarcosyl se obtiene aproximadamente el 100% de solubilización.

Al lograr la solubilización de la GST-p19, se pasó a la etapa de purificación de la proteína recombinante. Con el fin de que el Sarcosyl no interfiera en esta etapa, se ensayaron 4 condiciones de neutralizar el mismo con Triton X-100⁷³. A las fracciones solubilizadas con Sarcosyl 0.2 % se les agregó Triton X -100 en una relación 2:1; 1:1, 1:2,5 y 1:3. Para cada ensayo se realizó un replegamiento por dilución en el tampón de equilibrio, obteniendo una concentración final de Sarcosyl de 0.008% (ya que es la máxima concentración de Sarcosyl que tolera la columna Gluthatione Sepharose™ 4B) Por último, la purificación se realizó con Gluthatione Sepharose™ 4B y los resultados se visualizaron por SDS-PAGE.

En el SDS-PAGE donde se corrieron las distintas fracciones de la purificación, se observa que la GST-p19 no se retenía en la columna, ya que apareció en las fracciones del no retenido y en el lavado (*Figura 24*) (este resultado fue el mismo para todos los ensayos de neutralización del Sarcosyl). Esto, puede deberse a que no hay un correcto plegamiento de la GST que le permita interactuar con el

Glutación y/o que el Sarcosyl interfiera en dicha unión, aunque se trabajó con la concentración adecuada (según el proveedor).

En esta etapa podíamos seguir trabajando con ensayos de replegamiento y/o neutralización del Sarcosyl para lograr la purificación o seguir trabajando con otro sistema de expresión. Nosotros decidimos seguir trabajando con esta última opción.

Clonado de p19 en pET28a

Se comenzó a trabajar con el sistema pET, usando el vector de expresión pET28a (*Figura 25*), donde la proteína se expresa unida a una cola de Histidina. Se seleccionaron los sitios *EcoRI* y *SalI* para clonar la p19, para esto se realizó una PCR con dos cebadores diseñados: P19EcoRIpET28a F y P19SalHindpET28a R. El producto de PCR se purificó por precipitación con Isopropanol, se digirió con *EcoRI* y *SalI* simultáneamente, al igual que el pET28a. Ambos productos se analizaron en gel de agarosa y se purificaron de los mismos. En la *Figura 26* se puede observar una banda cercana a 700pb que corresponde al inserto p19 y una banda a 5000pb correspondiente al pET28a linealizado. Se ligó Inserto/plásmido y se transformaron células XL-1 blue competentes, los transformantes se crecieron en medio selectivo. Se realizó la extracción del plásmido a 8 clonas crecidas y se digirieron con *EcoRI*. Los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa para determinar si había diferencia de tamaño entre el blanco (pET28a sin inserto) y las clonas analizadas. En este análisis se observa que 3 de las clonas analizadas presentaban un mayor tamaño con respecto al blanco (*Figura 27*). Se secuenciaron 2 de estas clonas, donde se confirmó que sí estaba clonada la p19 correctamente entre los sitios *EcoRI* y *SalI* y que no presentaba mutaciones en la secuencia codificante (dato no mostrado).

Una vez que se obtuvo la secuencia de la p19 clonada correctamente en el pET28a se comenzaron los ensayos de expresión de la his.p19. Para esto, se realizó un cultivo o/n de una de las clonas positivas en medio selectivo, se expandió al día siguiente y se indujo la expresión. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE (*Figura 28*). En la figura se observa una banda cercana de 30kDa, presente en las células inducidas no así en las células sin inducir. Este peso es mayor que el esperado para la proteína his-p19, por este motivo se realizó una identificación peptídica por espectrometría de masa de la banda para su identificación, donde se confirmó que la banda corresponde a la p19 (dato no mostrado).

No hubo una buena inducción de la expresión, por lo cual se probaron varias concentraciones de inductor y tiempos de inducción, no lográndose diferencias significativas en la expresión de his-p19

(Figura 29). Como con la mínima concentración de IPTG usada (0.1mM), se obtuvo iguales resultados que a concentraciones mayores, se utilizó esta para realizar un ensayo de inducción incubando toda la noche a 35°C y a 25°C. En el análisis por SDS-PAGE se puede observar que en el ensayo a 35°C la inducción fue mínima, mientras que a 25°C no hubo inducción (Figura 30). Con estos resultados se estableció que las mejores condiciones de inducción ensayadas fueron 0.1mM de IPTG, 2h a 37°C 200rpm de agitación.

Al separar la fracción soluble de la insoluble de la inducción, se observó que la his-p19 se expresaba de forma insoluble (Carril 3, Figura 31).

Al igual que anteriormente se trabajaron y usaron distintos agentes de forma desnaturalizante para tratar de solubilizar la his-p19:

UREA

Se partió solubilizando la proteína con Urea, usando Urea 2 y 8M. Las distintas fracciones separadas por centrifugación, se analizaron por SDS-PAGE. En el gel se puede observar que casi la totalidad de la his-p19 permanece de forma insoluble (Carril 7, Figura 31), la identidad de la banda correspondiente a p19 se identificó por espectrometría de masa (dato no mostrado). La utilización de Urea 8M en combinación con DTT tampoco permitió obtener la proteína mayoritariamente en forma soluble (Carriles 2 y 3, Figura 32).

SDS

Se ensayó la solubilización con SDS 0.2% y SDS 2%, en las mismas condiciones de tiempo, temperatura y agitación que en el ensayo anterior. Si bien se pudo observar la presencia de la proteína en las fracciones solubles, la proporción presente en estas fracciones fue inferior a la presente en las fracciones insolubles (Carriles 4 y 6, Figura 32).

TRITON X-100 Y SARCOSYL

Se realizaron nuevos ensayos de solubilización utilizando en un primer paso Triton X-100 seguido de Sarcosyl 1%. El tratamiento con Triton si bien permitió solubilizar varias proteínas presentes en los cuerpos de inclusión, la his-p19 permaneció 100% insoluble (Carril 3, Figura 33). Cuando la fracción insoluble luego del tratamiento con Tritón se trató con Sarcosyl, se consiguió solubilizar el 50% de la his-p19 presente aproximadamente (Carriles 4 y 5).

Como se logró un 50% de solubilización con Sarcosyl y a su vez se eliminaron varios contaminantes con Triton, se usaron estas condiciones para realizar una producción preparativa y continuar con la purificación de la proteína por afinidad con Ni.

Luego de la expresión la proteína se replegó por dilución en el tampón de equilibrio hasta tener una concentración final de Sarcosyl 0.25%. La muestra conteniendo la proteína se aplicó a una columna conteniendo resina de Ni-NTA y el material retenido se eluyó con Imidazol 600mM conteniendo Sarcosyl 0.25%. El análisis por SDS-PAGE de la fracción eluída mostró la presencia de his-p19 (Carril 8, *Figura 34*). Este procedimiento permitió obtener la proteína altamente pura, con un rendimiento de 2mg por 1L de cultivo.

Generación del péptido sintético de la secuencia de la p19

Utilizando algunos programas del servidor ExPASy Proteomics Server se seleccionó la secuencia aminoacídica del péptido a sintetizar. En primer lugar se realizó un análisis teórico de la hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica de la p19, con el programa ProtScale usando las escalas de hidrofobicidad por AA de Rao & Argos⁸⁴; coeficiente de retención en TFA⁸⁵ y fracción molar (%) de residuos enterrados⁸⁶. Los resultados obtenidos con cualquiera de las 3 escalas fueron similares, identificando una región comprendida entre los residuos 36 al 45, aproximadamente, como la menos hidrofóbica. La *Figura 35* muestra el resultado obtenido al utilizar la escala basada en el coeficiente de retención en TFA (*Figura 35*).

Se seleccionó una secuencia lineal comprendida en esta región, ya que presenta mayor probabilidad de estar expuesta en la estructura cuaternaria de la IL-23. A su vez se buscó que la secuencia del péptido sea baja en prolina. Esto último, es necesario para la síntesis química del péptido, ya que un alto contenido de prolinas puede resultar en una menor eficiencia de síntesis, aumentando el número de cadenas truncas, se interrumpe la síntesis en un número importante de cadenas por impedimento estérico (*Figura 35*).

Péptido seleccionado: EEGDEETTNDVP

Se verificó que la secuencia seleccionada esté teóricamente expuesta en la proteína, utilizando los datos de la estructura cuaternaria de la IL-23, obtenidos de EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/). Con este análisis se observó que el péptido se encuentra teóricamente expuesto en la estructura cuaternaria de la IL-23 (*Figura 36*).

Finalmente, usando el Blast-p (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) se comprobó que el péptido sólo tuviese homología con la IL-23 y no encontrase homología con ninguna

otra proteína humana o de cualquiera de los organismos de la base de datos del Blast (dato no mostrado). Este análisis se realizó ya que el péptido posiblemente será el epítopo del Ac quimérico generado, con este resultado podemos decir que dicho Ac teóricamente no reconocerá otra proteína humana que no sea la IL-23.

A la secuencia del péptido se le adicionó una Lisina en el extremo N-terminal, con el fin de aportar otro grupo amino primario que facilite la conjugación del péptido a proteínas portadoras, para mejorar su inmunogenicidad o su exposición cuando se utilizara inmovilizado a una fase sólida.

Se sintetizó el péptido de 13 aminoácidos de secuencia **KEEGDEETTNDVP**.

Con el estudio teórico del péptido, usando el ProtParam del servidor Expassy se determinó:

Peso Molecular: 1462.4 Da

pI: 3.77

El péptido se obtuvo mediante síntesis Fmoc en Fase sólida. Se analizó la muestra obtenida de la síntesis por Espectrometría de masa. Con este análisis se pudo observar que en el producto de la síntesis, se encuentra mayoritariamente el péptido de interés (peso teórico 1462 Da).

En la figura 37 se muestra el espectro obtenido, se observan tres especies A, B y C. Se puede inferir que las especies A y C son la misma, siendo que la primera se encuentra doble-cargada y la segunda mono-cargada y corresponden al péptido (masa molar 1461.69 y 1461.64). A pesar de la presencia de la especie B que no se corresponde con el peso molecular del péptido, dado que esta se encuentra en proporción minoritaria frente a las otras 2, se considera que la calidad del producto de síntesis obtenido, es aceptable para continuar el trabajo sin necesidad de pasos posteriores de purificación (*Figura 37*).

Paralelamente, a la generación de la proteína recombinante se sintetizó el péptido, como se contó con el mismo antes que la proteína recombinante, se utilizó este como inmunógeno.

Con el cometido de lograr la generación de anticuerpos contra el péptido seleccionado (hapteno), el mismo fue conjugado a dos proteínas portadoras y a sí mismo (usados como inmunógenos) posibilitando la generación de epítopes T. Para inmovilizar el péptido a la superficie de poliestireno de la placa de ELISA, es conveniente hacerlo a través de un portador, para esto se utilizó un conjugado péptido-polímero sintético como antígeno en la inmovilización para el análisis de los sueros hiperinmunes. De esta manera, se mejora también la “presentación” del péptido en la placa, salvando los problemas estéricos que conlleva el reconocimiento del péptido por parte de los Ac si está directamente pegado a la placa.

Conjugación del péptido con proteínas portadoras

Se conjugó el péptido a KLH y BSA, para esto tanto las proteínas como el péptido se activaron con SPDP. En este primer paso, el SPDP reacciona con grupos aminos primarios creando grupos piridiltioles. Seguidamente, las proteínas se redujeron con DTT formándose grupos sulfhidrilos, los cuales reaccionan con los grupos piridiltioles generados en el paso previo, formándose un puente disulfuro entre el péptido y la proteína (*Figura 38*). La purificación de la conjugación se realizó por Gel filtración con BIOSEP-SEC-S3000 (dato no mostrado).

Conjugación del péptido con si mismo

Para conjugarse el péptido con si mismo se usó el reactivo de conjugación EDC, este reacciona con los grupos carboxilo del péptido formando un intermediario reactivo. Este intermediario reacciona con el grupo amino primario del péptido (nucleófilo) para formar un enlace amida entre ambos (*Figura 39*). La purificación de la conjugación se realizó por Gel filtración con BIOSEP-SEC-S3000 (dato no mostrado).

Conjugación péptido con un polímero sintético

Los grupos anhídrido del polímero P(MAMVE) reaccionan sin paso previo de activación con el grupo amino primario del péptido. Aquí la reacción de competencia con el agua es muy fuerte (por la cual se pierden los grupos anhídridos), por este motivo se tuvo especial precaución de trabajar con DMSO que no esté hidratado (*Figura 40*). La purificación de la conjugación se realizó por Gel filtración con BIOSEP-SEC-S3000. La cromatografía se siguió por lectura de DO a 220nm, donde absorbe el péptido pero no el polímero (dato no mostrado).

Generación del mAc anti-p19.

Como se comentó anteriormente, para la generación de anticuerpos frente al péptido sintético (hapteno) se llevó a cabo distintas conjugaciones.

El protocolo de inmunización podría haber sido utilizando sólo uno de los conjugados del péptido a la proteína portadora, esta estrategia se descartó para evitar favorecer una respuesta de Ac frente a las proteína portadora.

Para no sesgar la respuesta de anticuerpos hacia la proteína portadora, ya que esto sería lo teóricamente más probable, por ser éstas altamente inmunogénicas. Se intentaron dos protocolos alternativos. Por un lado, se realizó un protocolo de inmunización con el conjugado péptido-péptido,

pero no se obtuvieron títulos de Ac aceptable para continuar con la Fusión (dato no mostrado). La otra estrategia consistió en alternar los conjugados: BSA-péptido, KLH-péptido y péptido-péptido. Esta última tiene la desventaja potencial de resultar en una respuesta mayoritariamente de tipo IgM debido a que, en los recuerdos, al cambiar de antígeno no se favorecerá el cambio de clase por activación de clonas activadas en el primer encuentro con el antígeno. A pesar de esto, se logró una buena respuesta específica contra el péptido.

Los sueros hiperinmunes obtenidos el Día 21 se juntaron y se evaluaron por ELISA. La placa de ELISA fue sensibilizada con las distintas proteínas portadoras y con P(MAMVE)-péptido. Con los resultados del ELISA se pudo observar que como se esperaba, hay respuesta frente a las proteínas portadoras (BSA y KLH), observándose un mayor título de Ac anti-BSA, pero también un título alto frente al péptido ya que se observa señal contra P(MAMVE)-péptido (*Figura 41*).

Se realizó un Dot blot para evaluar si los Ac que reconocen el péptido también reconocen a la IL-23 recombinante. Se obtuvo una señal positiva en el ensayo con el conjunto de sueros hiperinmunes, no así cuando se usó el conjunto de sueros preinmune de ratón (*Figura 42*). Con este ensayo se determinó que los anticuerpos de ratón generados frente al péptido reconocen la IL23 recombinante, lo que confirma que el péptido está expuesto, accesible en la estructura cuaternaria de la misma. A su vez, ya que la IL-23 recombinante usada es biológicamente activa, se podría suponer que los Ac reconocerán la IL-23 nativa.

Al haber obtenido respuesta frente al péptido y a su vez frente a la IL-23 recombinante, se procedió a generar el anticuerpo monoclonal.

Los sobrenadantes de hibridoma obtenidos en la fusión, se evaluaron por ELISA frente a la his-p19 (*Figura 43 A*). Se obtuvieron 3 clonas que reconocían la his-p19, lo que era esperable ya que la respuesta fue principalmente contra la BSA (dato no mostrado), una de las proteínas portadoras. Se seleccionó sólo 1 de estos clones, el 3D7, el cual se clonó por dilución límite y se evaluó nuevamente por ELISA, frente a his-p19 (*Figura 43 B*).

Una vez subclonado y obtenido el monoclonal 3D7, se evaluó por ELISA la reactividad frente a la his-p19 y se controló nuevamente frente a BSA y KLH (*Figura 43 C*). En la figura se puede apreciar que el 3D7 reconoce específicamente la his-p19; no se observa reacción frente a las proteínas portadoras. Los valores de DO obtenidos frente a las proteínas portadoras se asemejan a los obtenidos frente a antígenos no relacionados (dato no mostrado).

Mediante ELISA de captura se determinó el isotipo del 3D7, para lo cual se usó el conjugado anti-IgM de ratón:PO y anti-IgG de ratón:PO. En la Figura 44 se muestran los valores de DO obtenidos en el ensayo, con una señal positiva al usar el conjugado anti-IgM, no así al usar el

conjugado anti-IgG, evidenciando que el 3D7 es una IgM. Este isotipo pentamérico puede presentar dificultades en los inmunoensayos por una razón estérica.

Se procedió a reducir parcialmente el mAc 3D7 de tipo IgM de manera de disociar el pentámero y determinar si se obtiene una mejor reactividad en los inmunoensayos. El 3D7 tratado (3D7*) se evaluó por ELISA, en este caso la placa se sensibilizó con 100µL/pocillo de 5µg/mL de his-p19 y se usó el conjugado anti-IgM de ratón:PO. Se puede ver que hay un aumento en la señal cuando se utiliza 3D7* con respecto al 3D7 (*Figura 45*). Esto se explicaría, ya que aumentaría la probabilidad de que más moléculas de Ac monoméricas se unan al Ag por unidad de superficie en comparación con la molécula pentamérica, debido a un impedimento estérico en el caso de ésta última. Hay un “mayor aprovechamiento” de los epítopes presentes en la fase sólida.

El 3D7* se evaluó por Western Blot frente a una muestra de his-p19 y frente a BSA. Paralelamente, se hizo un control usando el suero hiperinmune anti-péptido de ratón. En la *Figura 46* se puede observar que el 3D7* reconoce específicamente a la his-p19 y no presenta reactividad frente a la BSA. En el ensayo con el suero hiperinmune se puede observar como se esperaba, una banda correspondiente a la his-p19 (cerca de 30kDa) y una que corresponde a la BSA (66kDa), el conjugado no presenta reactividad frente a ninguna de las proteínas.

Generación de un anticuerpo quimérico recombinante anti-IL-23

Quimerización del mAc obtenido

Para realizar la quimerización del mAc obtenido, el primer paso es clonar las secuencias variables del mismo (H y L), así como la secuencia constante H y L de Ig de humano. En éste trabajo se usaron las regiones constantes humanas k y $\gamma 1$ clonadas previamente a partir de donantes. La obtención de las regiones variables H y L del mAc se realizó utilizando la técnica 5'RACE, que nos permite levantar secuencias desconocidas, siempre y cuando se cuente con una secuencia conocida hacia el extremo 3' de ésta, para el diseño de cebadores antisentido. Aquí se puede utilizar esta técnica, ya que en el transcrito maduro de las Ig, se encuentra el rearrreglo de la región variable seguido por la secuencia constante correspondiente (para ambas cadenas, H y L), la cual es conocida.

Para el clonado de las regiones variables del mAc se partió con la purificación del ARN total de células del hibridoma 3D7, se determinó la pureza por DO teniendo una relación DO_{260}/DO_{280} de

1,85. Al visualizar el ARN en el gel de agarosa se observó que había una degradación parcial, ya que la banda correspondiente al ARNr 28S no se encontraba en una relación 2:1 con respecto a la banda de ARNr18S. A su vez la banda correspondiente al ARNr 5S, 5.5S y ARNt se encuentran en una mayor proporción de lo esperado, lo cual es otro indicativo de degradación (*Figura 47*)⁷⁴.

Se diseñaron 4 cebadores reversos para amplificar la secuencias variables μ y κ del 3D7 por 5'RACE, para esto se trabajó alineando las secuencias constantes de la cadena μ y κ respectivamente, disponibles en el GenBank® (*Figura 48*). Se diseñaron 2 cebadores por cadena, uno más alejado del 3' de la región variable (MIgMR; MCκR) y otro más cerca de la misma (MIgMR N; MCκR N). El propósito de esto fue usar en la primer ronda de PCR el cebador alejado del 3' y luego las siguientes PCR realizarlas con el cebador próximo al extremo 3' de la región variable, para cada cadena variable ($V\mu$ y $V\kappa$).

A partir del ARN purificado se sintetizó el ADNc de la región $V\mu$ y $V\kappa$ utilizando la enzima transcriptasa reversa y los cebadores MIgMR y MCκR, específicos para la regiones constantes de la cadena μ y κ de Ig murina, respectivamente. El ARN se digirió con la enzima ARNasa y se agregó una cola poli-G al extremo 5' de los ADNcs. Las regiones $V\mu$ y $V\kappa$ fueron amplificadas por PCR utilizando el cebador sentido AAP (provisto en el Kit) que contiene una secuencia poli-C y los cebadores antisentido MIgMR N y MCκR N, específicos para la regiones constantes de la cadena μ y κ de Ig murina. En la figura 49 se muestra el análisis de dicha PCR en gel de agarosa 1.5%, pudiendo observarse un amplificado de aproximadamente 500pb para la secuencia $V\mu$ y otro del mismo tamaño para el amplificado de la cadena $V\kappa$. Los amplificados se clonaron en el vector TOPO TA Cloning, se transformaron células XL-1 blue competentes y se cultivaron en medio selectivo. Los clones fueron chequeados por PCR de colonias y los que presentaban el inserto se mandaron a secuenciar. Analizando las secuencias con el programa IMGT/V-QUEST se determinó que el 50% de los clones $V\kappa$ habían incorporado el inserto de interés mientras que el 50% restante incorporaron un transcrito aberrante de Ig que puede estar presente en los hibridomas. Estos transcritos aberrantes, presentan un codón stop dentro de la secuencia codificante y siempre están presentes en las células SP2/0 que se usan para la fusión.

La $V\mu$ fue la misma en todos los clones (dato no mostrado). Con la secuencia se determinó que el tamaño de la $V\mu$ tiene 404pb (*Figura 50*) y de la $V\kappa$ tiene 411pb (*Figura 51*).

Dichas secuencias, se analizaron usando distintos programas como Translate Tool, SignalP 4.0 Server del servidor Expasy, IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>). Se observó que no hay presencia de codones stop dentro de las secuencias codificantes μ y κ , y se determinó las secuencias correspondientes a los péptido señal de cada secuencia, MGWSSIILFLVATATGVHS para $V\mu$ y

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQM para $V\kappa$. También se identificaron los CDR de cada cadena (*Figura 50 y 51*).

Generación de los plásmidos Quiméricos para las cadenas H y L.

La construcción de los plásmidos de expresión quiméricos se realizó mediante PCR de extensión por sobreposición. Para esto se generaron cebadores utilizando las secuencias de las cadenas $V\mu$ y $V\kappa$ murinas y de las cadenas constante $\gamma 1$ y κ humanas. En dichos cebadores se introdujeron secuencias complementarias entre las regiones 3' de las cadenas variables μ y κ con las regiones 5' de las cadenas constantes $\gamma 1$ y κ , respectivamente, así como la secuencia Kozak en los cebadores sentido para las cadenas $V\mu$ y $V\kappa$.

Se amplificaron por PCR las cadenas variables μ y κ , y constantes $\gamma 1$ y κ . Estos productos de PCR generados, se utilizaron en una tercera ronda de PCR donde se mezclaron las cadenas variables y constantes respectivas (μ - $\gamma 1$ y κ - κ), utilizando los cebadores externos de ambas cadenas (*Figura 6*). De esta manera se obtuvieron las cadenas quiméricas pesada (μ - $\gamma 1$) y liviana (κ - κ).

Para la construcción de la cadena pesada quimérica, en la PCR1 se obtuvo un producto entre 400-500pb para la cadena $V\mu$ (cebadores: $V\mu$ MF y $FusV\mu$ M/CgHR) y en la PCR2 un producto cercano a 750pb para la cadena constante $\gamma 1$ (cebadores: $FusV\mu$ M/CgHF y Cg1HR), tal como se esperaba en función de las secuencias conocidas respectivas (*Figura 52*).

En la PCR3, se probaron varias estrategias de Fusión: PCR de gradiente, uso de distintas combinaciones de cebadores, distintas concentraciones de las secuencias, distintos ciclo de PCR, pasos previos de PCR sin cebadores y demás, con ninguno de ellos se obtuvo fusión de las cadenas (dato no mostrado). La estrategia con la cual se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para cada cadena quimérica, fue usando los cebadores externos con una relación equimolar de cada cadena H y L y calculando la T_m para la reacción a partir de la secuencia complementaria introducida con los cebadores sentido Fus usando el programa Oligo Analyzer-1.5 (www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware).

Para generar la cadena quimérica H, se utilizó una T_m 53°C, la cual se calculó de la secuencia complementaria entre la cadenas μ y $\gamma 1$ generada en las rondas anteriores de PCR. Se usaron los cebadores externos ($V\mu$ MF y Cg1HR) y concentraciones equimolares de las secuencias μ y $\gamma 1$, se obtuvo el producto esperado (según el tamaño) entre 1000-1500pb (1157pb), y también dos productos inespecíficos de 500 y 400pb (*Figura 52*). La secuencia de ADN quimérica μ - $\gamma 1$ se purificó a partir del gel de agarosa, se digirió con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* y se ligó en el plásmido

de expresión eucariota pcDNA 3.1(-). El plásmido conteniendo el inserto se introdujo en células XL-1 competentes y los clones obtenidos se analizaron por PCR de colonia, con los cebadores VmuMF y Cg1HR. Cuatro clones dieron lugar a un producto de PCR con un tamaño entre 1000 – 1500 pb de acuerdo a lo esperado mientras que el resto de los clones dieron lugar a productos de PCR de menos tamaño (*Figura 53*). La digestión del material proveniente de los 4 clones posiblemente positivos con *NheI* y *BamHI*, liberó un inserto de 1000 – 1500 pb en cada caso (*Figura 54*). La secuenciación de los insertos confirmó la secuencia esperada sin mutaciones con respecto a la secuencia original (dato no mostrado) y un tamaño de 1157pb (*Figura 55*).

Para la construcción de la cadena quimérica L, en la PCR 1 (cebadores: VκMF y FusVκM/CκHR) se obtuvo un producto entre 400-600pb y en la PCR 2 (cebadores: FusVκM/CκHF y CκHR) se obtuvo un producto entre 250-500pb, tal como se esperaba en función de las secuencias. En la PCR 3 se realizaron los mismos ensayos que para la cadena H (dato no mostrado), utilizando finalmente la misma estrategia para la fusión. La PCR 3 para dicha cadena se realizó a una Tm de 51°C, calculada igual que para la cadena pesada. Se obtuvo un producto de aproximadamente 750pb de acuerdo a lo esperado; también se observó un producto no específico menor a 500pb (*Figura 56*). El producto de 750pb que corresponde al tamaño de la cadena quimérica κ-κ se purificó del gel y se digirió con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI*, se clonó en el plásmido pSecTag2B y se introdujo en células XL-1 blue competentes. Algunos de los clones obtenidos se evaluaron mediante un ensayo de restricción con *NheI* y *BamHI*. En tres de los clones evaluados, se obtuvo un inserto del tamaño esperado (*Figura 57*). La secuenciación de estos insertos confirmó la secuencia esperada sin mutaciones con respecto a la secuencia original (dato no mostrado) y un tamaño de 733pb (*Figura 58*).

Expresión del Ac quimérico

Para poder seleccionar las células CHO-K1 transfectadas con ambos plásmidos, lo primero que se realizó fue la determinación de la concentración de antibiótico para la selección de dichos transfectomas. Las células se cultivaron durante 15 días con medio con Zeocina entre 100 µg/mL a 50 mg/mL o Neomicina entre 7 µg/mL a 7 mg/mL. La concentración de uso que se seleccionó para la Zeocina fue 1mg/mL, para la Neomicina 1,4mg/mL, siendo éstas las menores concentraciones donde se constató muerte celular en este período.

Una vez determinada la concentración de antibiótico a usar, se co-transfectaron los plásmidos quiméricos en células CHO-K1, para la generación de transfectomas estables secretores del Ac quimérico. El análisis por Western Blot del sobrenadante de cultivo de 72h de los transfectomas con los plásmidos pSecTag2B/k-k y pcDNA3.1(-)/µ-γ, mostró una banda correspondiente a un anticuerpo de clase IgG (PM aprox 150 kDa) (*Figura 59*). Esto demostró que la transfección fue exitosa y que las células transfectadas expresan la proteína heteróloga.

Para la evaluación del Ac quimérico se purificó el mismo por HiTrap Protein G HPn y se analizó por SDS-PAGE. Con este análisis al tratar la muestra con DTT para reducirla, se observó que no hubo reducción total, ya que en la muestra reducida (*Figura 60, carril A2*) se observa una banda aproximada 150kDa que correspondería a la molécula de IgG sin reducir y solo se observa una fracción menor de IgG reducida (dos bandas, una aproximada a 50kDa y la otra a 25kDa). La expresión del quimérico es de forma soluble ya que el mismo está en el sobrenadante del cultivo, y se purifica por afinidad con proteína G, pero la falta de reducción al usar DTT puede deberse que al dializar el purificado, hubiese cierta agregación. Por este motivo la solución de Ac quimérico, se sonicó 5min y se observó que la reducción realizada después de éste paso era total (*Figura 60, carril B3*). En las condiciones ensayadas se obtuvo un rendimiento de producción de 8µg/mL de Ac quimérico purificado.

Se evaluó por Western Blot si el Ac quimérico seguía reconociendo a la proteína p19, ya que muchas veces la quimerización puede afectar la especificidad del Ac. En la figura se puede observar que hay un reconocimiento selectivo de la p19 por parte del quimérico (*Figura 61, carril 3*) comparable con la del monoclonal de partida (*Figura 61, carril 2*).

Mediante inmunocromatografía se apreció que el Ac quimérico reconoce la IL-23 recombinante, en la figura 62 se puede observar que se obtiene una señal positiva frente a la IL-23 (membrana 2) no así frente a la BSA (membrana 1).

Con el fin de determinar la K_A del Ac Quimérico se utilizó el método de Friguet⁸⁷, para lo cual se realizó un ELISA competitivo. Para esto se sensibilizó la placa de ELISA con la proteína recombinante his-p19 y antes de sembrar la dilución del Ac Quimérico se pre incubó con la misma proteína en distintas concentraciones, paralelamente se realizó el mismo procedimiento para el monoclonal 3D7*. En la figura 63 A se representa el resultado del ELISA de % DO/DO0 en función de los ng de his-p19, se puede observar para ambos casos (Quimérico y 3D7*) un comportamiento sigmoideo. Esto es lo que se espera si existe inhibición, o sea a mayor cantidad de his-p19 en solución menor es la señal, ya que no queda anticuerpo libre para unirse a la his-p19 inmovilizada. Para determinar la K_D se graficó v/a en función de v (Definidas según el método de Friguet y aplicando la ecuación de Scarchard), y se calculó K_D a partir de la pendiente de la gráfica (*Figura 63 B*).

De este dato podemos determinar que la K_A ($1/K_D$) para el anticuerpo monoclonal 3D7 es aproximadamente 5×10^{-5} M y la del Ac. Quimérico 6×10^{-5} M. Estos valores de afinidad bajos, son consistentes con el hecho de que el anticuerpo monoclonal 3D7 original es de clase IgM³². Las regiones de los CDRs de este tipo de anticuerpo codificadas por el rearreglo de segmentos genéticos V(D)J, no sufren un mecanismo de hipermutación somática (maduración de la afinidad), por lo tanto presentan menor variabilidad y afinidad que los anticuerpos de clase IgG. La baja afinidad se compensa con su naturaleza polimérica, que le confiere alta avidéz.

Los valores similares de K_A obtenidos para el Ac monoclonal original (3D7) y para el Ac Quimérico, junto con su probada reactividad contra la p19 recombinante y contra la IL-23 recombinante, pone en evidencia que la quimerización no afectó el sitio de reconocimiento del mAc de partida.

FIGURAS

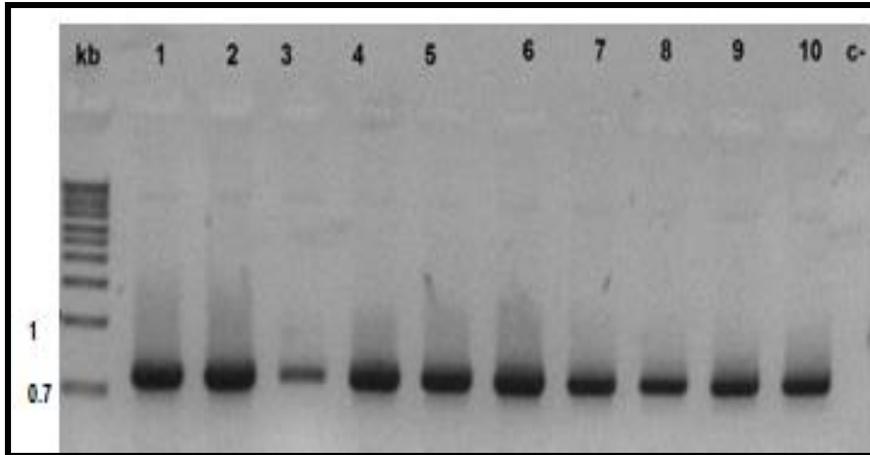


Figura 8: PCR de colonia. Gel de agarosa 1.5%, con el resultado de la PCR de colonia para verificar la presencia de pCMV6-XL5/p19 en los transformantes con los cebadores v1.5 y XL39. Se observa una banda aproximada a 0,7kb en todas las colonias testeadas (1al 10) menos en el control negativo (c-).

Figura 9: Digestión de pCMV6-XL5/p19 con EcoRI/NotI. Gel de agarosa 1.5%, en el primer y segundo carril se observan marcadores de tamaño, señalando los tamaños de 5 y 0.7Kb; 1- digestión con NotI; 2- digestión con EcoRI; 3- digestión con EcoRI/NotI. En los 3 casos se observa una banda aproximada a 0,7kb, lo que evidencia un sitio de restricción EcoRI que no estaba descrito.

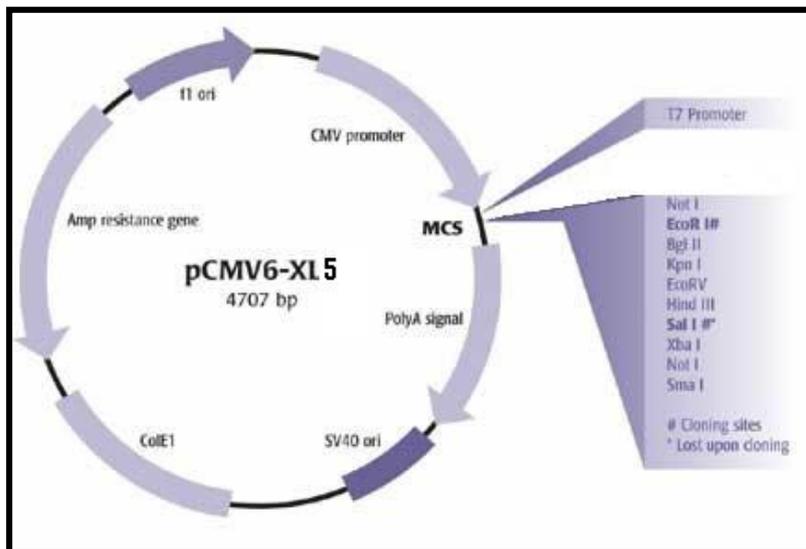
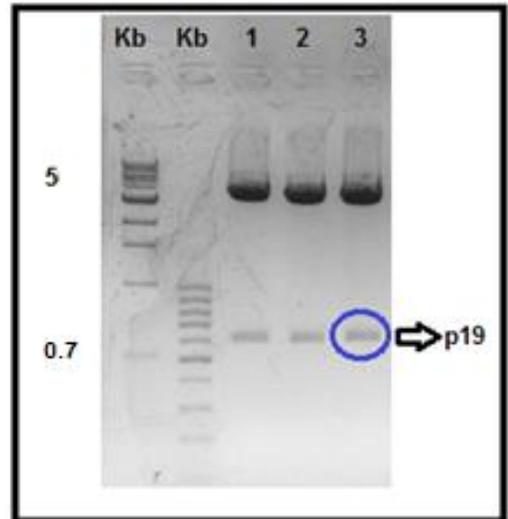


Figura 10: Mapa del Plasmido pCMV –XL5 (OriGene Technologies, Inc.)

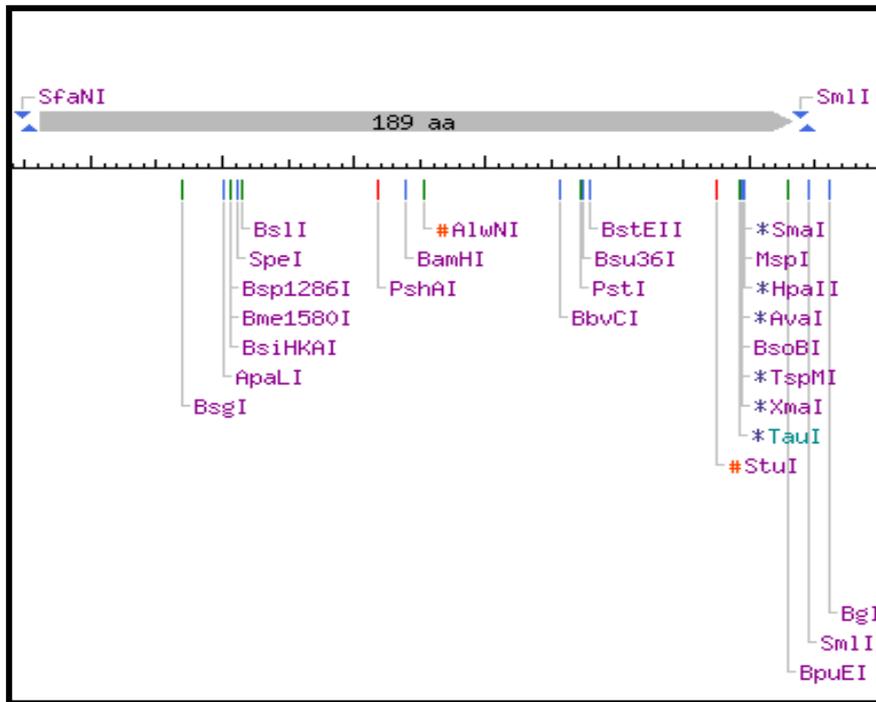


Figura 12: Resultado del análisis de la secuencia de p19 con NEBcutter. La secuencia nucleotídica de la p19 se muestra esquematizada como una línea. Dentro de la misma se señalan las posiciones donde se encuentran sitios de restricción para distintas endonucleasas. (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>)

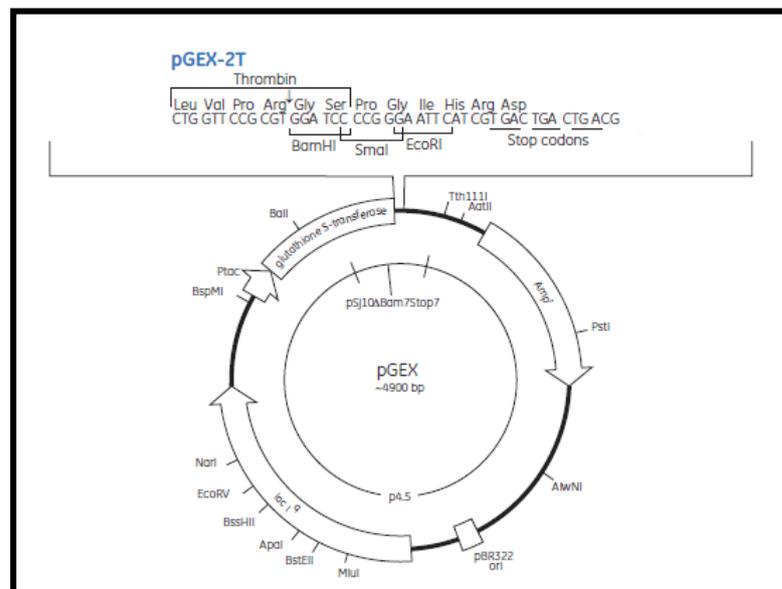


Figura 13: Mapa del Plásmido pGEX 2T (GE Healthcarey, USA).

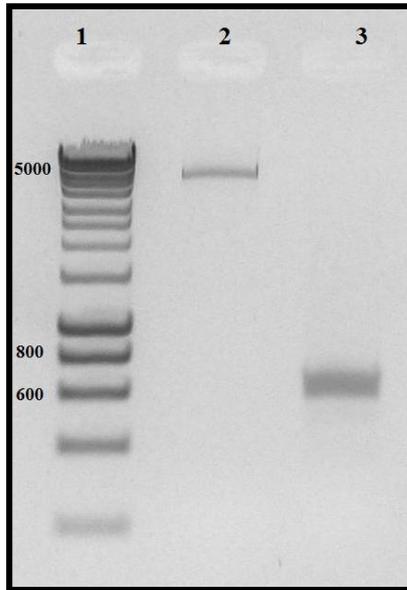


Figura 14: Digestión-desfosforilación de pGEX2T y amplificación de p19 a partir de CMV6-XL5/p19. Gel de agarosa 1%: 1- marcador de tamaño donde se señalan los tamaños de 600; 800 y 5000pb; 2- resultado de la digestión de pGEX2T; 3- producto de PCR de p19. En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 4900pb que corresponde al pGEX2T linealizado y en el carril 3 se observa una banda aproximada a 600-700pb, que es lo esperado para la secuencia de p19.

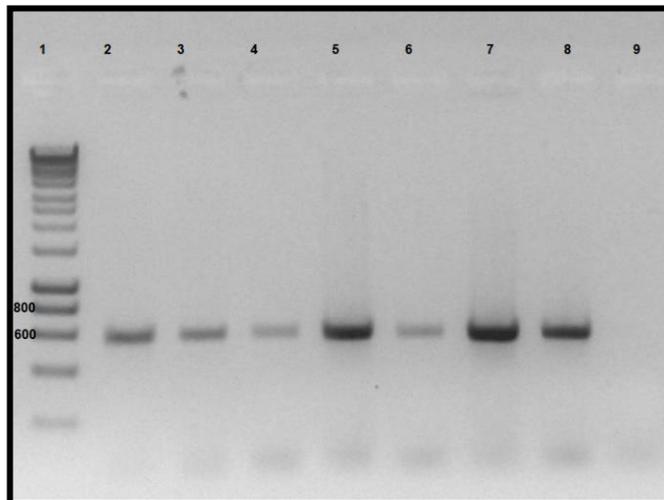


Figura 15: Análisis de los clones pGEX2T/p19 por PCR de colonia. Gel de agarosa 1.5%. 1- marcador de tamaño donde se señalan los tamaños de 600; 800pb; 2 al 8- Producto de PCR de las clonas testeadas; 9- Control negativo. En las clonas testeadas se observa una banda aproximada a 700pb, que es lo esperado para la secuencia de p19.

TAATCGCTTGGCATGAAGGGTTATGTATTTAAAATGAAAGCCAGCCCGATGGTATATTTTGGGGTAAAATTCGCG
 CCGGCCAATTCTTCGGCCAGACCCTAAGAAGGTGGTATGCCGTGGGTAAAACCCCTTAATTTTTCGTCCAAGGGCG
 TCTCGTGTAGAAATTTGTTTGC GCGCACTATAAAGGGTTCGGAAAATATTGGAGATAGCGGGTGACATAACTG
 AGGGGTTGGATAAAATGGTGGATTTGGGGCGGATACAATTTTCCACAGGAGAACAGTTTTCTATTCCCCTTAACATA
 GGTTTTTGGAAAATTAAGGCCTTGTGGACCCCCACTTGATCTTTTTTTTGGAAATTTTTTGGAGAAAAAATGGAAGG
 CCTTTTGTATGAGCGGGATGAAGGGTATAAATGGGGAACCAAAAAGTTTTGAATTGGGTTGGAGTTTCCCAATCTTCC
 TTATTATATGATGGTGTATGTTAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTGTTATATAGCTGACAAGCACACATGTT
 GGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCG
 AGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGT
 TCGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGTATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGC
 TCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTTGTTTTAAAAAACGTATT
 GAAGCTATCCACAAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCA
 CGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGGAATTCGAGAGCTGTGCC
 TGGGGGCAGCAGCCCTGCCTGGACTCAGTGCCAGCAGCTTTCACAGAAGCTCTGCACACTGGCCTGGAGTGCACAT
 CCACTAGTGGGACACATGGATCTAAGAGAAGAGGGAGATGAAGAGACTACAAATGATGTTCCCCATATCCAGTGTG
 GAGATGGCTGTGACCCCCAAGGACTCAGGGACAACAGTCAGTTCTGCTTGCAAAGGATCCACCAGGGTCTGATTTT
 TTATGAGAAGCTGCTAGGATCGGATATTTTACAGGGGAGCCTTCTCTGCTCCCTGATAGCCCTGTGGGCCAGCTT
 CATGCCTCCCTACTGGCCTCAGCCAACCTCTGCAGCCTGAGGGTCACCACTGGGAGACTCAGCAGATTCCAAGCC
 TCAGTCCCAGCCAGCCATGGCAGCGTCTCCTTCTCCGCTTCAAATCCTTCGCAGCCTCCAGGCCTTTGTGGCTGT
 AGCCGCCCCGGTCTTTGCCCATGGAGCAGCAACCCTGAGTCCC TAAGAATTCATCGTGACTGACTGACGATCTGCT
 CGCGCGTTTCGGAAGCC

Figura16: Resultado de la secuenciación de pGEX2T/p19 con el cebador universal pGEX3 de uno de los clones. Se verifica que la secuencia corresponde a la proteína p19 en pGEX clonada en sentido 5´-3´ en el sitio EcoRI. La misma no presenta mutaciones en la secuencia codificante, pero si presenta la inserción de una G antes del inicio introducida por el cebador P19EcoRIpGEX2T F. En color se marca el codón de stop. Por otro lado se ven los dos sitios de restricción de EcoRI, la secuencia del pGEX 2T en verde y de la proteína en negro.

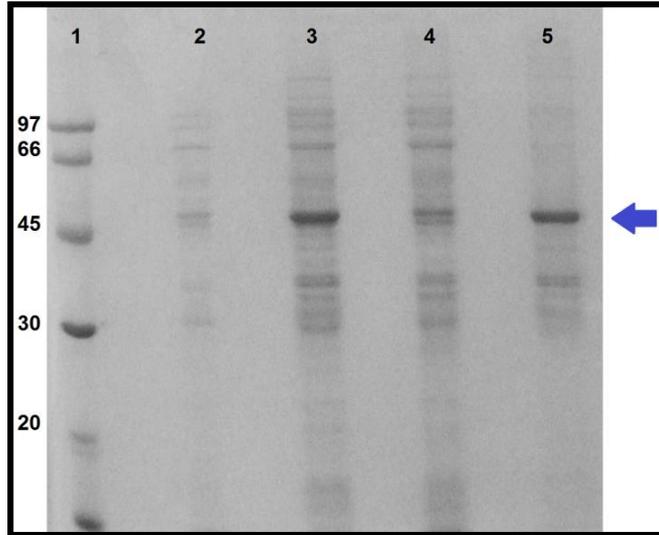


Figura 17: Expresión de GST-p19. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. 1-PM (kDa) 97 -66-45- 30- 20; 2-Células sin inducir; 3-Células inducidas con 1mM de IPTG, durante 4h; 4- Fracción soluble de la inducción; 5-Fracción insoluble de la inducción. Se observa una banda a 45kDa que corresponde a la inducción de GST-p19 (carril 3) (señalada con una flecha azul). Se observa GST-p19 tanto en la fracción soluble (carril 4) como en la insoluble (carril 5).

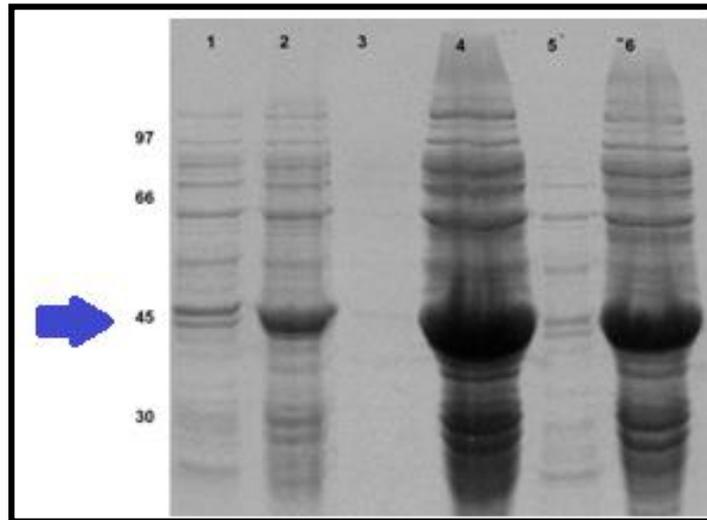


Figura 18: Solubilización de GST-p19 con Urea. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. 1- Fracción soluble de la inducción; 2-Fracción insoluble de la inducción; 3- Fracción soluble del ensayo Urea 2M; 4-Fracción insoluble del ensayo Urea 2M; 5- Fracción soluble del ensayo Urea 8M; 6-Fracción insoluble del ensayo Urea 8M. A la izquierda de la figura se marcan los pesos moleculares correspondientes (97; 66; 45; 30kDa). No se observa GST-p19 soluble en el ensayo con Urea 2M (carril 3), en el ensayo con Urea 8M se observa que hay solubilización pero no es significativa (carril 5), ya que la mayoría de la GST-p19 permanece insoluble (carril 6). En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

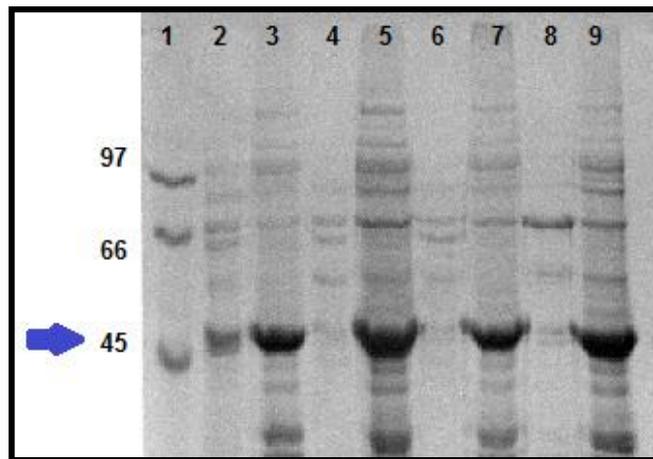


Figura 19: Solubilización de GST-p19 con Alcoholes. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. 1- Marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30 kDa); Carril 2 - Fracción soluble del ensayo Urea 2M + Metanol 6M; Carril 3-Fracción insoluble del ensayo Urea 2M + Metanol 6M; Carril 4 - Fracción soluble del ensayo Urea 2M + Etanol 6M; Carril 5-Fracción insoluble del ensayo Urea 2M + Etanol 6M; Carril 6 - Fracción soluble del ensayo Urea 2M + Propanol 6M; Carril 7-Fracción insoluble del ensayo Urea 2M + Propanol 6M; Carril 8 - Fracción soluble del ensayo Urea 2M + Butanol 6M; Carril 9-Fracción insoluble del ensayo Urea 2M + Butanol 6M.

Se observa GST-p19 soluble en el ensayo con Urea 2M + Metanol 6M (carril 2), no así en los otros ensayos (carril 4, 6 y 8). En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

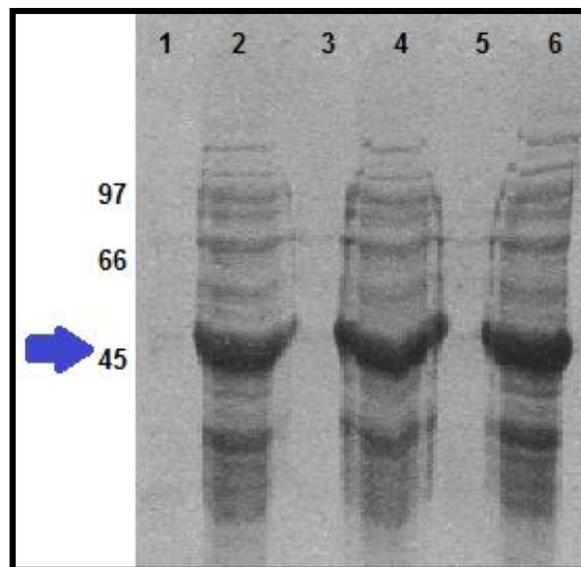


Figura 20: Solubilización de GST-p19 con Urea y Metanol. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. A la izquierda de la figura se señalan los pesos moleculares (97; 66; 45kDa); Carril 1 - Fracción soluble del ensayo Urea 4M + Metanol 6M; Carril 2-Fracción insoluble del ensayo Urea 4M + Metanol 6M; Carril 3 - Fracción soluble del ensayo Urea 6M + Metanol 6M; Carril 4-Fracción insoluble del ensayo Urea 6M + Metanol 6M; Carril 5- Fracción soluble del ensayo Urea 8M + Metanol 6M; Carril 6-Fracción insoluble del ensayo Urea 8M + Metanol 6M.

No se observa GST-p19 soluble en los carriles 1, 3 y 5.

En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

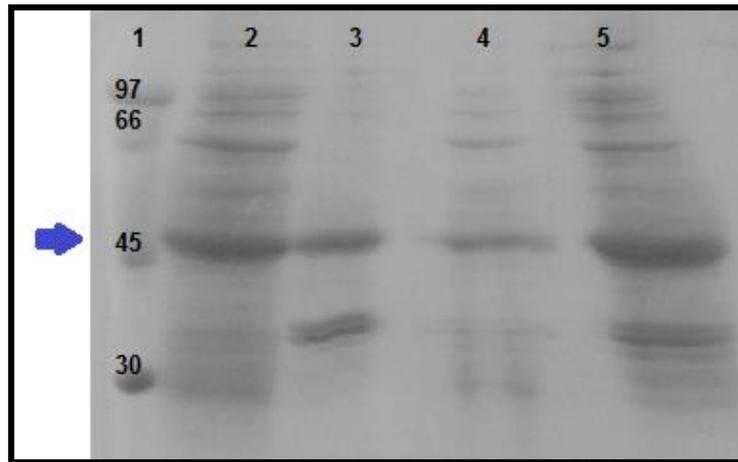


Figura 21: Solubilización de GST-p19 con Sarcosyl y Guanidinia. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. 1-Marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30kDa); Carril 2- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 2%; Carril 3-Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 2%; Carril 4 - Fracción soluble del ensayo Guanidinia 6M; Carril 5-Fracción insoluble del ensayo Guanidinia 6M.

Se observa GST-p19 soluble en ambos ensayos (carriles 2 y 4), aunque la solubilización no es 100% por que sigue habiendo GST-p19 insoluble (carriles 3 y 5).

En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

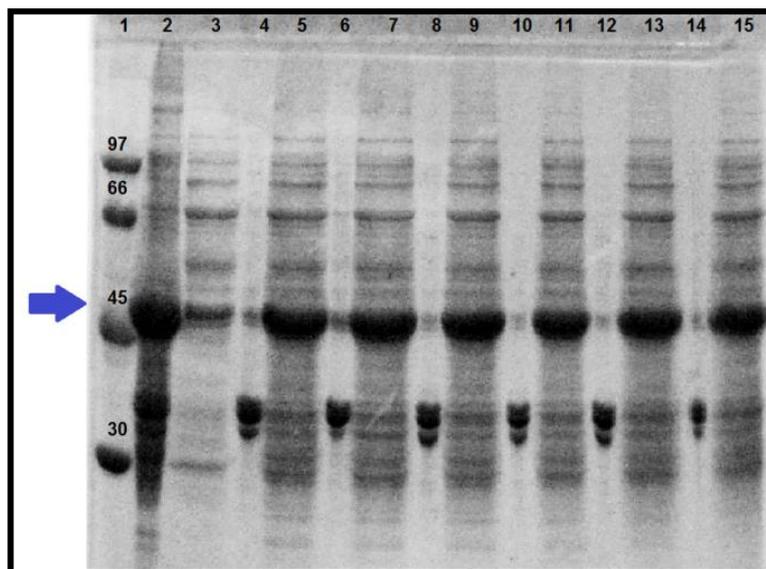


Figura 22: Solubilización de GST-p19 con Sarcosyl (0 a 2%) y DTT. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. 1-Marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30kDa); Carril 2- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0%; Carril 3- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0%; Carril 4- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.25%; Carril 5- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.25%; Carril 6- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.5%; Carril 7- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.5%; Carril 8- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.7%; Carril 9- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.7%; Carril 10- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 1%; Carril 11- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 1%; Carril 12- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 1.5%; Carril 13- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 1.5%; Carril 14- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 2%; Carril 15- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 2%.

Se observa GST-p19 soluble en todos los ensayos (carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13, y 15), salvo en el que tiene 0% de Sarcosyl que tiene un 20% aproximadamente de proteína soluble, los demás ensayos presentan casi el 100% de la GST-p19 soluble.

En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

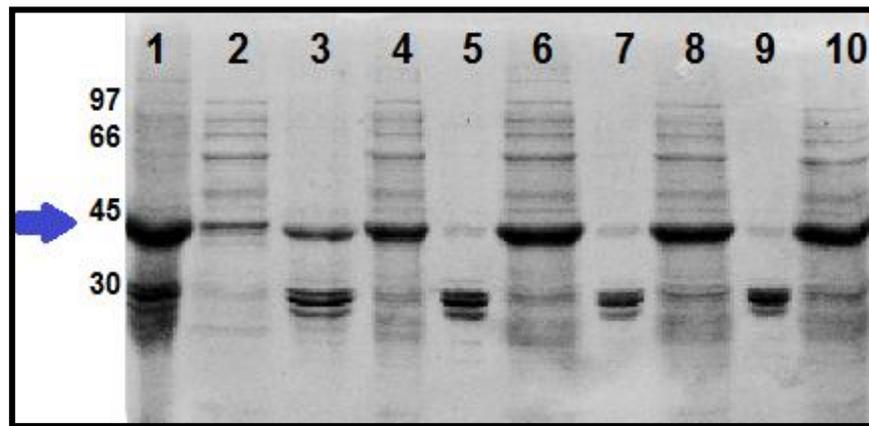


Figura 23: Solubilización de GST-p19 con Sarcosyl (0 a 0.4%) y DTT. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. A la izquierda de la figura se representan los pesos moleculares (97; 66; 45; 30kDa); Carril 1- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0%; Carril 2- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0%; Carril 3- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.1%; Carril 4- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.1%; Carril 5- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.2%; Carril 6- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.2%; Carril 7- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.3%; Carril 8- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.3%; Carril 9- Fracción insoluble del ensayo Sarcosyl 0.4%; Carril 10- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 0.4%; Se observa GST-p19 soluble en todos los ensayos (carriles 2, 4, 6, 8, y 10), salvo en el que tiene 0% de Sarcosyl (como era de esperar) que tiene un 5% aproximadamente de proteína soluble, los demás ensayos presentan casi el 100% de la GST-p19 soluble. En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

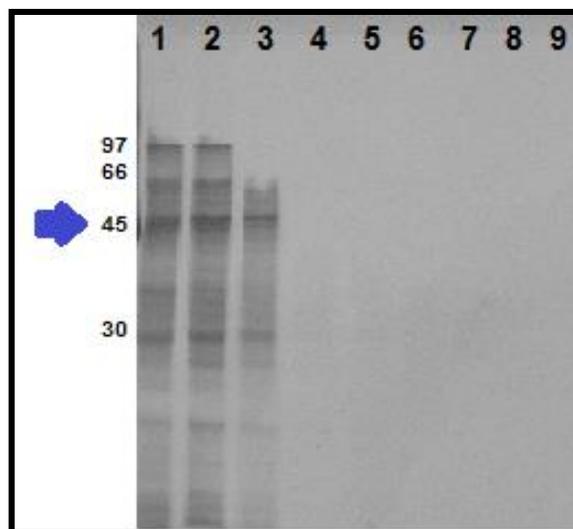


Figura 24: Purificación de GST-p19 con Gluthatione Sepharose™ 4B. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. A la izquierda de la figura se representan los pesos moleculares (97; 66; 45; 30kDa); Carril 1- Muestra aplicada en la columna; Carril 2- Fracción no retenida; Carril 3- Fracción del lavado; Carril 4 al 9- Fracciones de la elución. Se observa GST-p19 en la muestra aplicada y se ve que no se retiene en la columna, ya que aparece en la fracción no retenida y en el lavado (carriles 2 y 3). En la figura se señala con una flecha azul una banda a 45kDa que corresponde a la GST-p19.

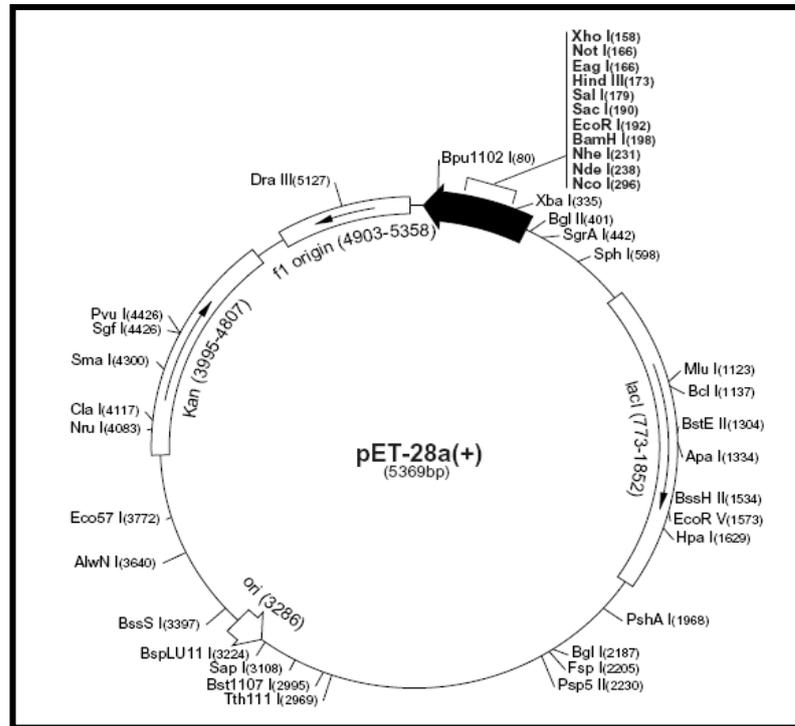


Figura 25: Mapa del Plasmido pET 28a (Novagen, Germany).

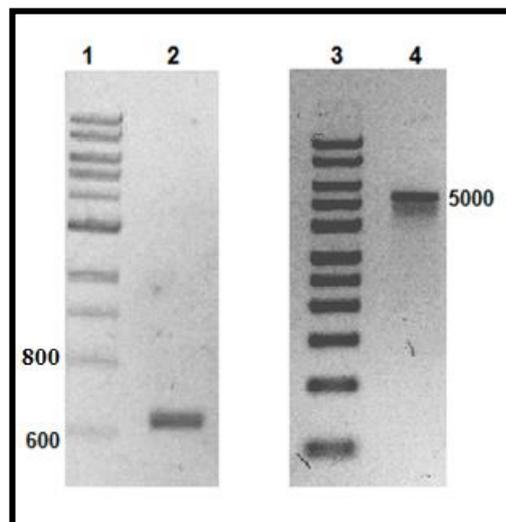


Figura 26: Digestión de pET 28a y de p19 con EcoRI/SalI. Geles de agarosa 1%: 1 y 3 marcador de tamaño, donde se señalan los tamaños de 600; 800 y 5000pb; 2- resultado de la digestión del producto de PCR de p19; 4- resultado de la digestión del pET28a. En el carril 4 se observa una banda de aproximadamente 5000pb que corresponde al pET 28a linealizado y en el carril 2 se observa una banda cercana a 700pb, que es lo esperado para la secuencia de p19

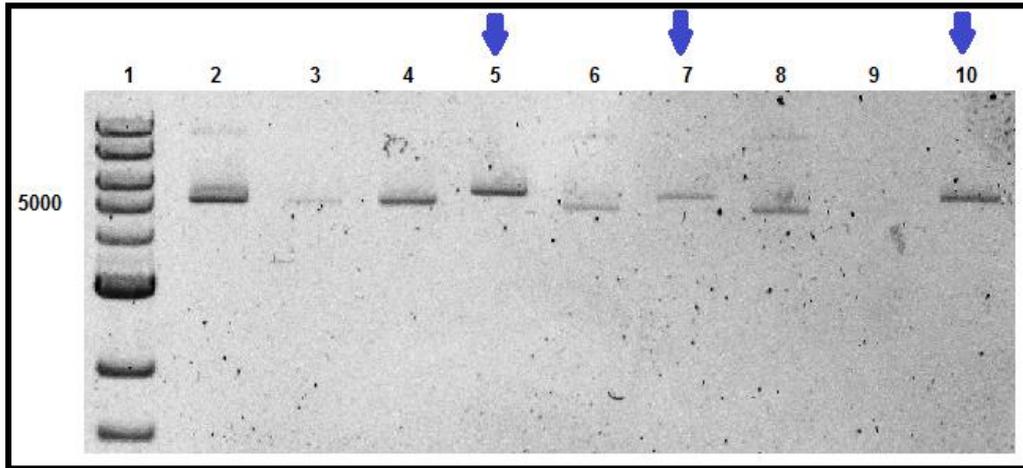


Figura 27: Digestión de pET 28a/ p19 extraído de los transformantes con EcoRI. Gel de agarosa 1%: 1- marcador de tamaño donde se señala 5000pb; 2- resultado de la digestión de pET 28a sin inserto (blanco); 3-10-resultado de la digestión de los transformantes. En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 5000pb que corresponde al pET28a linealizado. Comparando este resultado con el de las clonas, se puede ver que 3 de las clonas testeadas presentan un mayor tamaño (señaladas con una flecha azul). En el carril 9, no se aprecia ninguna banda.

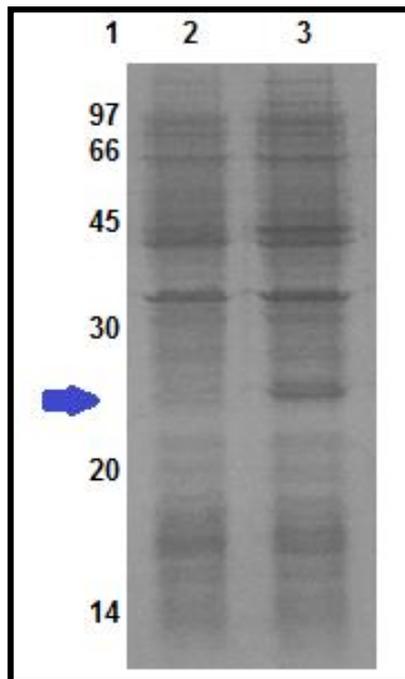


Figura 28: Expresión de his-p19. SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1-PM (kDa) 97 -66-45- 30- 20; 2-Células sin inducir; 3-Células inducidas con 0.4mM de IPTG, durante 3h. En esta figura se observa una banda cercana a 30kDa que corresponde a una inducción (señalada con una flecha azul), pero se presenta en un tamaño mayor que el esperado para la his-p19.

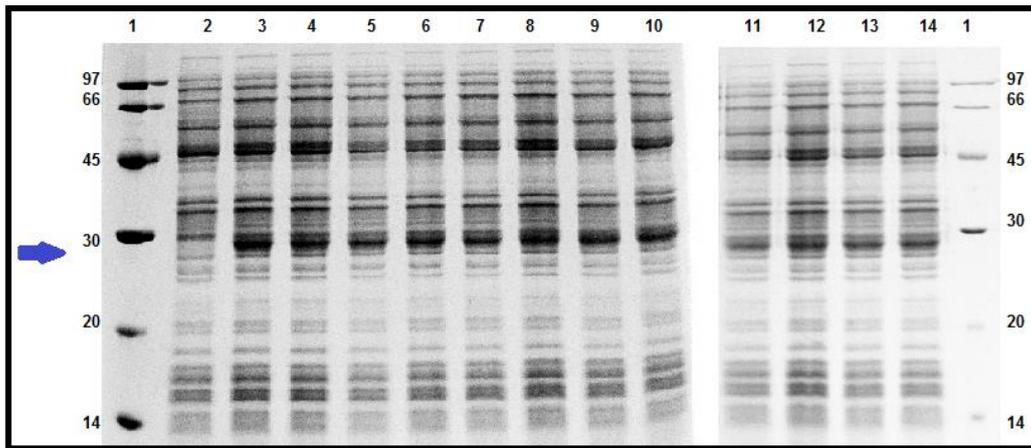


Figura 29: Expresión de his-p19 con distintas concentraciones de IPTG y tiempos de incubación. SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1-PM (kDa) 97 -66-45- 30- 20-14; 2-Células sin inducir; 3-4-5-6-Células inducidas con IPTG 0.1; 0.4; 0.8; 1mM, respectivamente, durante 2h. 7-8-9-10-Células inducidas con IPTG 0.1; 0.4; 0.8; 1mM, respectivamente, durante 3h. 11-12-13-14-Células inducidas con IPTG 0.1; 0.4; 0.8; 1mM, respectivamente, durante 4h. En esta figura se observa una banda cercana a 30kDa que corresponde a la inducción (señalada con una flecha azul), no así en el carril 2. No se observa diferencia en la expresión entre las distintas condiciones ensayadas.

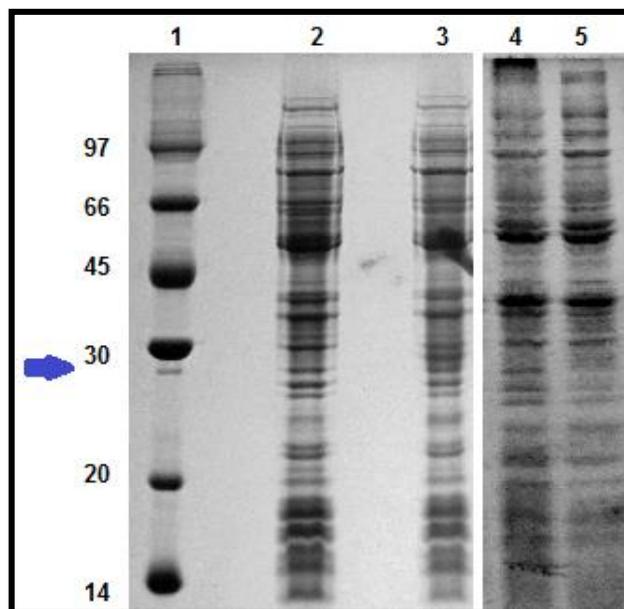


Figura 30: Expresión de his-p19 con IPTG 0.1mM, toda la noche a 35°C y a 25°C. SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1- Marcador de peso molecular (kDa) 97 -66-45- 30- 20-14; 2-Células sin inducir; 3-Células inducidas con IPTG 0.1mM durante toda la noche a 35°C; 4-Células sin inducir; 5-Células inducidas con IPTG 0.1mM durante toda la noche a 25°C. En esta figura se aprecia la banda cercana a 30kDa que corresponde a la inducción de his-p19 (señalada con una flecha azul) en la inducción a 35°C, aunque no tiene un aumento con respecto a los ensayos anteriores y se observa que a 25°C no hubo inducción alguna.

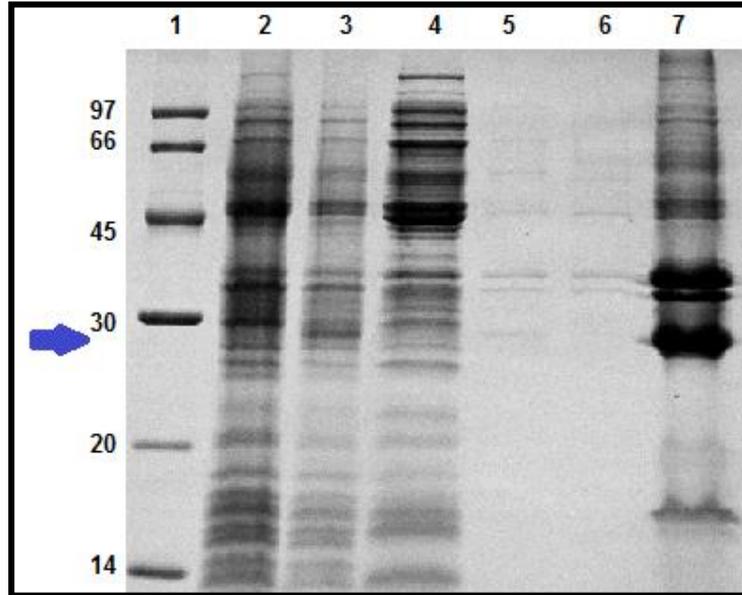


Figura 31: Solubilización de his-p19 con Urea. SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1- Marcador de peso molecular (kDa) 97 -66-45- 30- 20-14; 2- Células sin inducir; 3- Fracción insoluble de la inducción; 4-Fracción soluble de la inducción;5-Fracción soluble del ensayo Urea 2M; 6- Fracción soluble del ensayo Urea 8M; 7-Fracción insoluble del ensayo Urea 8M. La mayor cantidad de his-p19 se presenta de forma insoluble (carril 7).

En la figura se observa una banda en el carril 7 un poco menor a 30kDa que corresponde a la his-p19, señalada con una flecha azul.

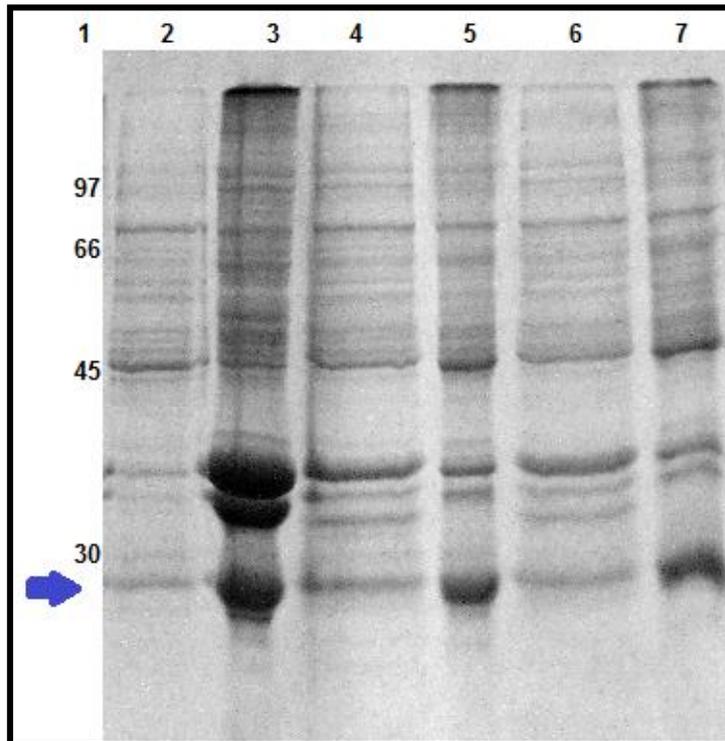


Figura 32: Solubilización de his-p19 con Urea y DTT, o SDS. SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1- Esquema de pesos moleculares (kDa) 97 -66-45- 30- 20-14; 2-Fracción soluble del ensayo con Urea 8M y DTT 5mM; 3- Fracción insoluble del ensayo con Urea 8M y DTT 5mM; 4-Fracción soluble del ensayo con SDS 0.2%; 5- Fracción insoluble del ensayo con SDS 0.2%; 6-Fracción soluble del ensayo con SDS 2%; 7- Fracción insoluble del ensayo con SDS 2%. En los tres ensayos la mayor cantidad de his-p19 se presenta de forma insoluble (carriles 3, 5, 7). En la figura se observa la banda correspondiente a la his- p19 con un peso molecular poco menor a 30kDa, señalada con una flecha azul.

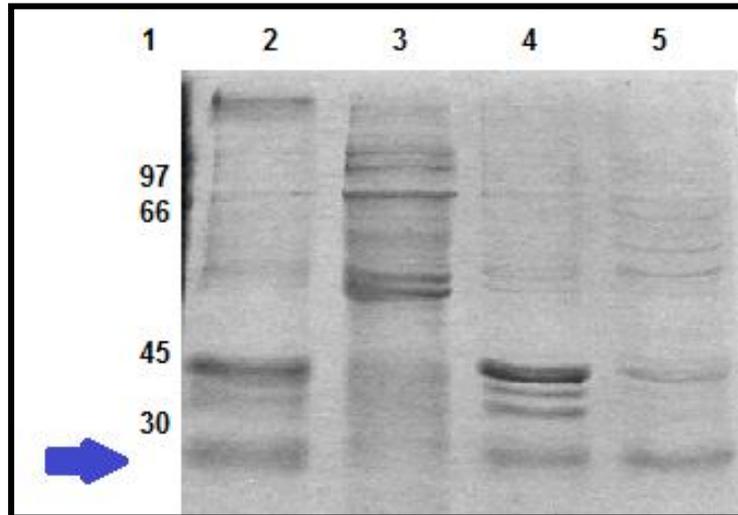


Figura 33: Solubilización de his-p19 con Triton X-100 y Sarcosyl. SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1- Esquema de pesos moleculares (kDa) 97 -66-45- 30; 2-Fracción insoluble del ensayo Triton X-100 1%; 3- Fracción soluble del ensayo Triton X-100 1%; 4-Fracción insoluble del ensayo con Sarcosyl 1%; 5- Fracción soluble del ensayo Sarcosyl 1%. En los 2 ensayos se presenta his-p19 de forma insoluble (carriles 2, 4). En el ensayo con Triton el 100% de la his-p19 esta insoluble, en el ensayo con Sarcosyl se logra solubilizar el 50% aproximadamente de la his-p19 (carril 5). En la figura se indica con una flecha azul, la banda correspondiente a la his-p19 con un peso molecular poco menor a 30kDa.

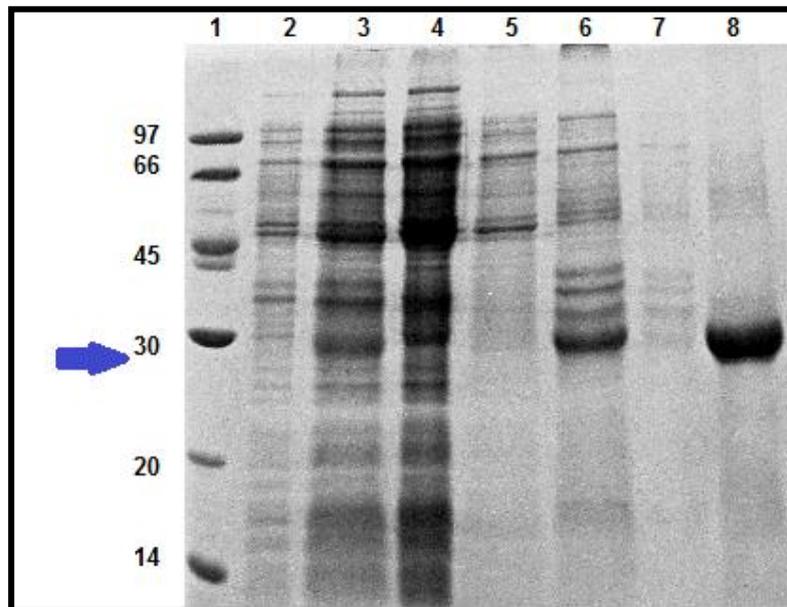


Figura 34: Purificación de his-p19 con columna de Ni-NTA His•Bind® Resin SDS-PAGE 15% teñido con Coomassie R-250. 1- Marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20; 14kDa); 2- Células sin inducir; 3- Células inducidas; 4- Fracción soluble de la inducción; 5- Fracción soluble del tratamiento con Triton X-100; 6- Fracción soluble del tratamiento con Sarcosyl 1% (muestra que se aplico en la columna); 7- Fracción no retenida; 8-Eluído. En la figura se observa una banda menor a 30kDa que corresponde a la his-p19, señalada con una flecha azul. Se puede ver que sí hay purificación de la his-p19 ya que se ve una banda en el carril 8 que corresponde a la fracción eluída de la columna.

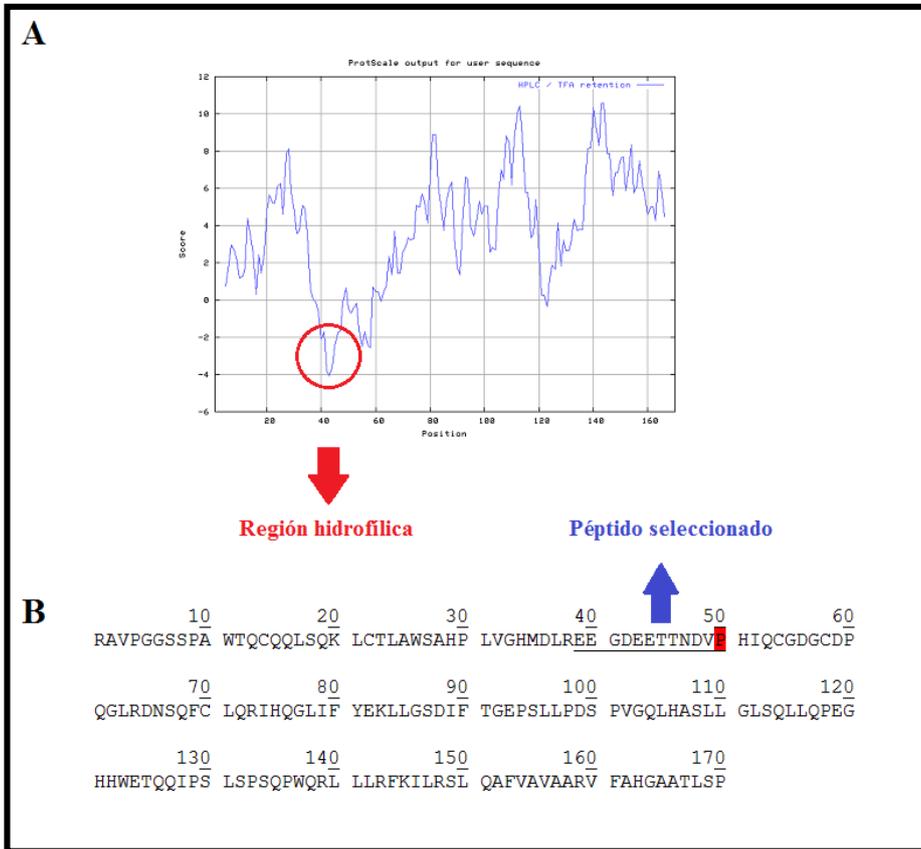


Figura 35: Estudio teórico de la secuencia aminoacídica de p19. A- Resultados del análisis computacional de hidrofobicidad de la secuencia primaria de la p19 usando la escala de coeficiente de retención en TFA. La región menos hidrofóbica se indica con un círculo rojo. B- Secuencia aminoacídica de la p19. Se señala en la secuencia el péptido seleccionado para la síntesis.

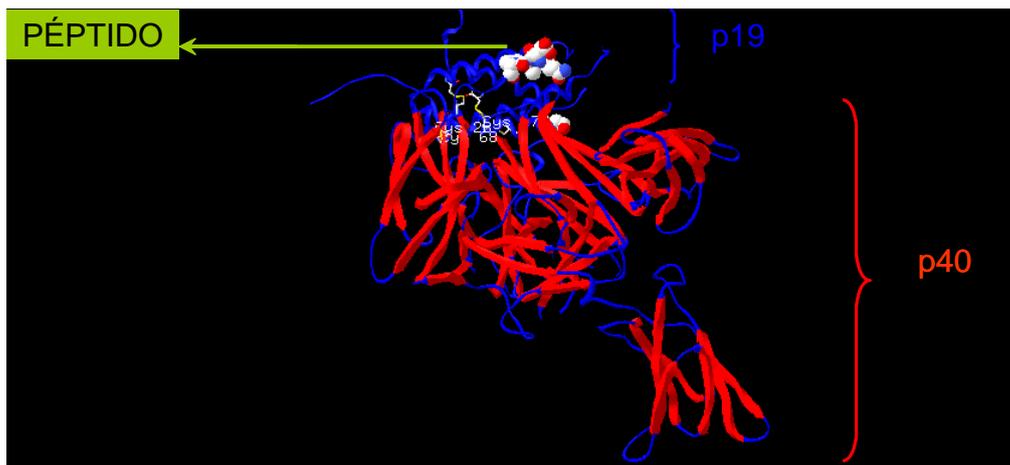
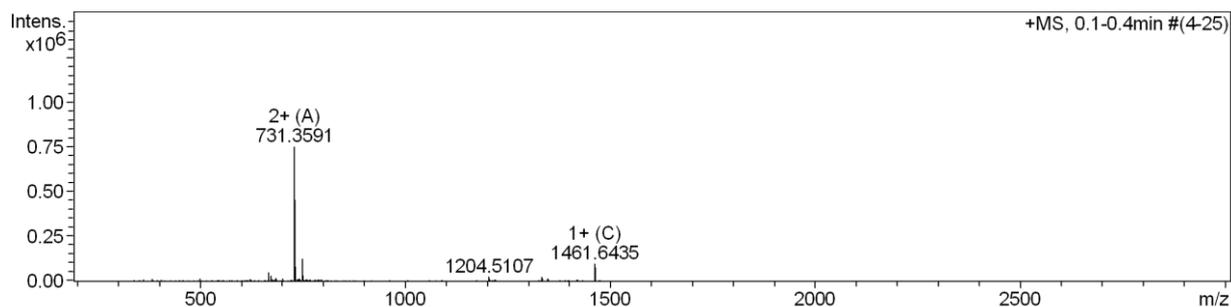


Figura 36: Estructura cuaternaria teórica de IL-23. Azul- se observa la subunidad p19; Rojo- se observa la subunidad p40; Representación con bolas y flecha verde- señala el péptido candidato para la síntesis. EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/).



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundante	Relative Abundante
A	1461.6984	1462.5152 [M + H] ⁺	747571	100.00
B	1499.6189	1500.3574 [M + H] ⁺	138519	18.53
C	1461.6413	1462.3084 [M + H] ⁺	96322	12.88

Figura 37: Resultados del análisis del producto de síntesis del péptido por espectrometría de masa. Las especies A y C corresponden al péptido (masa molar 1461.69 y 1461.64), siendo que la primera se encuentra doble-cargada y la segunda mono-cargada.

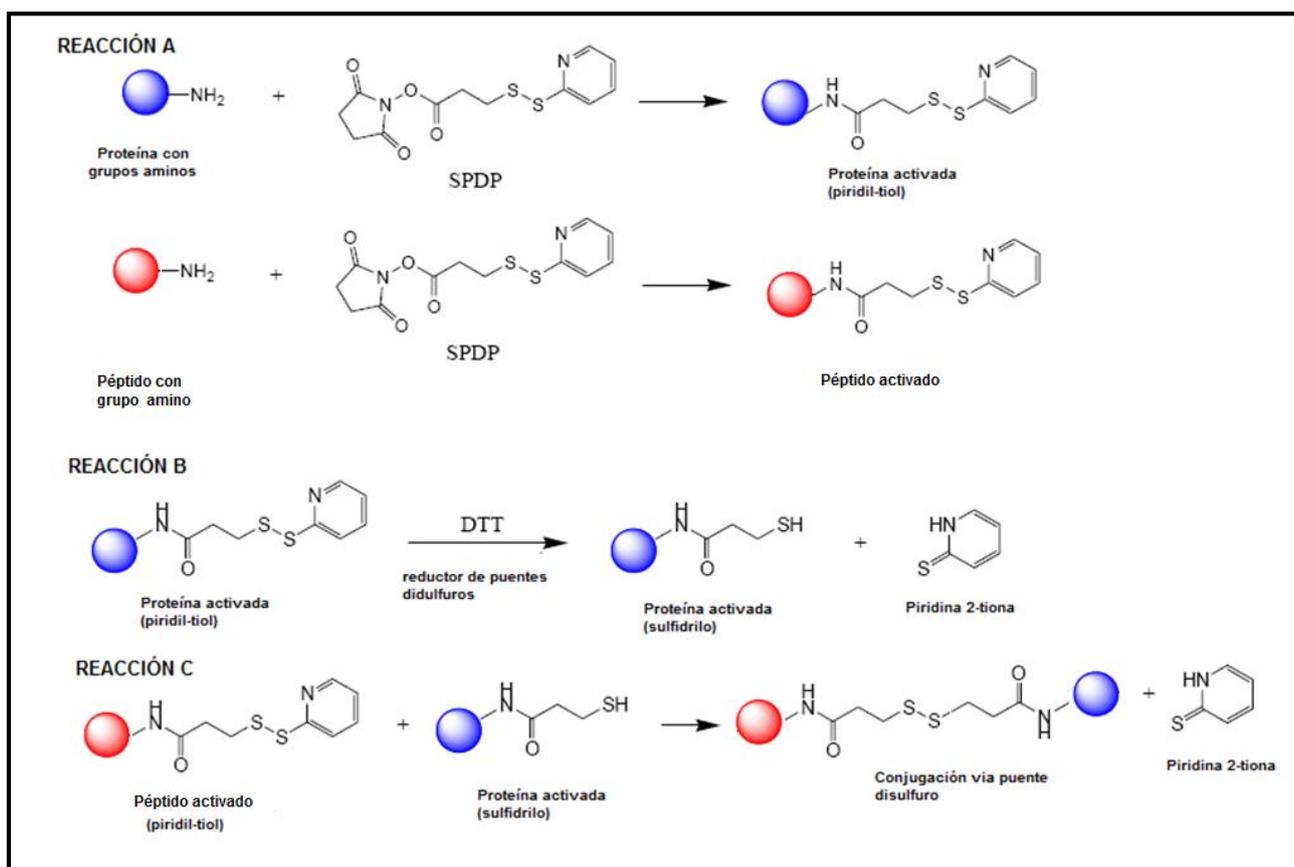


Imagen modificada a partir de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011212_SPDP_CrsLnk_UG.pdf

Figura 38: Esquema de la conjugación proteína-péptido. **Reacción A-** Los dos componentes de la conjugación se activan con SPDP; **Reacción B-** uno de los actores se reduce con DTT formándose un grupo sulfhidrilo; **Reacción C-** el grupo sulfhidrilo, reacciona con el grupo piridiltiol generado en el paso A, formándose un puente disulfuro entre ambos actores de la conjugación.

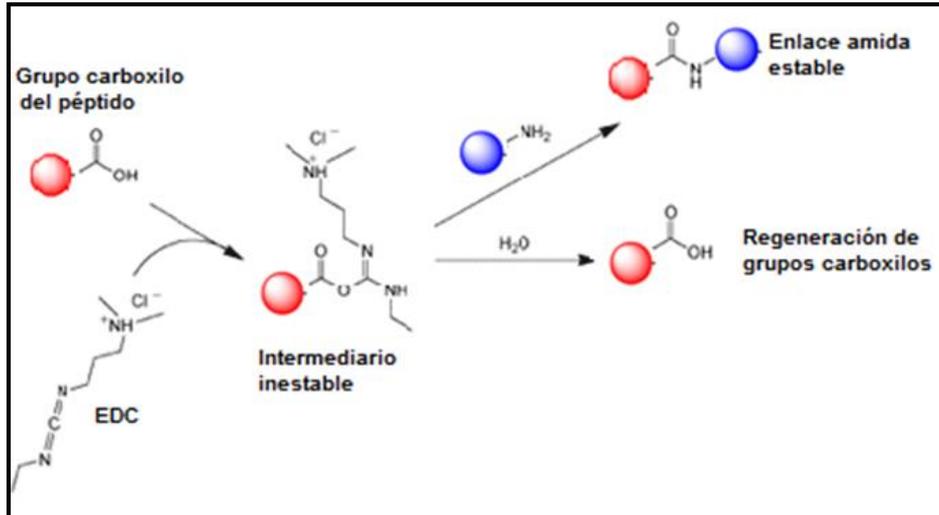


Imagen modificada a partir de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22980>

Figura 39: Esquema de la conjugación péptido-péptido. El EDC reacciona con los grupos carboxilo del péptido formando un intermediario reactivo. Este, reacciona con el grupo amino primario del péptido (nucleófilo) para formar un enlace amida entre ambos. Hay una reacción de competencia con el agua.

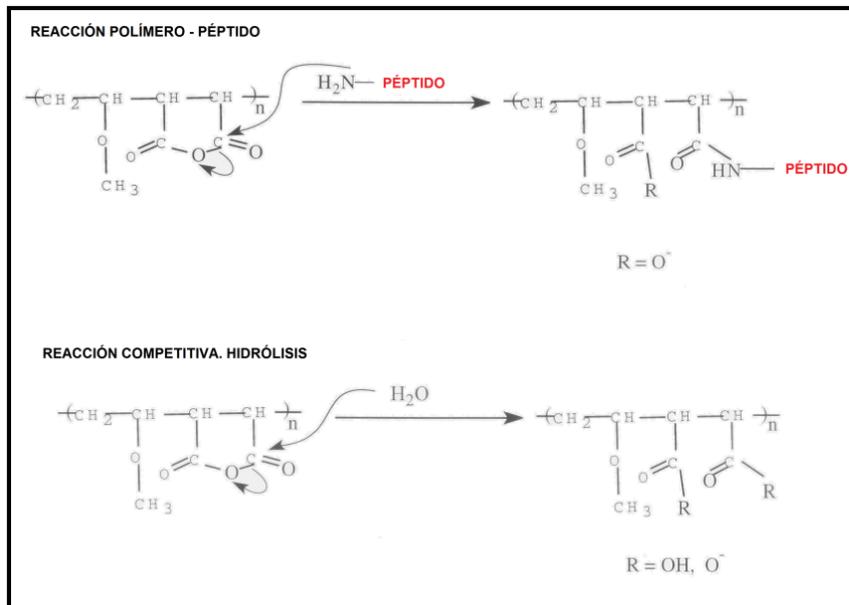


Figura 40: Esquema de la conjugación P(MAMVE)-péptido. Los grupos anhídrido del polímero reaccionan con el grupo amino primario del péptido. Hay una reacción de competencia con el agua.

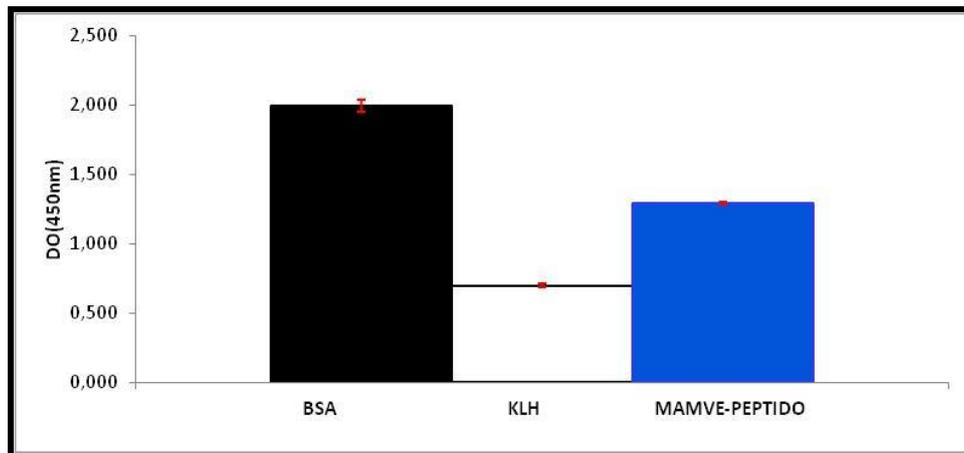


Figura 41: Gráfico con los resultados del ELISA para evaluar la respuesta de los sueros hiperinmunes de ratón. El gráfico presenta los resultados de una dilución 1/1000 del conjunto de sueros frente a la BSA, KLH y al P(MAMVE)-péptido, se graficaron los valores de DO luego de restarle la señal del blanco.

Según lo esperado se observa respuesta frente a la BSA (DO_{450nm} 1.9) y KLH (DO_{450nm} 0.7), a su vez se obtuvo una buena respuesta frente al péptido (DO_{450nm} 1.3), que era el objetivo de las inmunizaciones.

Se representa en rojo el Desvío Estándar de las muestras.

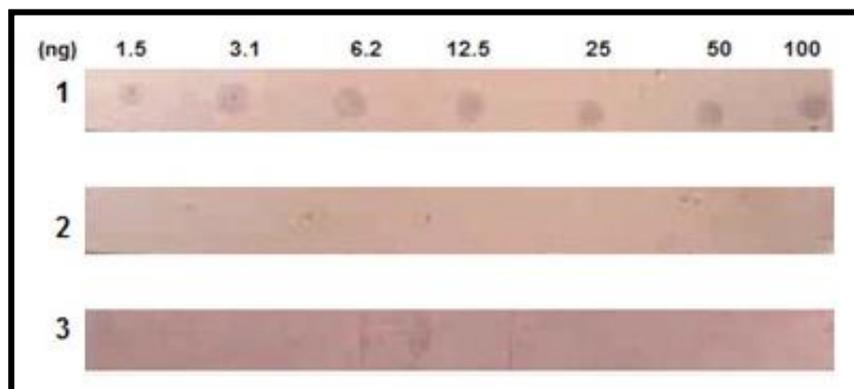


Figura 42: Dot Blot para evaluar la respuesta de los sueros hiperinmunes de ratón frente a la IL-23.

Las tres membranas de nitrocelulosa fueron sensibilizadas con diluciones crecientes de la IL-23 recombinante (1.5-3.1-6.2-12.5-25-50-100ng).

1-Sueros hiperinmunes en una dilución 1/200 en PBS-T 20 0.1%

2-Sueros preinmunes en una dilución 1/200 en PBS-T 20 0.1%

3-Control del conjugado.

Se observa una señal positiva en 1, no así en 2 y 3, evidenciando que el conjunto de sueros hiperinmunes reconoce la IL23 recombinante.

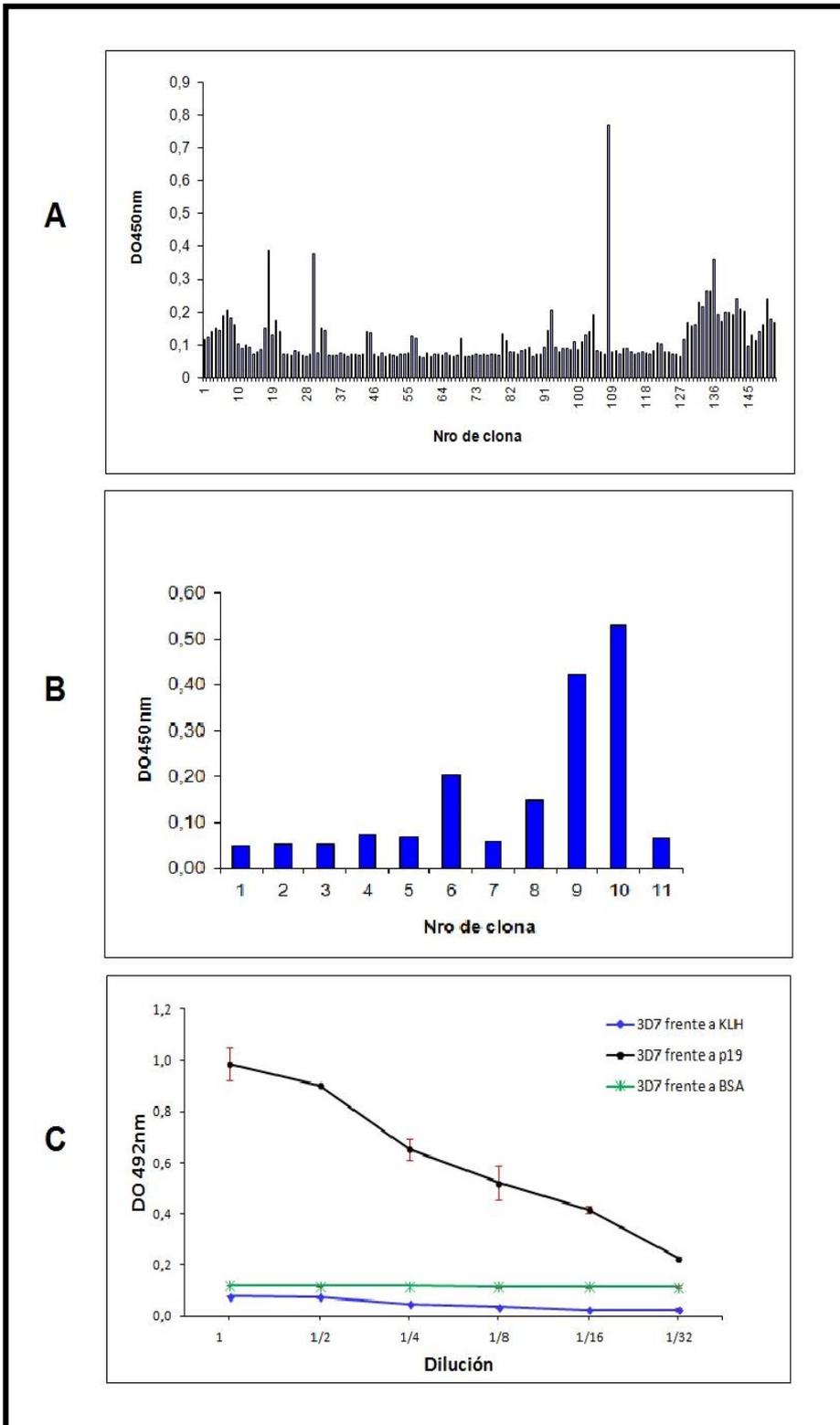


Figura 43: Gráficos con los resultados de los ELISAs para evaluar la selección del hibridoma específico.

A-Gráfico con el resultado del ELISA en el cual se evaluaron las clonas resultantes de la Fusión, frente a la his-p19 (100µL/pocillo con 5µg/mL). En el mismo se presentan los resultados de DO_{450nm} en función de la clona. Se puede observar que sólo 3 clonas resultaron tener una reconocimiento diferencial por la his-p19.

B- Gráfico con el resultado del ELISA para evaluar el subclonado de la clona 3D7, frente a la his-p19 (100µL/pocillo con 5µg/mL). Se grafican los resultados de DO_{450nm} en función de la clona.

C-El gráfico presenta los resultados del ELISA en el cual se evaluaron diluciones al medio del sobrenadante de cultivo del monoclonal 3D7 frente a la BSA, KLH y a his-p19 (todas a 100µL/pocillo con 5µg/mL), se graficaron los valores de DO_{492nm} luego de restarle la señal del blanco. Se observa respuesta frente a la his-p19, no así frente a BSA y KLH. Se representa en rojo el Desvío Estándar de las muestras.

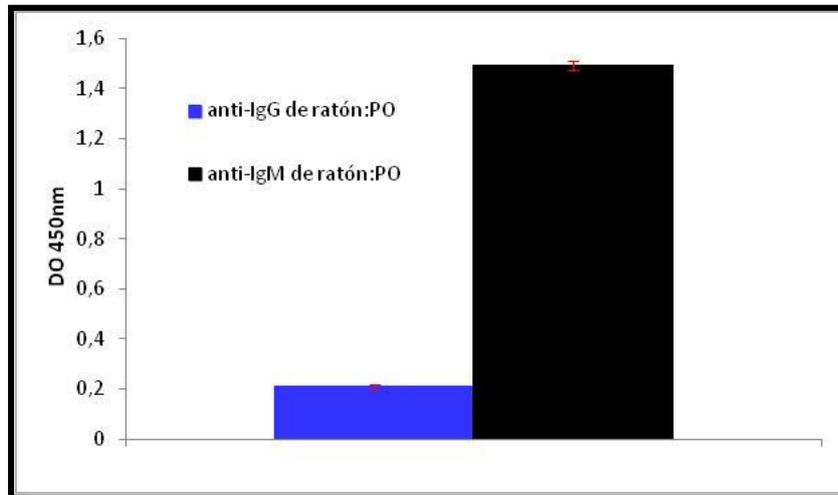


Figura 44: Gráfico con los resultados del ELISA para determinar el isotipo del monoclonal 3D7. El gráfico presenta los resultados del ELISA de captura sensibilizado con un Ac anti- γ totales de ratón (100 μ L/pocillo con 5 μ g/mL) hecho en cabra, donde la muestra es sobrenadante de cultivo del monoclonal 3D7. Se usó como Ac secundario el conjugado anti-IgM de ratón:PO por un lado y el conjugado anti-IgG de ratón:PO por otro.

Se observa que hay una señal positiva cuando se usa el conjugado anti-IgM no así con el anti-IgG por lo que se concluye que el 3D7 pertenece al isotipo IgM.

Se representa en rojo el Desvío Estándar de las muestras.

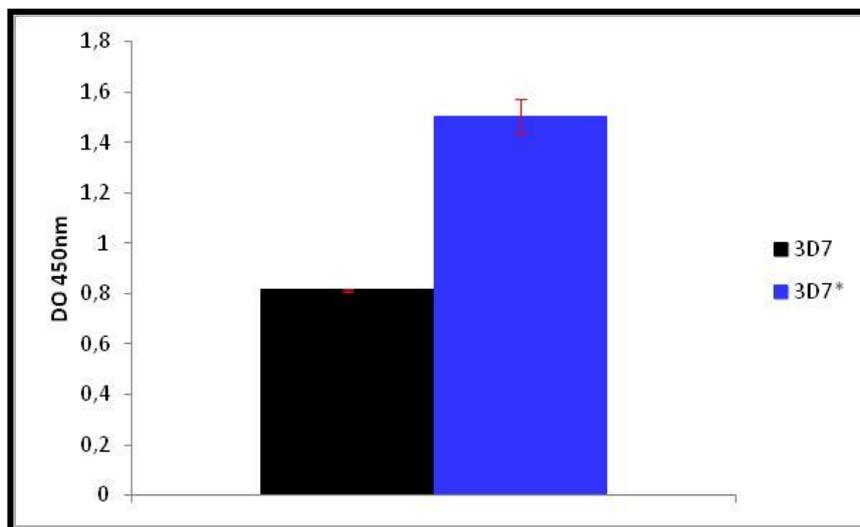


Figura 45: Gráfico con los resultados del ELISA para evaluar la respuesta del monoclonal derivatizado (3D7*) y sin derivatizar (3D7). El gráfico presenta los resultados de la IgM parcialmente reducida y derivatizada (3D7*) y de la IgM sin tratar (3D7) frente a his-p19 (100 μ L/pocillo con 5 μ g/mL). Se observa que la señal es mayor en el caso del 3D7*. Se representa en rojo el Desvío Estándar de las muestras.

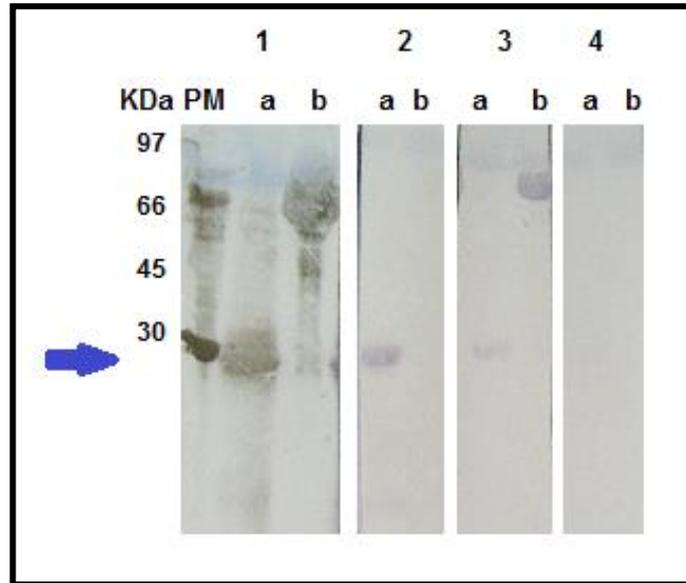


Figura 46: Western Blot para evaluar el 3D7*. Membrana de transferencia de un SDS-PAGE 12%. a) carril con his-p19 (10µg) ; b) carril con BSA(10µg). A la izquierda de la figura se muestran los pesos moleculares (kDa) 97 -66-45- 30; 1- Membrana teñida con tinta China (PM-peso molecular); 2- Membrana incubada con 0.1µg/mL de 3D7*; 3- Membrana incubada con suero hiperinmune anti-péptido de ratón 1/200; 4- Control del conjugado. Se señala con una flecha azul la p19.

En esta figura, en las membranas 2 y 3 se aprecia una banda cercana a 30kDa que corresponde a la his-p19, en la membrana 3 también se observa una banda a 66kDa que corresponde a la BSA. Con esto se confirma que el monoclonal 3D7 reconoce específicamente p19 recombinante.

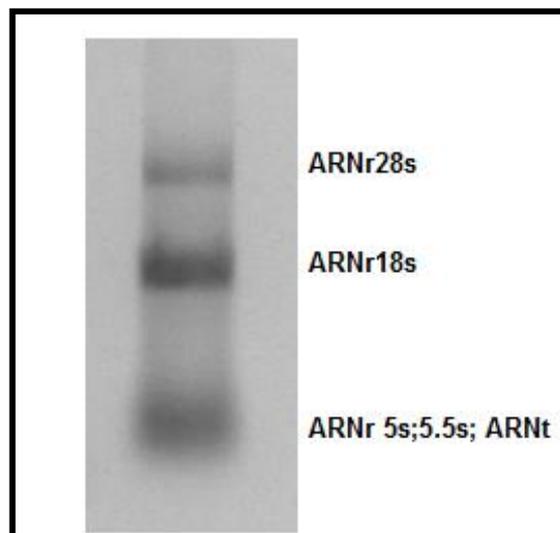


Figura 47: Purificación de ARN total de 3D7. Gel de agarosa 1%. Se pueden observar 3 bandas, que como se señala en la figura corresponden a los distintos ARNr. De estos resultados se deduce que el ARN está parcialmente degradado ya que la relación de las primeras dos bandas debería ser 2:1, como se puede observar que la segunda banda es de mayor intensidad, se estima que hay degradación.

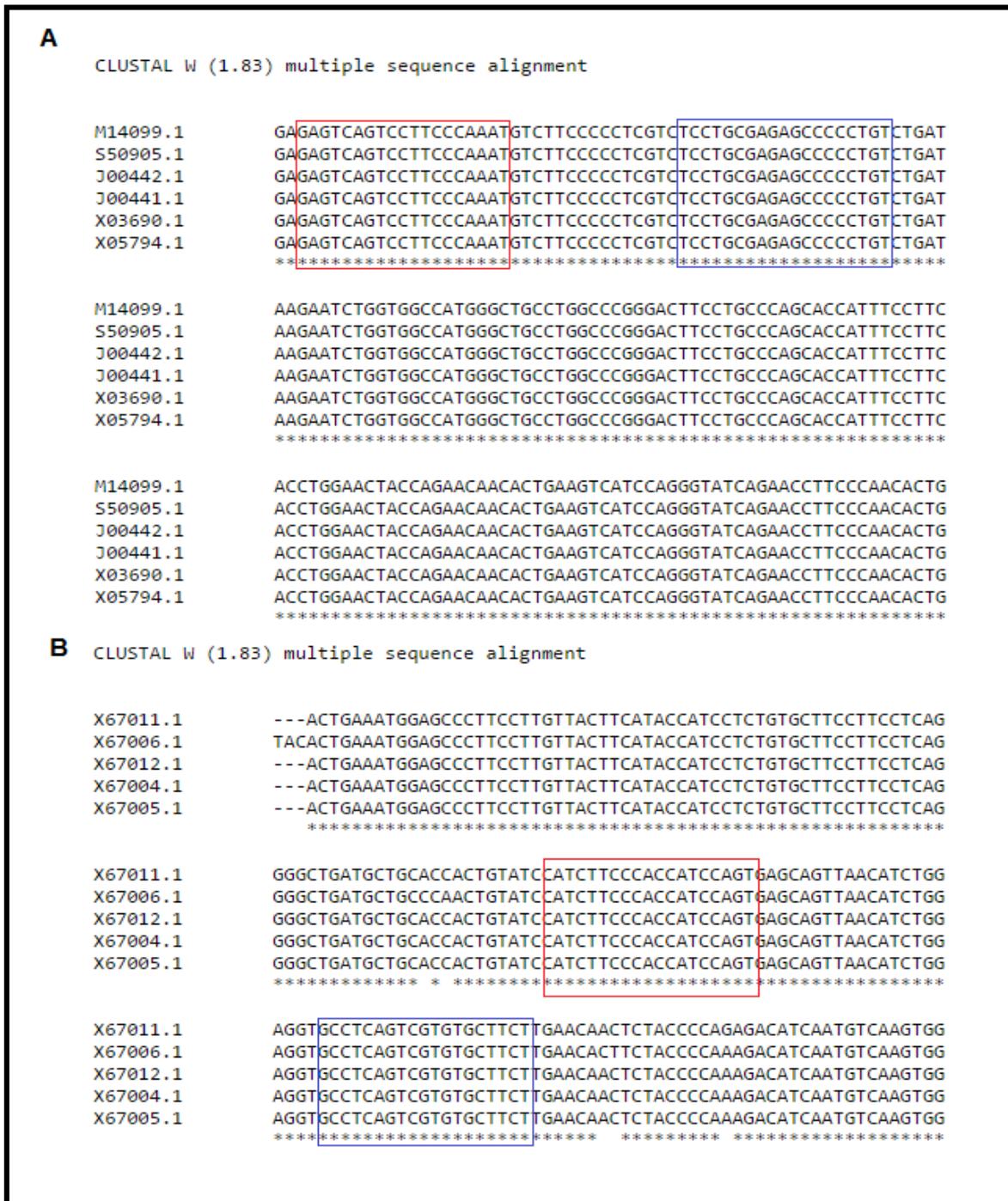


Figura 48: Alineación de las secuencias constantes μ y κ murinas. Resultados de la alineación de las secuencias constantes murinas de la cadena μ y κ usando el programa Clustal W (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html/>). A- Secuencias de la cadena μ ; B - Secuencias de la cadena κ . En rojo y en azul se señala las regiones de donde se diseñaron los cebadores.

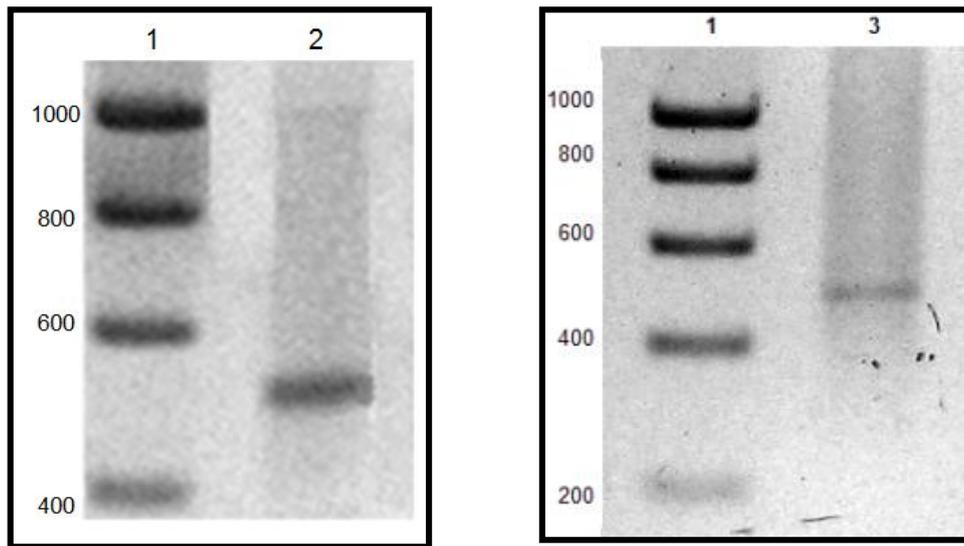


Figura 49: Amplificación de las cadenas $V\mu$ y $V\kappa$ murinas por PCR. Gel de agarosa 1.5%. 1-Marcador de tamaño (pb); 2- Amplificación de la cadena $V\mu$ murina con los cebadores sentido AAP y antisentido MIgMR N; 3- Amplificación de la cadena $V\kappa$ murina con los cebadores sentido AAP y antisentido MCKR N. Se puede observar en el carril 2 una banda aproximada a 500pb que corresponde a la región $V\mu$ y en carril 3 una banda aproximada a 500pb que corresponde a la región $V\kappa$.

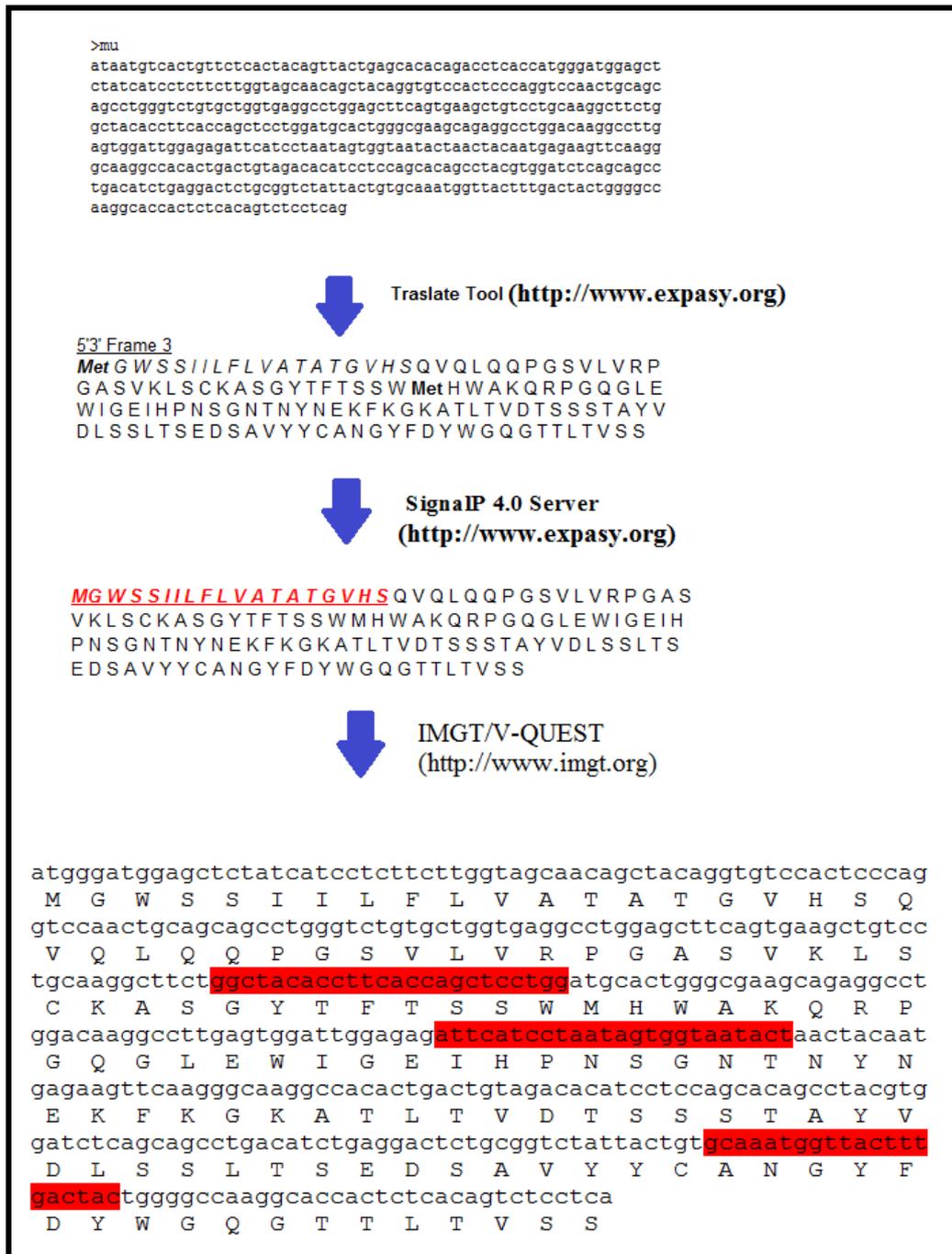


Figura 50: Análisis informático de la cadena Vu del 3D7. Se utilizaron para el análisis los programas: Translate Tool, SignalP 4.0 (<http://www.expasy.org/>), IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>). En rojo se señala el péptido señal (Letra) y el CDR1; CDR2; CDR3 (resaltado) respectivamente.

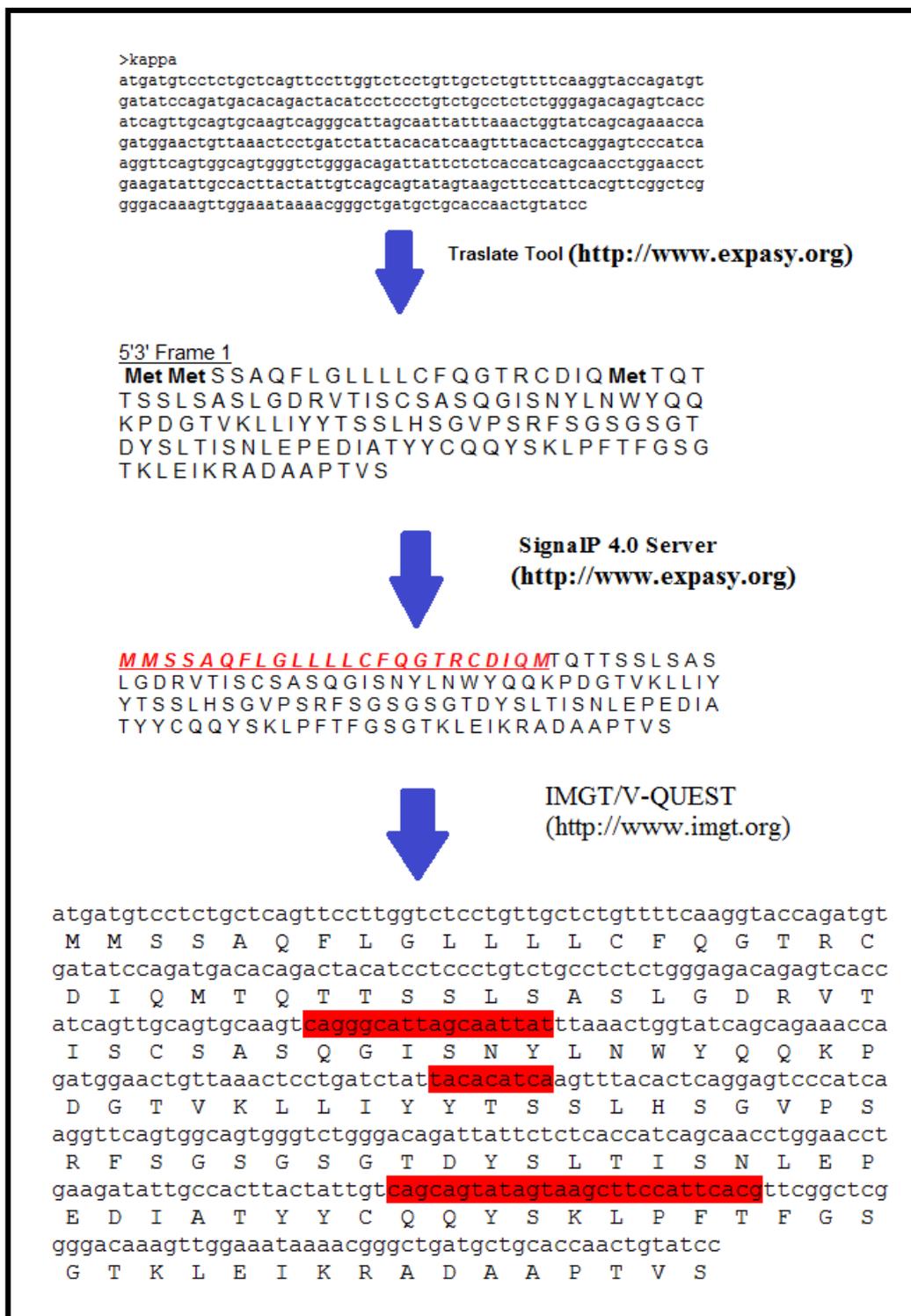


Figura 51: Análisis informático de la cadena k variable del 3D7. Se utilizaron para el análisis los programas: Translate Tool, SignalP 4.0 (<http://www.expasy.org/>), IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org/>). En rojo se señala el péptido señal (Letra) y el CDR1; CDR2; CDR3 (resaltado) respectivamente.

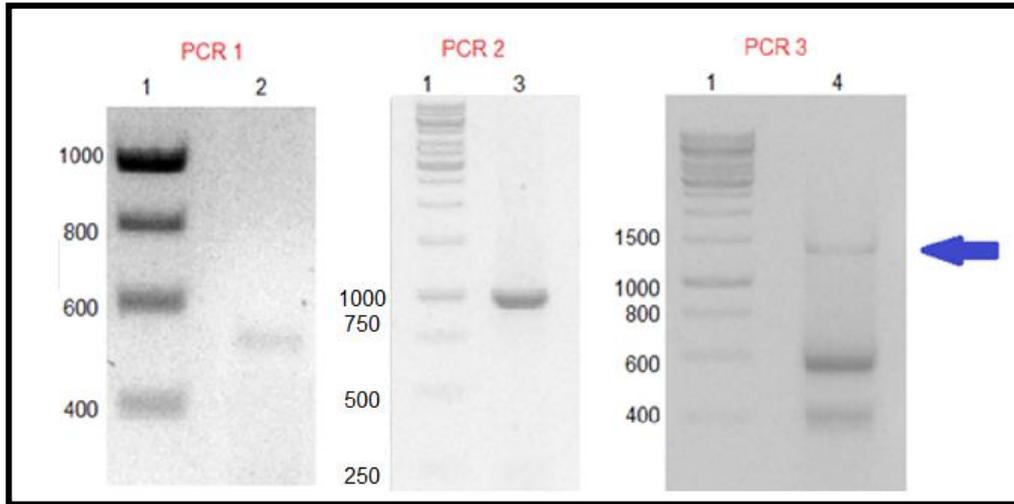


Figura 52: Obtención de la cadena quimérica μ - γ por PCR de extensión por sobreposición. Geles de agarosa 1 %. 1-Marcador de tamaño (pb); 2- Amplificado de la cadena $V\mu$ murina con los cebadores sentido VmuMF y antisentido FusVmuM/CgHR; 3- Amplificado de la cadena constante γ humana con los cebadores sentido FusVmuM/CgHF y antisentido Cg1HR; 4- Amplificado de la PCR de extensión por sobreposición para generar la cadena quimérica μ - γ con los cebadores sentido VmuMF y antisentido Cg1HR. Se puede observar en el carril 2 una banda a 400pb aproximadamente que corresponde a la región $V\mu$ (PM = 404pb), en carril 3 una banda a 750pb aproximadamente que corresponde a la región constante γ (PM = 753pb) y en el carril 4 se observa una banda entre 1000-1500pb (señalada con una flecha azul) que corresponde a la cadena quimérica. Las bandas que aparecen de menor tamaño son productos inespecíficos de la reacción.

Figura 53: PCR de colonia para evaluar los transformantes *pcDNA3.1(-)/ μ - γ* . Gel de agarosa 1%. 1-Marcador de tamaño (pb); 2 al 16- Distintos clones; 17- Control negativo. Amplificados de la cadena quimérica μ - γ con los cebadores sentido VmuMF y antisentido Cg1HR; en los carriles 5, 6, 11 y 13 se puede observar una banda entre 1000-1500pb que corresponde a la secuencia quimérica μ - γ .

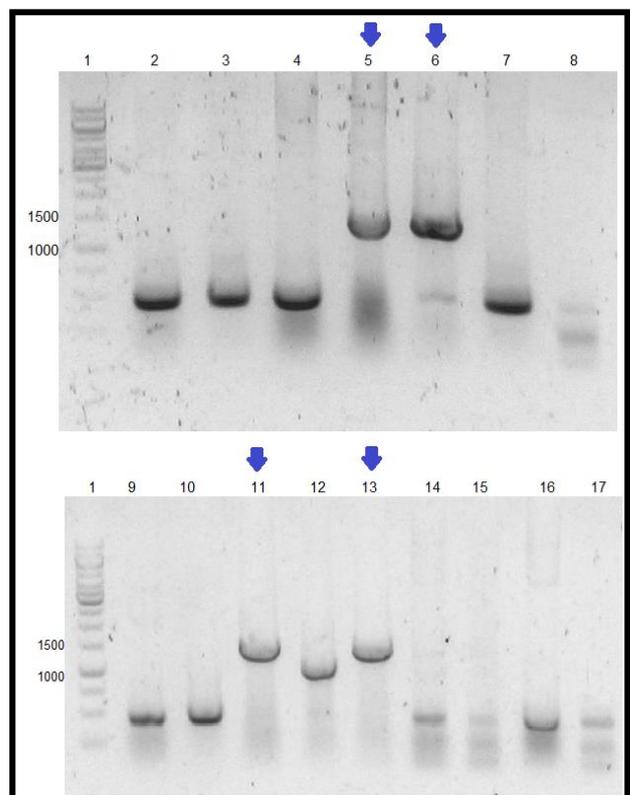
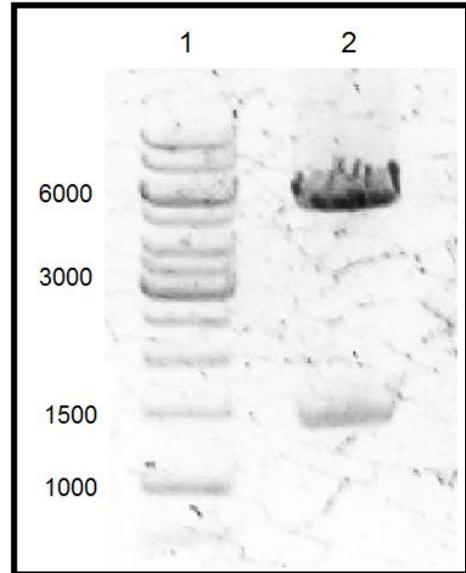


Figura 54: Digestión de pcDNA3.1(-)/μ-γ con *NheI* y *BamHI*. Gel de agarosa 1%. 1- Marcadores de tamaño (pb); 2- Plásmido pcDNA 3.1 (-)/μ-γ de 1 clon digerido con *NheI* y *BamHI*. Se observa una banda entre 1000-1500pb que corresponde a la secuencia quimérica μ-γ y una banda cercana a 6000pb que corresponde al plásmido pcDNA3.1 linealizado.



```

CCACCATGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACCTGC
AGCAGCCTGGGTCTGTGCTGGTGAGGCTTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA
CCAGTCTCTGGATGCACCTGGGCGAAGCAGAGGCTTGGACAAGGCTTGGAGTGGATTGGAGAGATTCATCCTAATA
GTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCT
ACGTGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAATGGTTACTTTGACTACTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC
TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCA
GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGACCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCGTGACCCAGGACT
GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCTTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACACTACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAC
AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA
    
```

Figura 55: Resultado de la secuenciación de pcDNA3.1(-)/μ-γ. En letra azul se indica la región Vμ; en letra negra se indica la región constante γ; resaltado con rojo se indica la secuencia Kozak y en cursiva y negrita se indica la secuencia correspondiente al péptido señal.

Se verifica que la secuencia corresponde a la secuencia quimérica μ-γ.

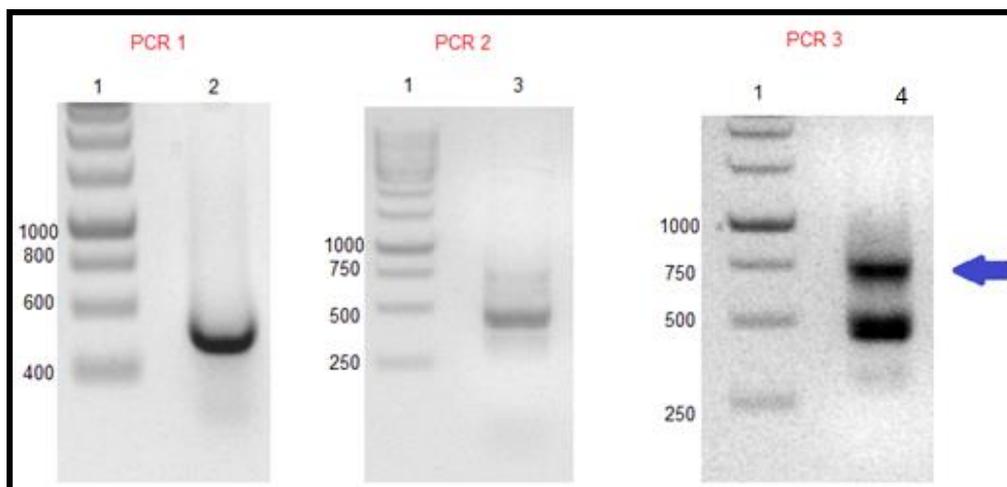


Figura 56: *Obtención de la cadena quimérica κ - κ por PCR de extensión por sobreposición.* Geles de agarosa 1 %. 1-Marcador de tamaño (pb); 2- Amplificado de la cadena V κ murina con los cebadores sentido V κ MF y antisentido FusV κ M/CkHR; 3- Amplificado de la cadena constante κ humana con los cebadores sentido FusV κ M/CkHF y antisentido CkHR. 4-Amplificado de la PCR de extensión por sobreposición para generar la cadena quimérica κ - κ con los cebadores sentido FusV κ M/CkHF y antisentido CkHR. Se puede observar en el carril 2 una banda a 400pb aproximadamente que corresponde a la región V κ (PM = 411pb), en carril 3 una banda a 400pb aproximadamente (PM = 321pb) que corresponde a la región constante κ y en el carril 4 una banda cercana a 750pb (señalada con una flecha azul) que corresponde a la cadena quimérica (PM = 733pb). La banda que aparece de menor tamaño es un producto inespecífico de la reacción.

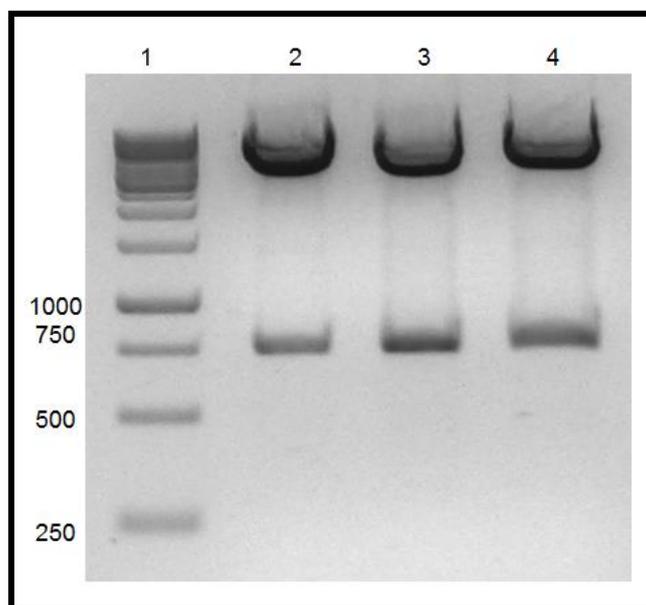


Figura 57: *Digestión de 3 clones pSecTag2B/k-k con NheI y BamHI.* Gel de agarosa 1%. 1- Marcadores de tamaño (pb); 2- 3- 4- plásmidos pSecTag2B/k-k de tres clones diferentes digeridos con NheI y BamHI. Se observa una banda cercana a 750pb que corresponde a la secuencia quimérica κ - κ y una banda de alto tamaño que corresponde al plásmido pSecTag2B linealizado.

```

ACC ATGA TGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATATC
CAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGTGCA
AGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATC
TATTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTAT
TCTCTCACCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTT
CCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCACT
GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
    
```

Figura 58: Resultado de la secuenciación de pSecTag2B/k-k. En letra azul- se indica la región Vκ; en letra negra se indica la región constante κ; resaltado en rojo se indica la secuencia Kozak y en cursiva y negrita se indica el péptido señal. Se verifica que la secuencia corresponde a la secuencia quimérica κ-κ.

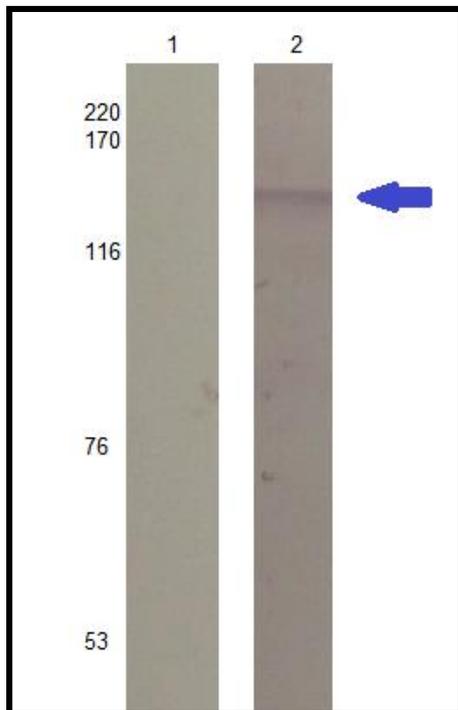


Figura 59: Western Blot para evaluar la producción del Ac Quimérico. Membrana de la transferencia de un SDS-PAGE 8%. A la izquierda de la figura se muestran los pesos moleculares (kDa); 1- Control del conjugado; 2- Membrana incubada con el conjugado anti IgG humana:FA. En la membrana 2 se aprecia una banda mayor a 116kDa y menor a 170kDa que corresponde al anticuerpo quimérico (150kDa). Se señala con una flecha azul la banda correspondiente al anticuerpo quimérico.

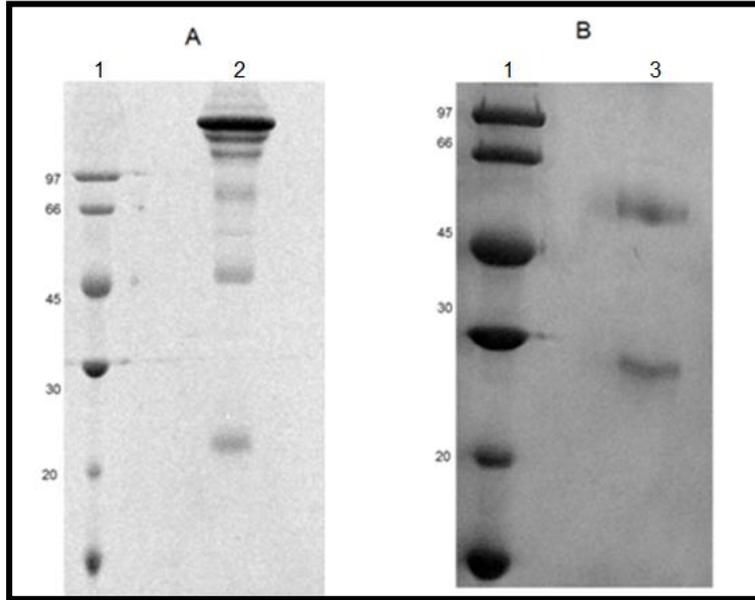


Figura 60: Evaluación del Ac Quimérico. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250. 1- PM (kDa) 97 -66-45- 30- 20; A2- Ac quimérico reducido con DTT; B3- Ac quimérico sonicado y reducido con DTT.

En la figura se observa que el anticuerpo sólo se reduce en su totalidad cuando se le realiza un paso previo de sonicación (carril B3).

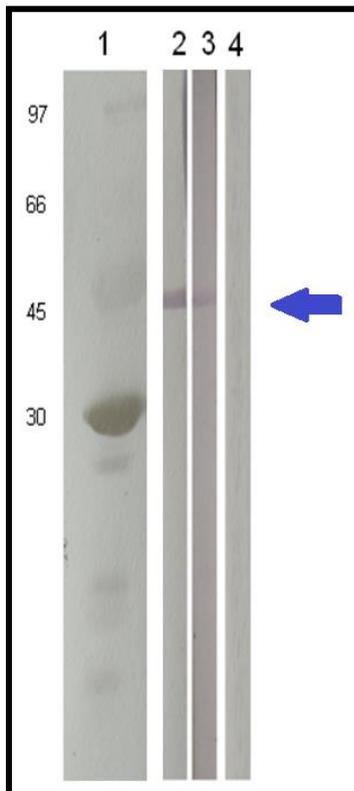


Figura 61: Western Blot para evaluar el reconocimiento de la p19 recombinante por el Ac Quimérico. Membrana de la transferencia de un SDS-PAGE 12% , la muestra es toda la mezcla de inducción del plásmido pGEX2T/p19. A la izquierda de la figura se muestran los pesos moleculares (kDa) 97 -66-45- 30; 1- Membrana teñida con tinta China (PM-peso molecular); 2- Membrana incubada con 0.1 µg/mL de 3D7*; 3- Membrana incubada con 0.1 µg/mL de Ac Quimérico; 4- Control del conjugado. Se señala con una flecha azul la GST-p19.

En esta figura, en las membranas 2 y 3 se aprecia una banda cercana a 45kDa que corresponde a la GST-p19, el Ac quimérico presenta la misma banda que el 3D7* (2), con esto se confirma que el Ac quimérico reconoce específicamente p19 recombinante.

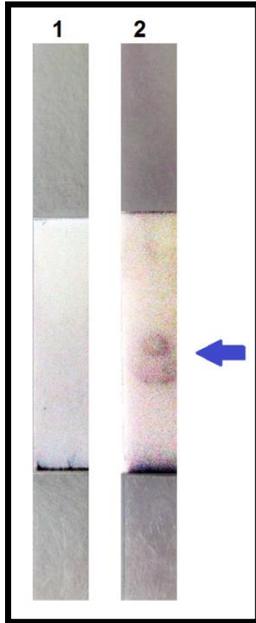


Figura 62: *Inmunocromatografía para evaluar la reactividad del Ac quimérico frente a la IL-23.*

Membrana 1: Sensibilizada con 1µg de BSA.

Membrana 2: Sensibilizada con 1µg de IL-23 recombinante.

En los dos ensayos se colocó 100µl del conjugado Ac quimérico: Au en el pocillo de muestra del dispositivo plástico de la inmunocromatografía.

Se observa una señal positiva en 2 (Se señala con una flecha azul), no así en 1, evidenciando que el quimérico reconoce la IL23 recombinante.

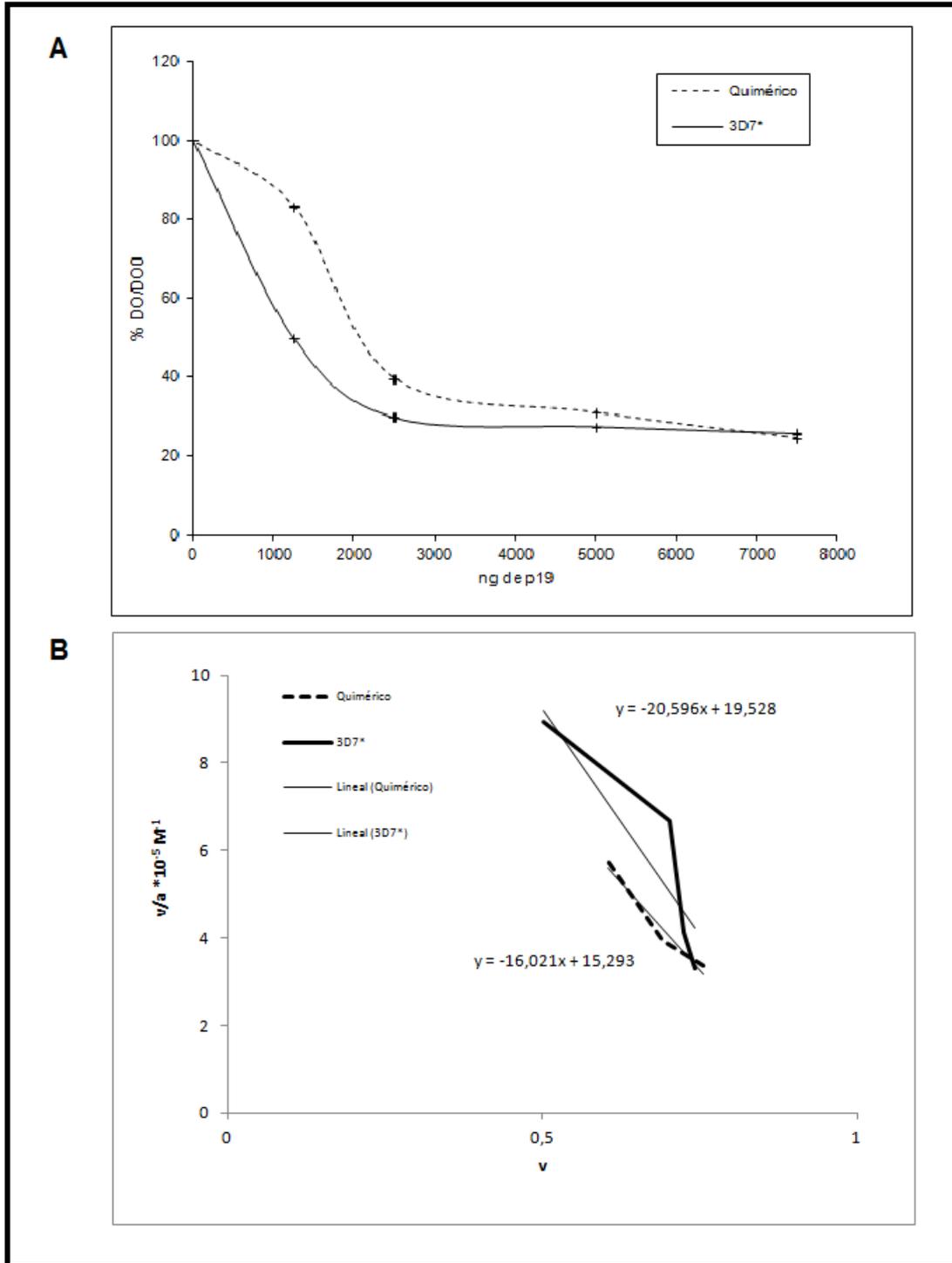


Figura 63: Gráficos con los resultados del ELISA competitivo para 3D7* y el Ac Quimérico. La placa de ELISA se sensibilizó con 100µL/pocillo de 5µg/mL de his-p19. Antes de sembrar la dilución del Ac Quimérico y del 3D7* se pre incubaron con his-p19 en distintas concentraciones.

A-El gráfico presenta los resultados de % DO/DO0 en función de los ng de p19; B- El gráfico presenta los resultados de v/a en función de v (Definidas según el método de Friguet y aplicando la ecuación de Scarchard). Se representa como I el Desvío Estándar de las muestras (A).

v- Fracción de Ac unido

a- Concentración de antígeno libre en el equilibrio

CONCLUSIONES

En los últimos años, los anticuerpos han emergido como fármacos para terapias frente a distintas enfermedades, fundamentalmente para enfermedades autoinmunes y cáncer².

La estrategia más sencilla de obtener un anticuerpo terapéutico es la utilización de un anticuerpo monoclonal de ratón. Sin embargo esta estrategia se ve limitada por el bajo éxito clínico de los mismos, debido a que no hay una correcta interacción de la región Fc del mAc con los receptores y proteínas efectoras y a la alta inmunogenicidad cuando son administrados en humanos⁴. Estas últimas limitaciones pueden superarse con la quimerización o la humanización del anticuerpo de ratón.³

En esta tesis se generó un Ac químérico anti-IL-23. Se seleccionó este blanco por su rol patogénico en distintas enfermedades autoinmunes⁵⁻⁸; suprimiendo la actividad de esta proteína en pacientes afectados, se reduciría la producción de IL-17 y otras citoquinas proinflamatorias sujetas a la vía dependiente de IL-17, eliminando o disminuyendo los síntomas de la enfermedad⁴⁰. Hoy en día, se cuentan con estudios que demuestran la eficacia clínica de la terapia de anticuerpos terapéuticos contra IL-23^{6,9}

Se utilizó la siguiente estrategia: primero se generó un péptido sintético de la proteína p19, que es una de las subunidades del dímero de la IL-23 junto a la p40⁶⁰, se investigó la inmunización de ratones con un péptido sintético para obtener un mAc. Después de la generación de un hibridoma secretor de mAc reactivo contra la proteína recombinante p19, se usó el clon 3D7 secretor de la subclase IgM para generar las cadenas quiméricas. El anticuerpo químérico se creó usando dos plásmidos de expresión eucariotas que llevaban: uno una construcción quimérica de cadena liviana y el otro la construcción quimérica de cadena pesada. La expresión del anticuerpo químérico se realizó co-transfectando células CHO-K1 con ambos plásmidos

Se realizó un estudio teórico de la p19 para poder seleccionar un péptido que teóricamente esté expuesto en la superficie de la misma, con la finalidad de usarlo como epítotope. El péptido sintetizado se conjugó a dos proteínas portadoras y a un polímero sintético, para poder generar y evaluar la producción de anticuerpos monoclonales de ratón frente al mismo. Con esta estrategia se logró obtener una buena respuesta inmune frente al hapteno.

Una vez seleccionado el monoclonal por su reconocimiento de la proteína recombinante his-p19, partiendo del ARNm del hibridoma se amplificaron las secuencias de las respectivas regiones variables codificantes de la cadena H y de la cadena L de la Ig. Paralelamente, las regiones constantes de IgG1 humana se amplificaron partiendo de las secuencias previamente clonadas por Patricia

Langjahr (Universidad de Chile). Usando la estrategia de PCR de extensión por sobreposición se generaron las cadenas quiméricas μ - γ y κ - κ , cada una de las cuales fue clonada en un plásmido de expresión eucariota.

La producción del Ac quimérico se realizó en células CHO-K1, que fueron co-transfectadas con ambos plásmidos. Se evaluó la expresión soluble del mismo en el medio de cultivo, mediante técnicas como ELISA y Western Blot y se purificó por afinidad con proteína G. Se comprobó que el mismo reconoce la p19 y la IL-23, y que la producción en las condiciones de laboratorio es de 8 $\mu\text{g/mL}$. La K_A del Ac quimérico obtenido frente a la p19 recombinante no es alta (en el orden de 10^{-5} M), estando en el límite inferior de lo esperable para los anticuerpos, si bien éste valor es congruente, ya que se partió de un monoclonal de clase IgM. Dicha afinidad, podría mejorarse realizando una maduración de la afinidad in-vitro, para lo cual existen varias estrategias (informáticas, y demás) para tener una aproximación de las mutaciones que se pueden llevar a cabo, las cuales teóricamente mejoren la afinidad del anticuerpo.

Comprobada la especificidad del Ac valdría decir que el mismo podría llegar a tener una aplicación terapéutica, pero siempre tendría que tener una mejora en la afinidad.

Un aspecto muy importante, el cual fue la principal motivación de la elección del tema de la tesis, es que con el desarrollo de la misma se generó en nuestro laboratorio la experiencia en la generación y producción a pequeña escala de Ac quiméricos, así como la utilización de haptenos para la obtención de los mismos.

ANEXO I

PROTOCOLOS GENERALES

A) Preparación de Células Competentes con CaCl₂

Se cultivan las células o/n en 10mL de medio LB (Sigma, USA), con agitación orbital a 200rpm 37°C (Incubator Shaker LOM-150/150-2/150D, mrc). El cultivo se expande en 100mL con LB/antibiótico, y se cultiva en las mismas condiciones hasta tener una lectura de DO_{600nm} ≤ 0.4 (crecimiento de células viables no mayor a 10⁸células/mL para E. coli) (UV/visible Spectrophotometer Utrospec. 3100pro, Amersham Biosciences). El mismo, se centrifuga a 4000g 10min 4°C (Sigma 3-30K, USA), el botón celular se resuspende en 50mL de CaCl₂ 100mM (Sigma, USA) y se incuba 10 min en hielo. Las células se recuperan mediante centrifugación a 4000g 10min 4°C y se resuspenden en 30mL de CaCl₂ 100mM mezclando suavemente, posteriormente se centrifugan a 4000g 10min 4°C. El botón celular se retoma en 4mL de CaCl₂ 100mM. Las células competentes se fraccionan en alícuotas de a 200µL y se guardan a -80°C con 20% de Glicerol (Sigma, USA)⁷⁴.

B) Digestión con enzimas de restricción

La digestión de plásmido o inserto con enzima de restricción se realiza según las especificaciones del proveedor (Fermentas, USA).

Digestión con:

- EcoRI* 1h a 37°C, inactivando la enzima 15min a 65°C; (1 unidad de EcoR I /0.1µg de ADN)
- NotI*: 1h a 37°C, inactivando la enzima 20min a 80°C; (10 unidad de Not I /1µg de ADN)
- HindIII*: 1h a 37°C, inactivando la enzima 20min a 80°C; (20 unidad de Hind III /1µg de ADN)
- NheI*: 1h a 37°C, inactivando la enzima 15min a 65°C; (10 unidad de NheI /1µg de ADN)
- BamHI*: 1h a 37°C, inactivando la enzima 15min a 80°C; (20 unidad de BamHI /1µg de ADN)
- SalI*: 1h a 37°C, inactivando la enzima 20min a 65°C; (20 unidad de Sal I /1µg de ADN)
- SmaI*: 1h a 25°C, inactivando la enzima 20min a 65°C; (40 unidad de SmaI /1µg de ADN)

Al realizar digestión con dos enzimas, si son compatibles los tampones de digestión y las temperaturas, la reacción se realiza con ambas enzimas simultáneamente.

C) Análisis de muestras de ADN y ARN por electroforesis

El análisis de ADN y ARN se lleva a cabo en un gel de agarosa (entre 0.8 y 2% según corresponda) en TAE (Tris 40mM; Acido acético 20mM; EDTA 1mM) con BrEt (Invitrogen, USA) a 100v 15-20min (Gel electrophoresis apparatus, Cleaver Scientific Ltd) (Electroforesis Power Supply EPS 301, Amersham). Las bandas resultantes se observan bajo luz ultravioleta (UV Transilluminator, Cleaver Scientific Ltd).

D) Desfosforilación de ADN

La desfosforilación se realiza usando una relación de 1 unidad de Fosfatasa Alcalina (Sigma, USA) cada 100pmoles de plásmido, se incuba 30min a 37°C, inactivando la enzima a 65°C 20 min.

E) Ligación de ADN

La ligación inserto-plásmido se lleva a cabo con la ligasa T4 (Sigma, USA) según especificaciones del proveedor. Se usa una relación pmol end inserto: plásmido; 3:1 y/o 6:1, o/n a 16°C (Thermomixer Comfort, Eppendorf), la enzima se inactiva a 65°C 20min. Con la mezcla de ligación (5-7µL), se transforman células competentes por choque térmico⁷⁴.

F) Transformación de células competentes por choque térmico

A 200µL de suspensión de células competentes se les agrega 1µL de plásmido o 7µL mezcla de ligación (calculando 10^5 a 10^6 transformantes/microgramo de ADN circular), la mezcla se incuba 30min en hielo. Posteriormente, se le realiza un choque térmico, colocando la suspensión celular a 42°C 1 min e inmediatamente se pasa a hielo durante 2 min. Seguidamente, se adiciona 800µL de SOC⁸⁸ (LB + 20mM de glucosa) y se incuba 1h a 37°C a 250rpm de agitación (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Por último, se plaquean las células en LB agar/antibiótico, calculando el volumen para obtener de a 10 a 100 colonias por placa⁷⁴. Se obtiene una eficiencia de transformación aproximada de 4×10^5 CFU/µg.

G) PCR de Colonia

G1) La colonia crecida en el LB-agar/antibiótico, se expande con el ansa en otra placa de LB-agar/antibiótico, seguidamente el ansa se sumerge en un tubo de centrifuga de 1mL con 10µL de agua libre de nucleasas, se calienta a 100°C durante 10min. Posteriormente, el tubo se centrifuga a 6000g 0.5min. Para la reacción de PCR (Mastercycle gradient, Eppendorf) se utiliza 1µL de esta suspensión cada 9µL de mezcla de PCR⁷⁴.

G2) *Mezcla de reacción de PCR:*

ADN- 1-100ng

dNTPs- 0.2mM de cada uno

Taq (Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase) (Thermo, USA)- 2.5unidades

Cebador Sentido- 0.25µM

Cebador antisentido- 0.25µM

Tampón 10X (200mM Tris-HCl pH8.3; 200mMKCl; 50mM (NH₄)₂SO₄) - 1X

MgCl₂- 2mM

Agua libre de nucleasas- 10-25-50 µL c.s.p.

Reacción:

95°C---5min

95°C---0.5min

T_m (según el par de cebadores)---0.5min } 30ciclos

72°C---1min/Kb

72°C---10min

H) Análisis de muestras de proteínas por electroforesis

Para el análisis de las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética, se trabaja con geles de poliacrilamida-bisacrilamida entre 8 a 15% según corresponde, se corren a 25mA voltaje máximo (Electroforesis Power Supply EPS 301, Amersham). Las proteínas se visualizan tiñendo el gel con Commassie R-250 (Sigma, USA)⁷⁸.

I) Medida de concentración de ADN y ARN

La concentración de ácidos nucleicos se determina midiendo la DO de la muestra a 260nm⁷⁴. La interferencia de contaminantes se calcula con el cociente DO260nm/DO280nm. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1.7 y 1.9.

J) Western Blot

Se corren 10µg de muestra por pocillo en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida entre 8 a 15% según corresponde, a 25mA voltaje máximo (Electroforesis Power Supply EPS 301, Amersham). Terminada la corrida, las proteínas del gel se transfieren a una membrana Hybond-C Extra, Nitrocellulose (Amersham, USA) en una cuba de transferencia semi-húmeda (Semi-Phor TE70, Hoefer Scientific Instruments, USA) a 100v durante 45min. La membrana se bloquea con PBS-T 20 1% 1h a 37°C, luego se realizan 3 lavados de 5min con PBS-T20 0.05%. Una tira de la membrana se incuba con una dilución 1/100-1/200 del anticuerpo a evaluar en PBS-T 20 0.1%, 1h a 37°C, otra se usa como control del conjugado, incubándola sólo con diluyente. Se lavan como se describe arriba y se incuban con el conjugado:FA en una dilución 1/2000-1/8000. Se revela con el sustrato NBT/BCIP*, la reacción se detiene con agua⁷⁶.

- * 10mL de tampón Carbonato de Sodio pH 9.8 (Na₂CO₃ 0.1M; MgCl₂ 1mM pH9.8)
- 35µl de BCIP 50mg/mL en DMF 100%
- 66µl de NBT 50mg/mL en DMF 70%

K) Dot Blot

Se sensibilizan 3 tiras de membrana Hybond-C Extra, Nitrocellulose (Amersham, USA) con concentraciones decrecientes de proteína o con una concentración a elección, durante 10min. Las mismas se bloquean con PBS-T 20 1% 1h a 37°C, luego se les realizan 3 lavados de 5min con PBS-T20 0.05%. Una de las membranas se incuba con el suero hiperinmune en una dilución 1/200 en PBS-T 20 0.1%, 1h a 37°C, repitiendo lo mismo con el suero preinmune. Paralelamente, la tercer membrana se usa como control del conjugado, incubándola sólo con diluyente. Se lavan como se describe arriba y se incuban con el conjugado:FA en una dilución 1/2000-1/8000. Se revela con el sustrato NBT/BCIP*, la reacción se detiene con agua⁷⁶.

L) ELISA

La placa de ELISA (Nunc, Nalgene) se sensibiliza con 100µl por pocillo de una solución 5µg/ml de proteína, o/n a 4°C. Lo sitios libres en los pocillos se bloquean con PBS-T 20 1% 2h a 37°C, posteriormente se realizan 3 lavados de 5min c/u con PBS-T20 0.05%. Los sueros se incuban en una dilución entre 1/250-1/2000 en PBS-T 20 0.1%, 1h a 37°C (por triplicado). Se lava como se describe arriba y se incuba el conjugado:PO en una dilución 1/5000. Se lava nuevamente y se revela con el sustrato TMB* (PIERCE, USA), 20min. La reacción se frena con H₂SO₄ 2N y se mide a 450nm (Thermo / LabSystems Multiskan EX Microplate Reader).

- *200µl de TMB 6mg/mL en DMSO
- 12.5mL de Tampón Citrato/Fosfato pH5
- 5µl de H₂O₂ 33%

M) Kits

- Isolate Plasmid Mini Kit, Bioline: Extracción de plásmidos.
- Isolate PCR and Gel Kit, Bioline: Extracción de plásmidos, producto de digestión, de PCR a partir de gel de agarosa y eliminación de enzima, cambio de tampón a los productos de PCR.
- Topo TA Cloning, Invitrogen: Clonación de productos de PCR para usos posteriores.
- 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0, Invitrogen: Amplificación de secuencias desconocidas.

N) Servicios contratados

- Secuenciación nucleotídica - Servicio de Macrogen (<http://www.macrogen.com/eng>)
- Identificación de proteínas- Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur de Montevideo (<http://www.pasteur.edu.uy/>).
- HPLC MS/MS- Área de Bioanalítica, Instituto Polo Tecnológico de Pando.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lamdan, H. *et al.* Affinity maturation and fine functional mapping of an antibody fragment against a novel neutralizing epitope on human vascular endothelial growth factor. *Mol Biosyst* **9**, 2097-2106, doi:10.1039/c3mb70136k (2013).
- 2 Gavilondo, J. V. & Larrick, J. W. Antibody engineering at the millennium. *Biotechniques* **29**, 128-132, 134-126, 138 passim (2000).
- 3 Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* **6**, 343-357 (2006).
- 4 Schroff, R. W. & Stevenson, H. C. in *Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer* (eds Kenneth A. Foon & Alton C. Morgan) 121-138 (Springer US, 1985).
- 5 Harrington, L. E., Mangan, P. R. & Weaver, C. T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**, 349-356 (2006).
- 6 Teng, M. W. L. *et al.* IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med* **21**, 719-729, doi:10.1038/nm.3895 (2015).
- 7 Pistoia, V. in *Encyclopedia of Immunobiology* 525-533 (Academic Press, 2016).
- 8 Croxford, A. L., Kulig, P. & Becher, B. IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**, 415-421, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.017> (2014).
- 9 Gottlieb, A. *et al.* Ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, for psoriatic arthritis: randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *The Lancet* **373**, 633-640, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60140-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60140-9).
- 10 Berghman, L. R., Abi-Ghanem, D., Waghela, S. D. & Ricke, S. C. Antibodies: an alternative for antibiotics? *Poult Sci* **84**, 660-666 (2005).
- 11 Slade, H. B. Human Immunoglobulins for intravenous use and hepatitis C viral transmission. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **1**, 613-619 (1994).
- 12 Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- 13 Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **1**, 118-129 (2001).
- 14 Presta, L. G. Engineering antibodies for therapy. *Curr Pharm Biotechnol* **3**, 237-256 (2002).
- 15 Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6851-6855 (1984).
- 16 Neuberger, M. S. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *EMBO J* **2**, 1373-1378 (1983).
- 17 Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A. & Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 6851-6855 (1984).
- 18 Oi, V. T., Morrison, S. L., Herzenberg, L. A. & Berg, P. Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**, 825-829 (1983).
- 19 Wood, C. R. *et al.* The synthesis and in vivo assembly of functional antibodies in yeast. *Nature* **314**, 446-449 (1985).
- 20 Khzaeli, M. B., Conry, R. M. & LoBuglio, A. F. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* **15**, 42-52 (1994).
- 21 Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. & Winter, G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**, 522-525 (1986).
- 22 Verhoeyen, M., Milstein, C. & Winter, G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* **239**, 1534-1536 (1988).
- 23 Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**, 1105-1116 (2005).
- 24 Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* **23**, 1117-1125 (2005).
- 25 Ayala, M. *et al.* Variable region sequence modulates periplasmic export of a single-chain Fv antibody fragment in Escherichia coli. *Biotechniques* **18**, 832, 835-838, 840-832 (1995).

- 26 Gómez-Puerta, J. A. & Gerardo, Q. L. Nuevos medicamentos en el "Pipeline" para las enfermedades autoinmunes: nuevas opciones y nuevos retos. *Revista Colombiana de Reumatología* **21**, 51-56, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0121-8123\(14\)70148-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0121-8123(14)70148-3) (2014).
- 27 Gómez-Puerta, J. A. & Quintana L, G. Nuevos medicamentos en el "Pipeline" para las enfermedades autoinmunes: nuevas opciones y nuevos retos. *Revista Colombiana de Reumatología* **21**, 51-56 (2014).
- 28 Sharkey, R. M. & Goldenberg, D. M. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin* **56**, 226-243 (2006).
- 29 Elvin, J. G., Couston, R. G. & van der Walle, C. F. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* **440**, 83-98, doi:S0378-5173(11)01169-0 [pii]10.1016/j.ijpharm.2011.12.039 (2013).
- 30 Kolar, G. R. & Capra, J. D. in *Fundamental Immunology* Vol. 1 (ed William E. Paul) 47-68 (Lippincott Williams & Wilkins, 2003).
- 31 Kenneth Murphy, P. T., Mark Walport. *Inmunología de Janeway*. Séptima edición edn, (2009).
- 32 Murphy, P. T. y. M. W. in *Inmunobiología de Janeway* 885 (MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE MEXICO, MEXICO, 2009).
- 33 Shields, R. L. *et al.* High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* **276**, 6591-6604 (2001).
- 34 Hinton, P. R. *et al.* Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J Biol Chem* **279**, 6213-6216 (2004).
- 35 ELSEVIER, S. A. Vol. 1 560 (Book, España, 2012).
- 36 Semerano, L., Minichiello, E., Bessis, N. & Boissier, M.-C. Novel Immunotherapeutic Avenues for Rheumatoid Arthritis. *Trends in Molecular Medicine* **22**, 214-229, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.005> (2016).
- 37 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-1132 (2005).
- 38 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141 (2005).
- 39 Damsker, J. M., Hansen, A. M. & Caspi, R. R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* **1183**, 211-221, doi:NYAS5133 [pii]10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x (2010).
- 40 Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**, 821-852 (2007).
- 41 Hunemörder, S. *et al.* TH1 and TH17 cells promote crescent formation in experimental autoimmune glomerulonephritis. *J Pathol* **237**, 62-71, doi:10.1002/path.4559 (2015).
- 42 Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V. K. & Anderson, A. C. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* **31**, 252-256, doi:S0896-8411(08)00050-4 [pii]10.1016/j.jaut.2008.04.017 (2008).
- 43 Zhang, J. *et al.* Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* **94**, 1326-1329, doi:94/9/1326 [pii]10.3324/haematol.2009.007823 (2009).
- 44 Murphy, A. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A. & Mills, K. H. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* **24**, 641-651, doi:S0889-1591(10)00041-3 [pii]10.1016/j.bbi.2010.01.014 (2010).
- 45 Kagami, S., Rizzo, H. L., Lee, J. J., Koguchi, Y. & Blauvelt, A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* **130**, 1373-1383, doi:S0022-202X(15)34836-3 [pii]10.1038/jid.2009.399 (2010).
- 46 Maddur, M. S., Miossec, P., Kaveri, S. V. & Bayry, J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* **181**, 8-18, doi:S0002-9440(12)00336-7 [pii]10.1016/j.ajpath.2012.03.044 [doi] (2012).
- 47 Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234 (2006).
- 48 McKenzie, B. S., Kastelein, R. A. & Cua, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* **27**, 17-23 (2006).
- 49 Beringer, A., Noack, M. & Miossec, P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends in Molecular Medicine* **22**, 230-241, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.001> (2016).

- 50 Iwakura, Y. & Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* **116**, 1218-1222 (2006).
- 51 Veldhoen, M. & Stockinger, B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* **27**, 358-361 (2006).
- 52 Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-748 (2003).
- 53 Murphy, C. A. *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* **198**, 1951-1957 (2003).
- 54 Lee, E. *et al.* Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* **199**, 125-130 (2004).
- 55 Wang, W. *et al.* C57BL/6 mice genetically deficient in IL-12/IL-23 and IFN-gamma are susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis, suggesting a pathogenic role of non-Th1 cells. *J Immunol* **178**, 7072-7080 (2007).
- 56 Joosten, L. A. *et al.* Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 339-347 (2003).
- 57 Fujino, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65-70 (2003).
- 58 Schmidt, C. *et al.* Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **11**, 16-23 (2005).
- 59 Stallmach, A. *et al.* Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* **19**, 308-315 (2004).
- 60 Oppmann, B. *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715-725, doi:S1074-7613(00)00070-4 [pii] (2000).
- 61 Floss, D. M., Schröder, J., Franke, M. & Scheller, J. Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **26**, 569-578, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.005> (2015).
- 62 Piskin, G., Tursen, U., Sylva-Steenland, R. M., Bos, J. D. & Teunissen, M. B. Clinical improvement in chronic plaque-type psoriasis lesions after narrow-band UVB therapy is accompanied by a decrease in the expression of IFN-gamma inducers -- IL-12, IL-18 and IL-23. *Exp Dermatol* **13**, 764-772 (2004).
- 63 Chamian, F. *et al.* Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2075-2080 (2005).
- 64 Ziolkowska, M. *et al.* High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* **164**, 2832-2838 (2000).
- 65 Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K. & Weiner, H. L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* **176**, 7768-7774 (2006).
- 66 Matusevicius, D. *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* **5**, 101-104 (1999).
- 67 Hueber, W. *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* **61**, 1693-1700, doi:gutjnl-2011-301668 [pii]10.1136/gutjnl-2011-301668 [doi] (2012).
- 68 Hepworth, M. R. *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* **498**, 113-117, doi:nature12240 [pii]10.1038/nature12240 [doi] (2013).
- 69 Singh, S. M. *et al.* Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form. *Protein Expression and Purification* **81**, 75-82, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.09.004> (2012).
- 70 Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. Folding proteins. *Protein function: A practical approach* **57** (1997).
- 71 Burgess, R. R. in *Methods in Enzymology* Vol. Volume 273 (ed Adhya Sankar) 145-149 (Academic Press, 1996).
- 72 Fischer, B., Sumner, I. & Goodenough, P. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng* **41**, 3-13, doi:10.1002/bit.260410103 (1993).

- 73 Park, D.-W. *et al.* Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins. *BMB reports* **44**, 279-284 (2011).
- 74 Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012).
- 75 Stockel, J., Doring, K., Malotka, J., Jahning, F. & Dornmair, K. Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimeric class II major histocompatibility complex (MHC) molecules. *Eur J Biochem* **248**, 684-691 (1997).
- 76 Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).
- 77 Cowley, J. V. G. *Anticuerpos monoclonales*. (Elfos Scientiae, 1995).
- 78 Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 79 Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* **16**, 7351-7367 (1988).
- 80 Penayo, P. L. *Clonamiento de la secuencia de DNA codificante de los dominios variables funcionales y quimerización de un anticuerpo anti-Factor de necrosis tumoral humano* MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS thesis, Universidad de Chile, (2006).
- 81 Kratje, R. B. & Wagner, R. Evaluation of production of recombinant human interleukin-2 in fluidized bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* **39**, 233-242, doi:10.1002/bit.260390216 (1992).
- 82 Hermanson, G. T. in *Bioconjugate Techniques (Third edition)* 867-920 (Academic Press, 2013).
- 83 Rojas, G. *et al.* Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside. *J Immunol Methods* **293**, 71-83, doi:S0022-1759(04)00237-6 [pii]10.1016/j.jim.2004.07.002 (2004).
- 84 Mohana Rao, J. K. & Argos, P. A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **869**, 197-214 (1986).
- 85 Browne, C. A., Bennett, H. P. & Solomon, S. The isolation of peptides by high-performance liquid chromatography using predicted elution positions. *Anal Biochem* **124**, 201-208, doi:0003-2697(82)90238-X [pii] (1982).
- 86 Janin, J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* **277**, 491-492 (1979).
- 87 Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L. & Goldberg, M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* **77**, 305-319 (1985).
- 88 Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557-580 (1983).