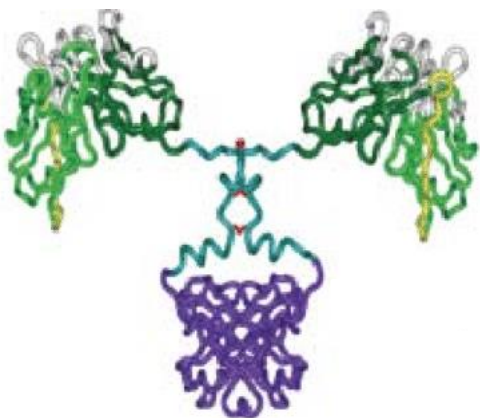


**Tesis Doctoral
Pedeciba Biología**

Diseño, producción y caracterización de un Minibody anti-Tn con aplicaciones en imagenología molecular del cáncer



M.Sc Mariel Flores Lima

Tutor: Dr. Eduardo Osinaga

Co-tutor: Dr. Agustín Correa

Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral

Institut Pasteur de Montevideo

Noviembre 2019

Agradecimientos

Agradecer en primer lugar a mis Tutores, Eduardo Osinaga y Agustín Correa, por su dedicación y apoyo durante todo este camino, por compartir sus conocimientos y por siempre estar con buena disposición para sobrellevar dificultades propias del camino de la investigación.

En segundo lugar, agradecer a todos los integrantes del laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, por su constante apoyo y ayuda tanto en tareas de laboratorio, como en el apoyo motivacional. Todos han hecho el laboratorio un lugar de trabajo ameno y agradable.

También agradecer a los integrantes de la Unidad de proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur, quienes siempre estaban dispuestos a ayudar frente a dificultades técnicas o de laboratorio.

Al grupo del Instituto de Radiología InRad, Hospital das Clínicas, HCFMUSP, por su colaboración en los trabajos *in vivo* y por sus aportes que fueron esenciales para el proyecto.

Por último, agradecer a todas las personas que de una u otra manera transitaron este camino conmigo. Un especial agradecimiento a mis padres, Verónica Lima y Walker Flores, por siempre acompañar mis decisiones profesionales, y por regalarme un futuro. A Johann Schuller, por siempre alentarme a seguir creciendo y avanzando en lo que me gusta, y por siempre tener buena disposición para ayudarme. Y a mis amigas que siempre me acompañan, aunque sea desde la distancia.

Gracias.

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 2 |
| Índice | 3 |
| Resumen | 7 |
| Introducción | 8 |
| Cáncer | 8 |
| Biología Tumoral | 10 |
| La glicobiología y el cáncer | 13 |
| Antígeno Tn | 15 |
| Inmunoterapia | 18 |
| Imagenología molecular | 20 |
| Ingeniería de anticuerpos para imagenología | 24 |
| Anticuerpos monoclonales | 24 |
| Fragmentos de anticuerpos | 26 |
| scFv y Diabodies | 29 |
| Minibodies | 31 |
| Otros agentes imagenológicos | 32 |
| Sistemas de expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes | 33 |
| Expresión en <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| Vector de expresión | 36 |
| Cepas | 37 |
| Proteínas de fusión | 38 |
| Purificación | 38 |
| Expresión en sistemas eucariotas | 39 |
| Células HEK 293 | 39 |
| Células S2 | 40 |
| Antecedentes del tema en nuestro grupo de investigación | 41 |
| Objetivo | 44 |
| Objetivos específicos | 44 |
| Materiales y métodos | 45 |
| Antígeno Tn | 45 |
| Anticuerpo monoclonal Chi-Tn | 45 |
| Líneas celulares | 45 |

| | |
|---|----|
| Secuencia | 45 |
| Clonado del minibody en diferentes vectores de expresión | 46 |
| Sistemas de expresión procariota | 48 |
| Clonado del minibody en vectores pT7 | 48 |
| Selección de colonias | 50 |
| Generación de mutaciones en la secuencia del minibody | 51 |
| Generación del minileucine-zipper | 53 |
| Generación del minibody-cys | 53 |
| Expresión del minibody en <i>E. coli</i> . | 54 |
| Cepa Shuffle pMJS9 | 54 |
| Cepa BL21(DE3) | 54 |
| Cepa Rossetta | 55 |
| Evaluación de la expresión proteica citoplasmática | 55 |
| Evaluación de la expresión proteica periplasmática | 55 |
| Sistemas de expresión eucariota | 56 |
| Clonado del minibody en el vector pCMV-GFP-Fc | 56 |
| Clonado del minibody en el vector pDroext | 56 |
| Expresión del minibody en células HEK293T | 57 |
| Expresión del minibody en células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i> | 58 |
| Generación de una línea celular policlonal estable S2-minibody | 58 |
| Purificación de los minibodies | 59 |
| Purificación mediante cromatografía de afinidad IMAC | 59 |
| Purificación mediante columna de afinidad Proteína A HiTrap | 59 |
| Purificación mediante cromatografía de afinidad StrepTactin ^{XT} Superflow | 60 |
| Caracterización de los Minibodies | 61 |
| Cromatografía de exclusión molecular | 61 |
| Espectrometría de masa | 61 |
| Transferencia y Western Blot | 61 |
| Estudios de funcionalidad <i>in vitro</i> | 62 |
| Ensayo de SPR | 62 |
| Test de ELISA | 63 |
| Inmunofluorescencia indirecta (IF-I) | 63 |
| Ensayo de Citometría de flujo | 64 |
| Ensayo de inmuno-histoquímica | 64 |

| | |
|---|-----|
| Estudios de funcionalidad <i>in vivo</i> | 65 |
| Animales | 65 |
| Bio-conjugación del Chi-Tn y Minibody DFO-Bn-NCS y ⁸⁹ Zr radio-marcado | 65 |
| Captación tumoral en imagenología <i>in vivo</i> de ratones <i>nude</i> | 66 |
| Biodistribución <i>ex vivo</i> en ratones <i>nude</i> | 66 |
| Auto-radiografía | 67 |
| Resultados | 68 |
| Expresión de los minibodies | 68 |
| Sistemas de expresión procariotas | 69 |
| Expresión del Minibody | 69 |
| Expresión citoplasmática | 70 |
| Expresión periplasmática | 73 |
| Expresión del Minileucine-zipper | 75 |
| Expresión citoplasmática | 76 |
| Expresión periplasmática | 77 |
| Expresión del Minibody-cys | 78 |
| Minibodies en <i>E. coli</i> | 81 |
| Sistemas de expresión eucariotas | 83 |
| Expresión del Minibody-Tn | 83 |
| Células HEK 293T | 83 |
| Expresión del minibody en células S2 de <i>Drosophila</i> | 85 |
| Purificación del Minibody expresado en células S2 | 89 |
| Caracterización funcional de los minibodies | 91 |
| Test de ELISA | 91 |
| Ensayo de SPR | 92 |
| Inmunofluorescencia Indirecta | 94 |
| Ensayo de Citometría de flujo | 97 |
| Inmunohistoquímica | 100 |
| Funcionalidad <i>in vivo</i> | 102 |
| Captación tumoral <i>in vivo</i> de ⁸⁹ Zr-DFO-Chi-Tn y ⁸⁹ Zr-DFO-minibody | 102 |
| Biodistribución <i>ex vivo</i> de ⁸⁹ Zr-DFO-Chi-Tn y ⁸⁹ Zr-DFO-minibody | 104 |
| Imágenes de auto-radiografía | 105 |
| Discusión | 107 |
| Diseño de un fragmento de anticuerpo | 107 |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Caracterización funcional <i>in vitro</i> | 116 |
| Caracterización funcional <i>in vivo</i> | 119 |
| Conclusiones finales | 122 |
| Bibliografía | 123 |
| Anexos | ¡Error! Marcador no definido. |
| Anexo 1 | ¡Error! Marcador no definido. |
| Anexo 2 | ¡Error! Marcador no definido. |

Resumen

El antígeno Tn es una forma alterada de la glicosilación en proteínas de superficie celular. Dicho antígeno se encuentra en diversos carcinomas humanos y raramente en el tejido normal, y se correlaciona con un mayor grado de invasividad y agresividad. Una forma de monitorear la eficacia de los tratamientos oncológicos, es a través de imagenología molecular utilizando anticuerpos o fragmentos de los mismos, ya que son moléculas capaces de reconocer específicamente antígenos. Los fragmentos de anticuerpos representan una herramienta interesante ya que los mismos retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo parental y llegan a tiempos de circulación en sangre menores al anticuerpo entero, y no presentan actividad inmunogénica. En este trabajo, se diseñó un minibody anti-Tn, y se evaluó su actividad *in vitro* e *in vivo* para su aplicación en imagenología molecular (Inmuno-PET) para cáncer de pulmón.

El diseño molecular del minibody-Tn parte de la secuencia del anticuerpo entero Chi-Tn, generado previamente por nuestro grupo de investigación. Se evaluaron sistemas de expresión procariota y eucariota, donde la molécula fue expresada de manera soluble, dimérica y funcional en las células S2 de *Drosophila melanogaster*. Las evaluaciones funcionales *in vitro* fueron a través de ensayos de ELISA y resonancia plasmónica de superficie contra una mucina rica en antígeno Tn, y en sistemas celulares con células Tn+ y Tn-. Para analizar su aplicabilidad en imagenología molecular del cáncer, se realizaron ensayos *in vivo*, en ratones *nude* con tumores generados a partir de una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549). Tanto el minibody-Tn como el Chi-Tn fueron radio-marcados con el radio-isótopo ⁸⁹Zr como sonda molecular para PET. Se obtuvieron imágenes a distintos tiempos y se analizó la bio-distribución de la molécula, siempre comparando con el anticuerpo entero Chi-Tn. Los resultados mostraron que el minibody-Tn reconoce específicamente al antígeno y de manera comparable con el anticuerpo entero.

En este proyecto se seleccionó el sistema de expresión más eficiente, se llevó a cabo la evaluación funcional, donde el minibody-Tn mostró tener actividad específica contra el antígeno Tn, tanto en contextos celulares, tisulares, como también directamente en el antígeno purificado. En este trabajo, se obtuvo de forma exitosa un fragmento de anticuerpo minibody anti-Tn, funcional como una herramienta con aplicaciones tanto en imagenología molecular del cáncer, así como con fines de investigación.

Introducción

Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que el cáncer provoca más de 8.9 millones de muertes, y 17.2 millones de nuevos diagnósticos cada año. El cáncer es una enfermedad que afecta casi todos los tipos de tejidos del organismo y es causado por una variedad de factores (Souho, Lamboni, Xiao, & Yang, 2018). En el año 2015, el cáncer era la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años de edad en 91 de los 172 países del mundo (fig. 1). Los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial son: cáncer de pulmón, de mama y colorrectal, y los mismo explican 1/3 de la incidencia y mortalidad a nivel mundial. La variación de tipos de cáncer en las distintas regiones se debe a que la economía, sociedad y estilo de vida tienen un impacto diferencial en la enfermedad. Se estima que entre 1/3 a 2/5 de los casos podrían ser prevenidos por la eliminación o reducción de la exposición de factores de riesgo y estilo de vida (Bray, Ferlay, & Soerjomataram, 2018).

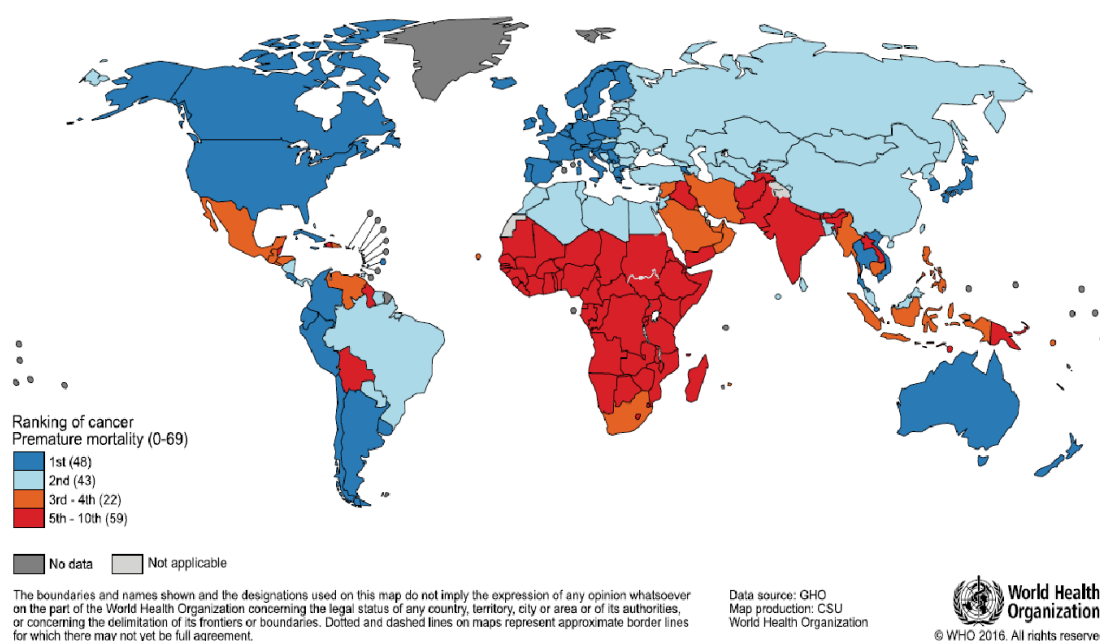


Figura 1. Mapa mundial con representación de la mortalidad por cáncer en cada país. Figura adaptada de GLOBOCAN, 2018.

En particular en Uruguay, se diagnostican 14.600 nuevos casos de cáncer por año, y se mueren 8.600 pacientes por dicha enfermedad cada año. El cáncer representa en nuestro país la segunda causa de muerte (Registro Nacional de Cáncer, 2018) (fig. 2).

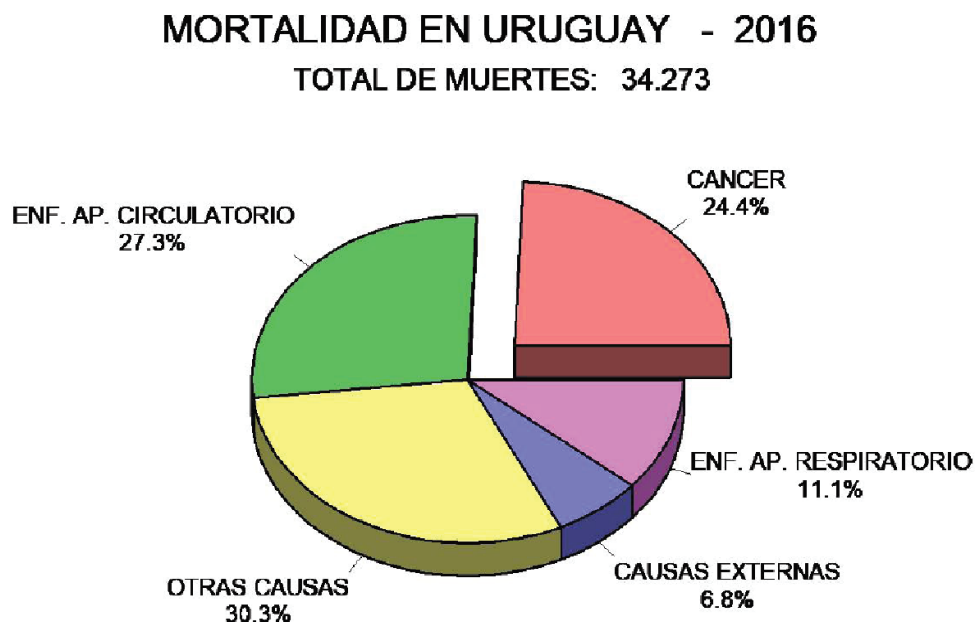
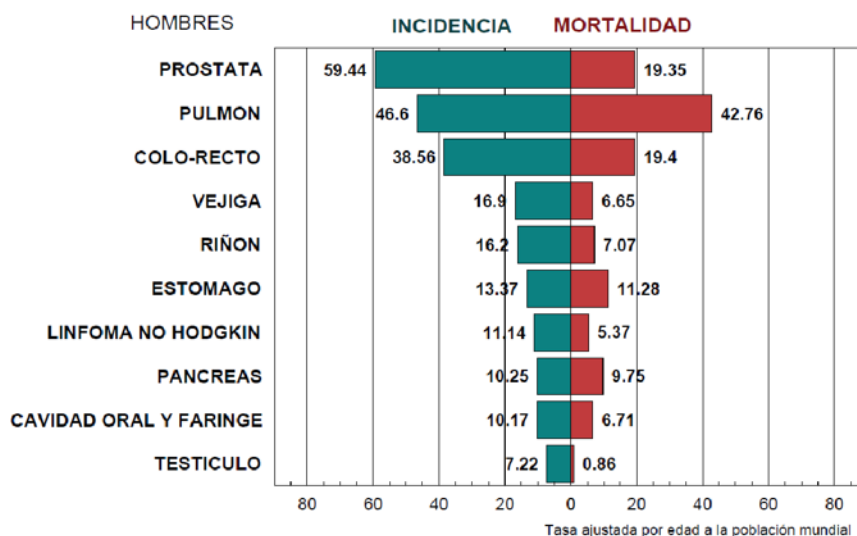


Figura 2. Gráfica con los porcentajes de las causas de muerte más frecuentes en Uruguay. Figura tomada de Registro Nacional de Cáncer, 2018.

En hombres, el cáncer de próstata es el que tiene mayor porcentaje de incidencia, aunque el cáncer de pulmón es el que representa la mayor mortalidad. En mujeres, el cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortalidad (fig. 3) (Registro Nacional del Cáncer, 2018).

CANCER EN URUGUAY 2010-2014
PRINCIPALES SITIOS (ordenados por Incidencia)



CANCER EN URUGUAY 2010-2014
PRINCIPALES SITIOS (ordenados por Incidencia)

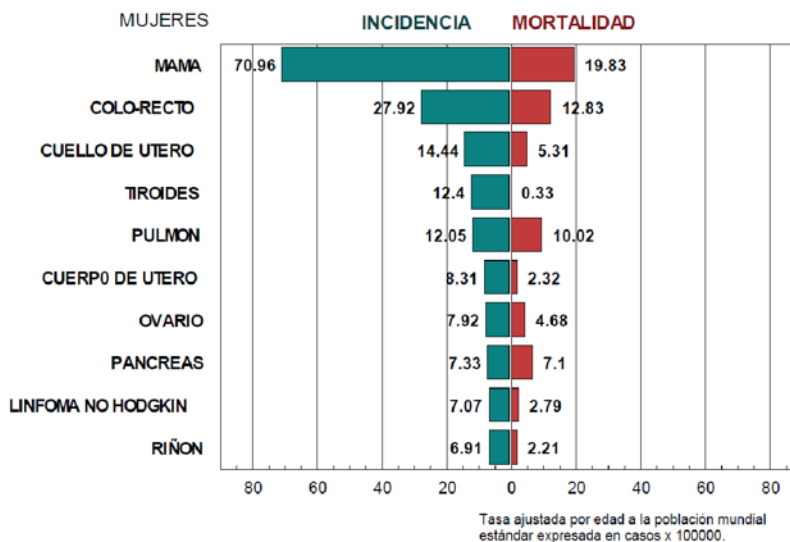


Figura 3. Gráficas con los porcentajes de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer dividido por género en Uruguay. Figura tomada de Registro Nacional de Cáncer, 2018.

Biología Tumoral

Los tejidos normales controlan la producción y liberación de señales de crecimiento celular que dirigen las etapas del ciclo celular, asegurando así un correcto número celular y arquitectura del tejido. Las células tumorales tienen desreguladas dichas señales, adquiriendo la capacidad de sostener las señales de proliferación de formas alternativas (Hanahan & Weinberg, 2011).

El cáncer se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas y la pérdida de la regulación de procesos celulares. Estos eventos conllevan a la expresión de neo-antígenos, antígenos diferenciados, lo que puede llevar a la presentación de péptidos unidos al complejo de histocompatibilidad mayor de clase I (MHC-I) en la superficie de células tumorales. Los complejos de MHC-I-péptido pueden ser reconocidos por las células T CD8+, aunque en general las respuestas generadas no provocan una protección inmune (Chen& Mellman, 2013).

Hanahan y Weinberg definen los “hallmarks” del cáncer como capacidades funcionales adquiridas que permiten a las células tumorales sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas capacidades son adquiridas en diferentes tipos de tumores y a través de diferentes mecanismos y en distintos momentos del proceso de tumorigénesis (fig. 4). Para que se den dichas capacidades, se necesitan dos características principales previas: la inestabilidad genómica que genera mutaciones aleatorias y re-arreglos cromosómicos; y el estado inflamatorio de las lesiones pre-malignas y malignas promovida por células del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011).

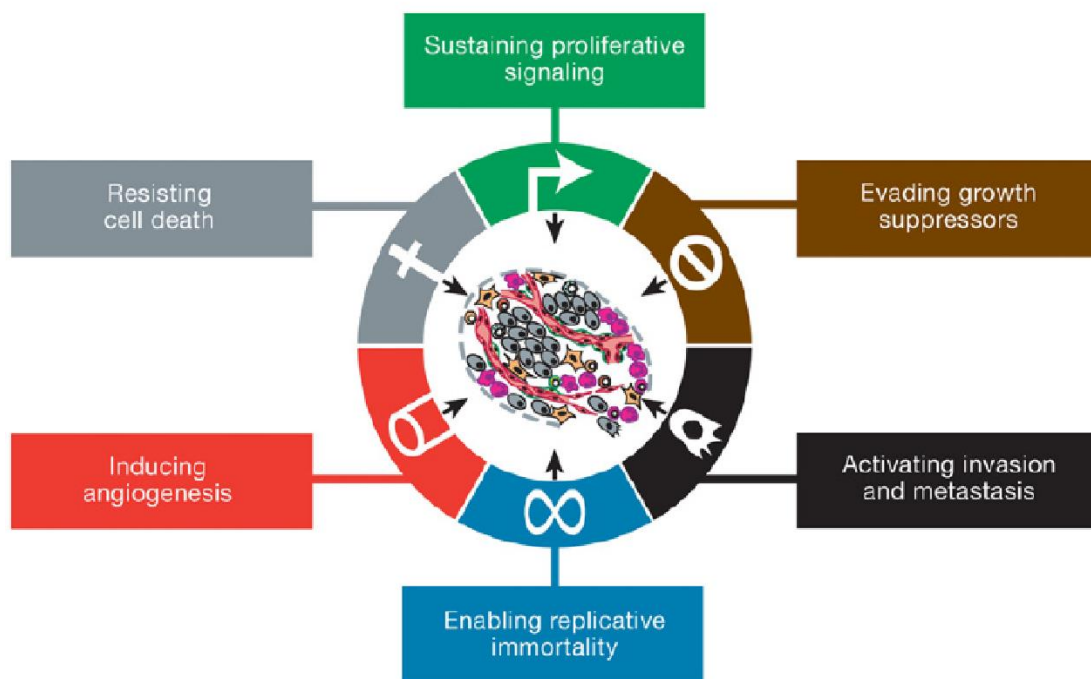


Figura 4. Esquema representativo de los seis “hallmarks” del cáncer. Figura tomada de Hanahan&Weinberg, 2011.

La expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión está alterada en algunos carcinomas con alta agresividad, favoreciendo la invasión y metástasis. Las mismas son un proceso de varias etapas que involucra: pérdida de la arquitectura del tejido y morfología celular, expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular, aumento de la motilidad y de la resistencia a la apoptosis. Además, la capacidad de invasión se ve favorecida por la interacción entre las células tumorales y las células del estroma neoplásico (Hanahan & Weinberg, 2011).

La biología tumoral depende tanto de los tipos celulares malignos como del microambiente tumoral que se construye durante el proceso de tumorigénesis (fig. 5). Las células infiltradas del sistema inmune también son parte del tumor, las cuales pueden iniciar y sostener la angiogénesis, así como estimular la proliferación, invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

Considerando que los tumores se originan de una célula transformada debido a la inestabilidad genética, los mismos son heterogéneos genéticamente, exhibiendo múltiples fenotipos tanto morfológicamente como fisiológicamente. Esta heterogeneidad también se observa en la expresión de las moléculas de la superficie celular. Así, las células del tumor expresan una serie de antígenos, tumor-específicos o tumor-asociados y sitios de unión a lectinas. La heterogeneidad de los tumores tiene una implicancia en la eficacia del diagnóstico, tratamiento e identificación de moléculas blanco (Vinay et al., 2015).

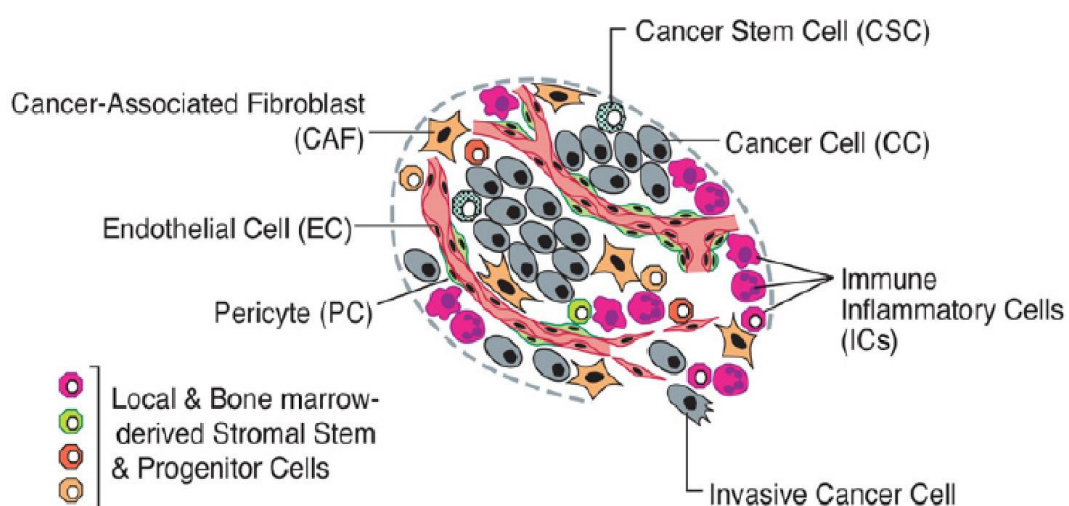


Figura 5. Esquema representativo de los componentes de un tumor. Figura tomada de Hanahan & Weinberg, 2011.

La glicobiología y el cáncer

Los glicanos son componentes básicos de las células y constituyen una cantidad significativa de la masa y variación de los sistemas biológicos. En general, están unidos a proteínas o lípidos, formando así el glicoma, el cual se estima que está formado por cientos o hasta miles de estructuras de glicanos (Ohtsubo & Marth, 2006).

La glicosilación es una modificación postraduccional la cual consiste en la adición enzimática de uno o más azúcares en la superficie proteica (Munkley & Elliott, 2016). En general, la glicosilación se da en el aparato de Golgi, aunque la iniciación de algunos tipos de glicosilación (por ejemplo, la *N*-glicosilación) se da en el retículo endoplásmico. Al menos 9 de los 20 aminoácidos pueden ser modificados por una variedad de carbohidratos (Stowell, Ju, & Cummings, 2015).

Los glicanos participan en numerosos procesos moleculares incluyendo, conformación proteica, adhesión celular, tráfico molecular, modulación de la actividad de receptores, entre otros. Juegan un rol esencial en funciones fundamentales de organismos multicelulares, incluyendo funciones en el sistema inmune, en particular con respecto al mantenimiento de la barrera de mucosas y comportamiento de células del sistema inmune.

Con respecto a las proteínas, los glicanos participan en tres grandes funciones de las mismas: 1- representan una parte integral de la proteína ayudando el correcto plegamiento y estructura tridimensional; 2-modulación de la funcionalidad; 3- formación de sitios de unión independientes reconocidos por las lectinas de manera glicano-específica (Lauc, Pezer, Rudan, & Campbell, 2016).

La glicosilación abarca *N*-glicanos, *O*-glicanos y glicosaminoglicanos. Los *N*-glicanos se unen a residuos de Asparagina, en motivos Asn-X-Ser/Thr, mientras que los *O*-glicanos se unen a subgrupos de Serinas y Treoninas. Los glicosaminoglicanos también se unen a residuos de Serinas y Treoninas, aunque son lineales y generalmente muy sulfatados (Ohtsubo & Marth, 2006).

Los tipos de glicosilación asociadas a la transformación celular son la *O*-glicosilación y la *N*-glicosilación afectadas por la expresión, localización o actividad de las glicosil-transferasas. La variación estructural en los glicanos de la superficie proteica produce numerosos bio-marcadores, los cuales algunos se correlacionan con diferenciación celular, activación celular y enfermedades (Ohtsubo & Marth, 2006).

La O-glicosilación es la principal modificación pos-traduccional que ocurre en las mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular), la cual es iniciada por la adición de un azúcar *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) a una Serina o Treonina. Esto se da a través de la super familia de enzimas GalNAc-Ts. La cadena carbohidrata luego es elongada por la acción de glicosil-transferasas específicas que van agregando monosacáridos y formando así a estructuras “core” o núcleo (fig. 6) (Chugh et al., 2015).

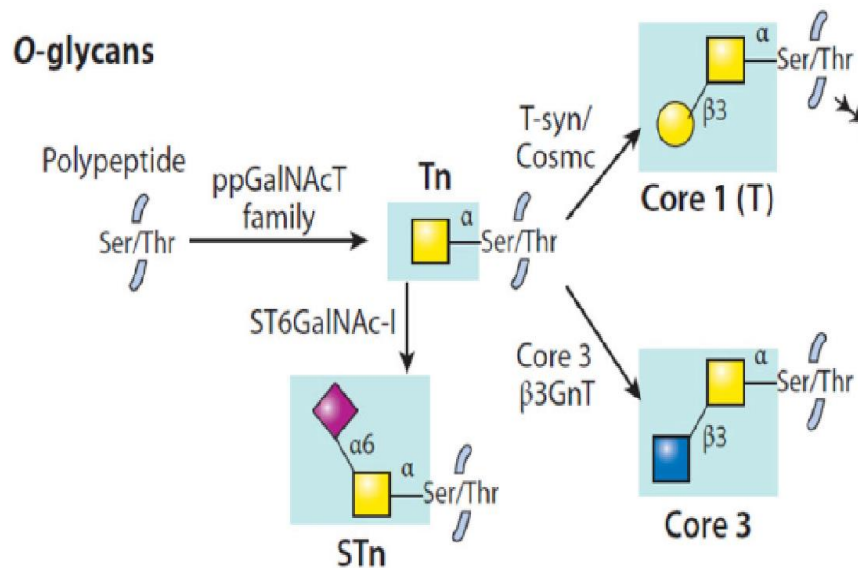


Figura 6. Esquema representativo de la O-glicosilación. Figura tomada de Stowell et al., 2015.

Las mucinas tienen como características, una alta masa molecular, una composición bioquímica compleja, y una tendencia a formar estructuras altamente ordenadas mediante polimerización. Existen dos tipos principales de mucinas, las secretadas y las asociadas a superficies (fig. 7). Las mismas tienen un rol central en mantener la homeostasis y promover la supervivencia celular en presencia de condiciones variables. Su estructura general y composición bioquímica le brinda protección a la superficie celular y hasta regulación del microambiente cercano. Las mucinas están implicadas en la patogénesis del cáncer, principalmente en adenocarcinomas (Hollingsworth & Swanson, 2004).

Estudios de inmuno-histoquímica han detectado varios antígenos asociados a tumor (AAT). En la clínica se utilizan varios anticuerpos que reconocen los AAT como herramientas de diagnóstico para diferentes tipos de cáncer (detección en suero). Tales son los casos del anticuerpo monoclonal (mAb) CA19-9 para adenocarcinomas de páncreas y colorrectal, el mAb OC125 que reconoce el antígeno CA125 en carcinomas

de ovario, y el mAb B72.3 para diferentes tipos de adenocarcinomas (Hollingsworth & Swanson, 2004).

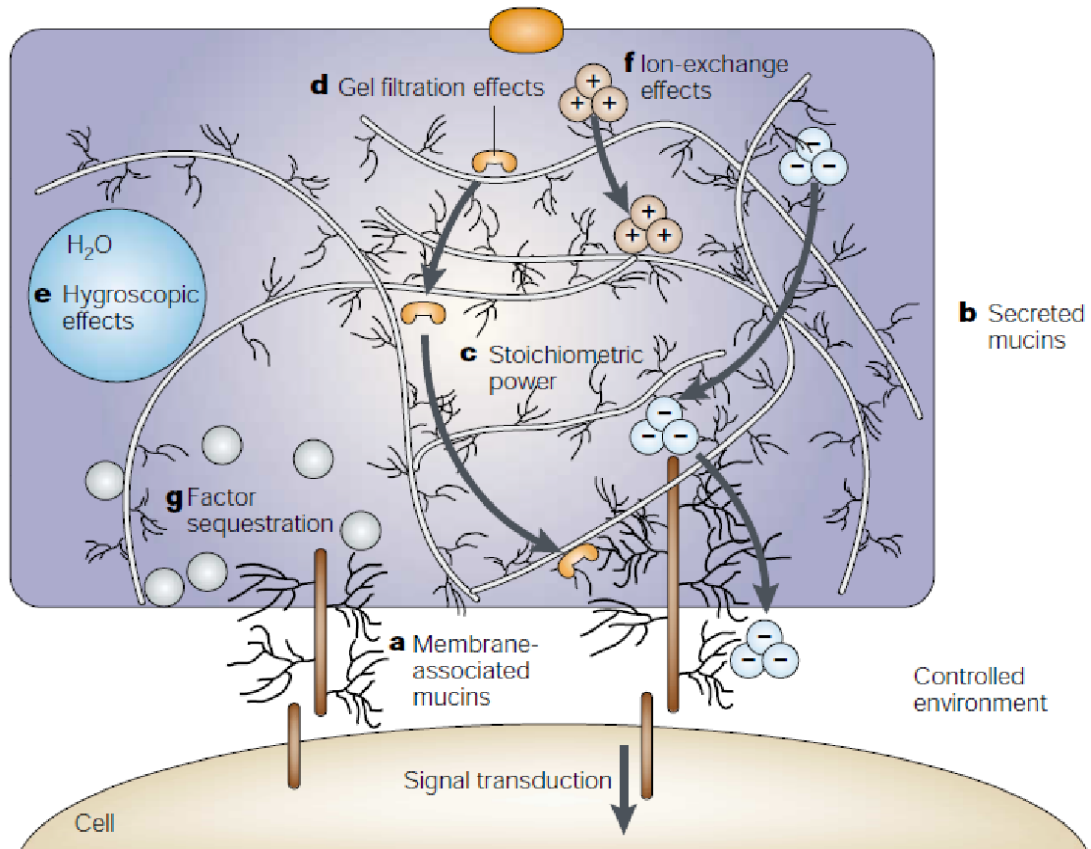


Figura 7. Esquema representativo de los diferentes tipos de mucinas (secretadas y de membrana) y sus funciones celulares. Figura tomada de Hollingsworth & Swanson, 2004.

Existen otras glicoproteínas que se asocian a tumores y se utilizan como bio-marcadores utilizando mAbs, como son el antígeno carcino-embriónico (CEA) en tejido intestinal, el antígeno específico de próstata (PSA), y la α -fetoproteína en hepatocarcinoma, HER2 en tejido mamario. Sin embargo, muchos de ellos son detectados con sensibilidades y especificidades bajas, generando falsos negativos o hasta falsos positivos en el caso de antígenos que se expresan en otros procesos biológicos (Stowell et al., 2015).

Antígeno Tn

El antígeno Tn fue descrito por primera vez en el año 1957 por Moreau et al., quienes observaron un antígeno inusual en los eritrocitos de pacientes con una rara anemia hemolítica asociada con la poli-aglutinación de los eritrocitos en frío e independiente del

grupo sanguíneo ABO(H). Luego se demostró que el antígeno Tn es una forma truncada de la O-glicosilación con una estructura simple GalNac α 1-O-Ser/Thr (fig. 8) (Ju, Otto, & Cummings, 2011).

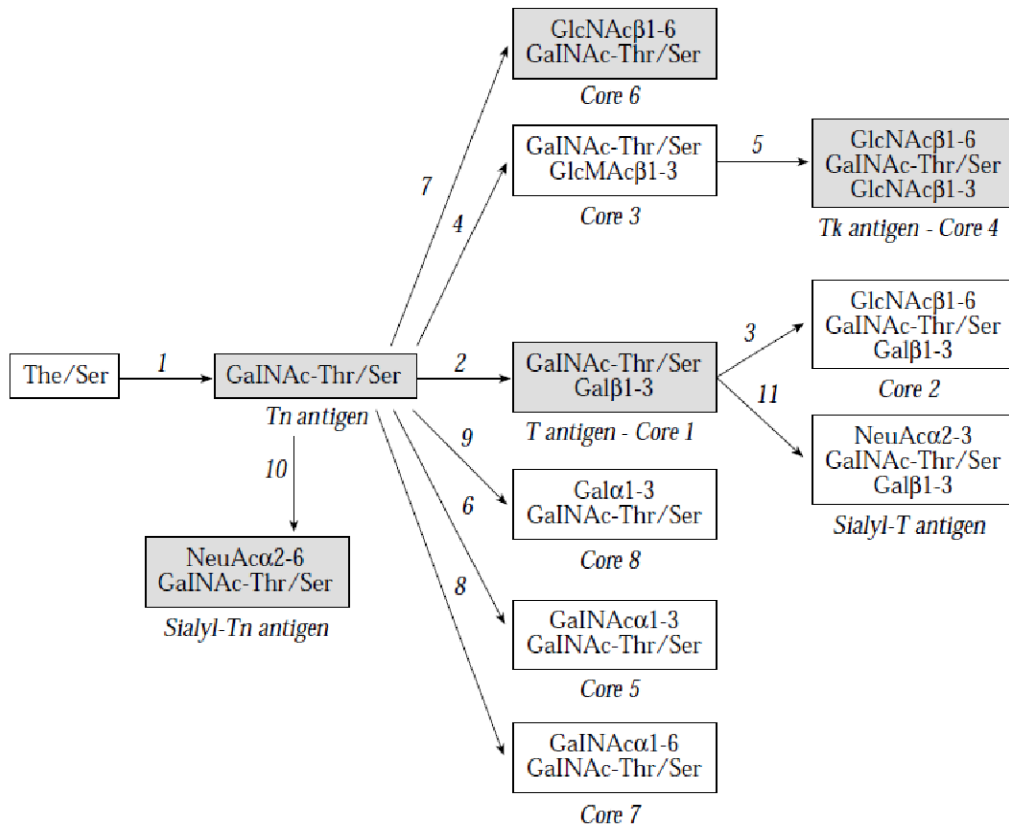


Figura 8. Esquema representativo de las diferentes etapas de la O-glicosilación. El primer paso es la adición de GalNac a un residuo de Serina o Treonina en una cadena peptídica, formándose así el antígeno Tn. Figura adaptada de Freire & Osinaga, 2003.

Los principales mecanismos de expresión del antígeno Tn son resultados de cambios genéticos que llevan a, o bien la disminución de la expresión o alteración de la funcionalidad de *Cosmc*, y/o de la T-sintasa. *Cosmc* es una chaperona específica que se requiere para la actividad de la enzima Core 1 β 3 galactosil-transferasa (T-sintasa). Durante la biosíntesis de la T-sintasa en el retículo endoplásmico, *Cosmc* se une a la misma para prevenir su agregación y degradación (Ju et al., 2011).

La unión α -terminal GalNac en células tumorales humanas fue descrita en 1969 basada en la observación de que las células se unían a la lectina *Helix pomatia* (HPA). En el trabajo de Springer et al. (Springer, 1984), reportaron la presencia del antígeno Tn en altos niveles en aproximadamente el 90% de los carcinomas de mama. Sucesivos

estudios demostraron que el 70-90% de los carcinomas de colon, pulmón, vejiga, ovario, estómago y próstata expresan el antígeno Tn. A su vez, se observa baja expresión de dicho antígeno en los tejidos normales (Ju et al., 2011).

Para la detección del antígeno Tn se han utilizado tres estrategias: 1) química, mediante β eliminación, 2) utilizando lectinas, y 3) mediante anticuerpos anti-Tn. La estrategia química es difícil de llevar adelante cuando se cuenta con pequeñas cantidades del antígeno en células o tejido. Con respecto a las lectinas, existen numerosas, tanto de plantas como de animales, que se unen a la estructura GalNac, aunque se observa con frecuencia reactividad cruzada con otros residuos GalNac α -, β - unidos, por lo que esta forma de detección debe realizarse con cautela.

Uno de los primeros abordajes inmunológicos para la detección del antígeno Tn fue basado en anti-suero anti-Tn generado naturalmente. En 1985 se generó el primer mAb murino anti-Tn por el grupo de investigación de Springer et al. El grupo de investigación de Hakomori también desarrolló un mAb murino anti-Tn inmunizando ratones con la línea celular Lu65 de carcinoma de pulmón. Sin embargo, los distintos mAb tienen problemas con la especificidad ya que existe reactividad cruzada con otros residuos GalNac de glicanos (como el antígeno A del grupo sanguíneo) (Ju et al., 2011).

Las primeras evidencias de estructuras de carbohidratos alteradas en mucinas fueron en estudios que demostraban un aumento en la expresión del antígeno Thomsen-Friedenreich (T/TF) en mucinas de superficie de adenocarcinoma de colon en comparación con el colon normal. Las estructuras de glicanos alteradas durante la progresión del cáncer tienen un rol en la adhesión, motilidad, invasión, y en la interacción de las células tumorales con otras células como los linfocitos y células endoteliales (Chugh et al., 2015).

Durante el proceso de carcinogénesis surgen estructuras neo-glicanas en glicoproteínas incluyendo mucinas. Esas formas alteradas se deben a glicosilaciones incompletas generando estructuras truncadas (Tn, Sialil-Tn, T, Sialil-T) o extensiones aberrantes de las cadenas de glicanos. La expresión de los antígenos de carbohidratos truncados se observa en tejidos embrionarios, por lo que son también conocidos como antígenos oncofetales (Chugh et al., 2015; Fu et al., 2016).

El proceso de biosíntesis de glicanos involucra a cientos de genes por lo que este proceso es sensible a alteraciones en la fisiología celular. Muchas alteraciones genéticas que están asociadas con la transformación y malignidad vienen acompañadas con cambios en la glicosilación proteica. Los glicanos juegan un rol en la proliferación,

invasión, angiogénesis y metástasis tumoral. Por ejemplo, se identificó que una variante genética de la α -2,6-sialiltransferasa es un gen clave para la metástasis de cerebro en cáncer de mama (Lauc et al., 2016).

En carcinomas de mama y pulmón humanos, la presencia del antígeno Tn puede ser hasta 10 veces más elevada que en el tejido normal. Además, una alta cantidad del antígeno Tn se correlaciona con un mayor grado de invasividad (Bard & Chia, 2016).

Las vacunas basadas en péptidos de mucinas podrían ofrecer una ventaja adicional ya que limitaría efectos adversos sobre los tejidos normales identificando patrones de glicosilación específicos del cáncer. Estas estructuras, si bien son reconocidas por el sistema inmune, tienen una baja inmunogenicidad. Un ejemplo es la vacuna sTn-KLH usada en ensayos clínicos fase III en pacientes con cáncer de mama metastásico, que tuvo una respuesta humoral e inmunogénica. Otro ejemplo es una vacuna multivalente que contiene el antígeno Tn polimerizado a nanopartículas de oro demostrando respuesta inmunogénica en ensayos in vivo en conejos (Chugh et al., 2015).

Inmunoterapia

La inmunoterapia surge en el año 1908 cuando Paul Erlich hipotetizó que el sistema inmune contaba con un rol crucial en la “vigilancia” de células transformadas en las primeras etapas de la tumorigénesis, eliminándolas antes de que sean clínicamente detectables. Este tipo de terapia se divide en dos grupos: inmunoterapia pasiva y activa.

La activa implica la estimulación del sistema inmune del paciente para generar una respuesta endógena anti-células tumorales. La inmunoterapia pasiva inicia la respuesta inmunológica a través de componentes producidos externamente (anticuerpos, citoquinas, etc.) que son inyectados al paciente. En general, en estos casos no se genera memoria inmunológica (Rusch, Bayry, Werner, Shevchenko, & Bazhin, 2018).

Mediante la inmunoterapia activa se puede: a) aumentar la captación del antígeno, su procesamiento y presentación a las células T, como por ejemplo una vacuna con antígeno/adyuvante y células dendríticas; b) aumentar la activación y expansión de células T “naive”, como son las vacunas con mAb CTLA4 y células dendríticas; c) aumentar la fase efectora de la respuesta inmunológica, como por ejemplo son las terapias celulares con células T del tumor estimuladas y expandidas ex vivo e inyectadas al mismo paciente (Sanmamed & Chen, 2018).

La inmunoterapia pasiva incluye las terapias con mAb así como sus derivados (fragmentos de anticuerpos, mAb conjugados a drogas) y las células T generadas por ingeniería genética (CAR-T). Algunos ejemplos relevantes son: el mAb Her2/neu para cáncer de mama, el mAb anti-EGFR cáncer colorrectal y de cabeza y cuello, y el mAb anti-CD20 para linfoma B, entre otros (Sanmamed & Chen, 2018).

La quimioterapia, radioterapia y cirugía son los procedimientos estándares para los tratamientos del cáncer. Algunas desventajas de las mismas es que pueden causar una supresión transitoria del sistema inmune, lo cual genera un aumento en el riesgo de infecciones en los pacientes además de disminuir la habilidad del sistema inmune de inhibir el desarrollo del cáncer (Vinay et al., 2015).

Entender la inmunobiología del cáncer puede permitir definir estrategias que logren explotar mejor las respuestas inmunológicas contra el cáncer y así lograr respuestas durables en el tiempo y/o erradicar el tumor. Algunos datos de ensayos clínicos sugieren que las inmunoterapias logran una actividad durable que pocas terapias anti-cáncer pueden aproximarse. La respuesta inmunológica puede ser rápida, durable y adaptable. Dichas características podrían evitar resistencias secundarias a las terapias (Chen & Mellman, 2013).

En los últimos años se han aprobado algunas inmunoterapias, incluyendo vacunas preventivas y terapéuticas (fig. 9) (Emens et al., 2017). La inmunoterapia se refiere a la activación del sistema inmune generando una respuesta inmunológica anti-tumoral mediante la inducción del reconocimiento y eliminación de las células tumorales y el microambiente tumoral (Rusch et al., 2018).

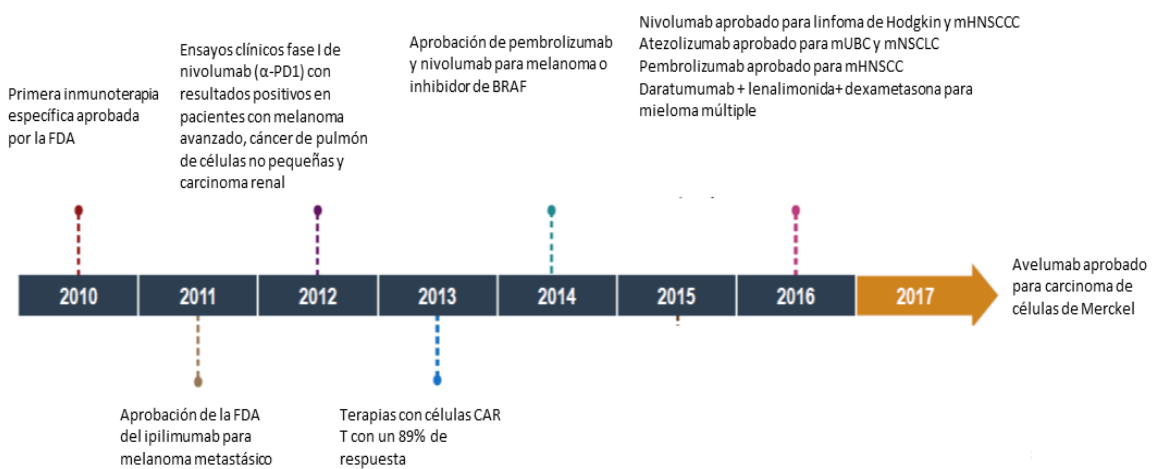


Figura 9. Línea de tiempo con las aprobaciones relevantes para la inmunoterapia del cáncer en Estados Unidos desde el año 2010. Figura tomada y adaptada de Emens et. al, 2017.

Las vacunas anti-cáncer estimulan o re-establecen el sistema inmune contra las células tumorales. Las mismas son utilizadas tanto de forma preventiva como terapéutica. Un ejemplo claro de una vacuna preventiva exitosa es la vacuna contra el virus del papiloma y hepatitis B, que evitan infecciones de patógenos carcinogénicos. Las vacunas terapéuticas buscan enlentecer el crecimiento tumoral o disminuir el volumen tumoral mediante la estimulación de una respuesta inmune específica. Para eso, los antígenos emulsionados en el adyuvante son inyectados subcutáneamente, lo que provoca la activación de las células T y generación de células T efectoras, con una posterior memoria inmunológica (Rusch et al., 2018).

La eficacia de la inmunoterapia está limitada a un pequeño grupo de pacientes que responden con resultados favorables. Algunos de los factores que influyen la inmunidad del cáncer son: el historial genético del paciente, la evolución mutacional del tumor, y variables del ambiente que afecten la homeostasis inmunológica (Emens et al., 2017). Además, existen efectos adversos relacionados a la inmunidad que se da en el 65-70% de los pacientes que reciben inmunoterapias que tienen como blanco moléculas de *checkpoint*. Algunas estrategias que se vienen estudiando son, por ejemplo, mejorar el sistema de entrega de las drogas inmunoterapéuticas, como pueden ser la administración local combinada con una administración sistémica, nanocarriers/nanopartículas (Rusch et al., 2018).

Algunas estrategias que se buscan para mejorar la eficacia de esta terapia tratan de encontrar moléculas blanco específicas del cáncer, así como desarrollar modelos pre-clínicos más "humanizados" para una mejor traslación de las terapias. Sumado a esto, nuevas tecnologías de imagenología funcional y caracterización histopatológica tridimensional sumarían a la efectividad de las inmunoterapias (Emens et al., 2017).

Imagenología molecular

Las modalidades de imagenología para el diagnóstico en cáncer utilizadas son: tomografía computada (CT), imagenología de resonancia magnética (MRI), y ultrasonido (US). Todas ellas brindan información sobre el volumen tumoral y valores morfológicos. Sin embargo, tienen una falta de precisión, guía terapéutica específica e información pronóstica. La imagenología tumoral supera dichas limitaciones ya que mide otros atributos del tumor como son aspectos metabólicos, proliferación y expresión de receptores de superficie. La imagenología tumoral incluye la imagenología óptica,

tomografía de emisión de positrones (PET), y la tomografía computada de emisión monofotónica (SPECT) (Y.-M. Li, Yang, & Li, 2017; Sheikhabaei et al., 2017).

Las formas tradicionales de monitorear los tratamientos oncológicos a través de imagenología se basaban en cambios anatómicos en referencia a los cambios de tamaño comparando antes y después de tratamiento, utilizando métodos imagenológicos como el CT y MRI. Los avances en la biología molecular, terapias dirigidas e imagenología tumoral permitieron mejorar los diagnósticos tempranos y la sobrevivencia de los pacientes oncológicos (Reddy & Robinson, 2010; Sheikhabaei et al., 2017).

Uno de los avances más relevantes fue la introducción de ^{18}F -fluorodeoxiglucosa (FDG) PET combinado con CT para el diagnóstico de pacientes oncológicos. El FDG-PET/CT es capaz de monitorear la respuesta a terapias y la heterogeneidad del tumor, además de la identificación temprana de pacientes con probabilidad de no responder a tratamientos dirigidos o estándares (Sheikhabaei et al., 2017; Reddy & Robinson, 2010). El FDG es una molécula análoga de la glucosa que mide la captación de glucosa en células con actividad maligna, con una sensibilidad de 84% y especificidad de 88% (Reddy & Robinson, 2010).

Las modalidades de la imagenología molecular más comúnmente utilizadas son el PET y SPECT, y utilizan radio-trazadores para realizar imágenes, mapear y mediar actividades en el sitio blanco (ejemplo: angiogénesis, metabolismo, apoptosis, proliferación). Los radio-trazadores pueden brindar información temprana sobre la eficacia del tratamiento, potencialmente luego de pocos días del mismo (Y.-M. Li et al., 2017). Las técnicas de imagenología no invasivas permiten la visualización y cuantificación de todo el organismo. Esto es clave en enfermedades sistémicas o que se diseminan como pueden ser las metástasis. (Freise & Wu, 2015).

Las imágenes por PET, además de utilizar FDG, utiliza diferentes isótopos que son más accesibles y costo-efectivos. Un ejemplo es el Galio-68 (^{68}Ga) que tiene un potencial comercial significativo porque se puede producir en un generador de ^{68}Ga y es más conveniente que los isótopos basados en PET ciclotrones (Li et al., 2017).

El PET combina la física del decaimiento del positrón con las propiedades bioquímicas del compuesto trazador para mapear y cuantificar procesos bioquímicos específicos *in vivo*. Típicamente, los escáneres clínicos de PET tienen sensibilidades de aproximadamente 10 veces más que equipos de SPECT, permitiendo la detección del

radio-trazador a niveles muy bajos (concentraciones de picomolar) (Reddy & Robinson, 2010).

Existen numerosos radio-isótopos que se pueden utilizar para radio marcar moléculas pequeñas para imagenología. El más utilizado es Fluor 18, utilizado en la forma ^{18}F -fluorodeoxiglucosa (FDG). El mismo es un radio-isótopo que es prácticamente emisor de positrón (97%, $E_{\text{max}}=635$ keV), con un rango de positrón de 0,6mm en agua que permite imágenes de alta resolución en escáneres pre-clínicos (Reddy & Robinson, 2010; Wu, 2014).

El ^{68}Ga es otro radio-isótopo de vida media corta (68 minutos) con alta emisión de positrones (89%) y una mayor energía de emisión de positrones ($E_{\text{max}}= 1,9$ keV). Las imágenes obtenidas con ^{68}Ga son de calidad comparable con las imágenes obtenidas con FDG. El Iodo-124 (^{124}I) y el cobre-64 (^{64}Cu) son dos radio-isótopos de vida media larga y con una menor probabilidad de emisión de positrones. Eso sumado a una alta energía de emisión hace que la resolución de las imágenes sea menor que el ^{68}Ga y (Reddy & Robinson, 2010; Wu, 2014).

La imagenología FDG-PET demostró ser una herramienta con un alto desempeño en el diagnóstico en pacientes oncológicos recurrentes durante y luego del tratamiento, en especial en cáncer de pulmón, mama, cabeza y cuello y linfoma, debido a la habilidad de distinguir tejido cicatrizante y fibrosis de tumores residuales viable (Sheikhbahaei et al., 2017).

En el grupo de investigación de Goshen et al., investigaron el desempeño de FDG-PET en la evaluación de pacientes con cáncer colorrectal con metástasis en el hígado, que fueron tratados con bevacizumab e irinotecan. En el estudio se concluyó que FDG-PET es un mejor indicador de cambios patológicos que la imagenología por CT (Sheikhbahaei et al., 2017).

Por otro lado, el FDG tiene como desventaja la poca especificidad y altos niveles de captación en lesiones inflamatorias o infecciosas, y captaciones variables fisiológicamente en tejidos normales, lo que puede confundirse con lesiones malignas. Además, la falta de captación del FDG por parte de células malignas inactivas no permite la visualización del tejido tumoral (Olafsen & Wu, 2010).

La imagenología juega un rol crucial para definir la respuesta y progresión tumoral en pacientes que fueron tratados con alguna inmunoterapia, y para detectar y monitorear toxicidades inmuno-relacionadas (Nishino, Hatabu, & Hodi, 2018).

El bloqueo de puntos de control inmunológicos se ha convertido en uno de los principales tratamientos para cáncer avanzado en la oncología clínica. El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA4) y la proteína 1 de la muerte celular programada (PD1) son antígenos que se expresan durante la activación de las células T, y actúan como reguladores negativos que ayudan a mantener el balance del sistema inmune, la homeostasis y la tolerancia inmune (puntos de control inmunológicos). En cáncer, los antagonistas de dichos puntos de control han recibido mucha atención, en especial la vía PD1 (Emens et al., 2017; Sharpe & Pauken, 2018). Los mecanismos que involucran esta terapia implica nuevos patrones de respuestas y toxicidades tumorales que pueden ser encontrados o monitoreados a través de la imagenología (Nishino et al., 2018).

Se han explorado algunas técnicas de imagenología tumoral que utilizan trazadores radioactivos que se unen a moléculas de la vía de puntos de control inmunológicos. Además, se ha logrado radio-marcador anticuerpos anti-moléculas claves como puede ser PD1 y PD-L1. Tal es el caso de Natarajan et al., que desarrolló un anticuerpo anti-PD1 marcado con zirconio-89 y cobre-64, donde demostró *in vivo* la infiltración de linfocitos en el tumor y tejido linfóide en modelos de ratón.

Por otra parte, Heskamp et al., desarrollaron un anticuerpo anti-PD-L1 marcado con Indio-111, y demostraron una captación específica en tumores PD-L1 positivos en modelos xenogénicos (Nishino et al., 2018). Para la imagenología *in vivo*, los biomarcadores que mejor funcionan son los antígenos expresados en la superficie celular, como ser los antígenos oncofetales, receptores de factor de crecimiento, moléculas de adhesión, etc. También pueden ser componentes asociados al tumor como la matriz extracelular, células del estroma, vasculatura o células infiltradas del sistema inmune (Wu, 2014).

Ingeniería de anticuerpos para imagenología

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos son macromoléculas complejas de aproximadamente 150 kDa, que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas unidas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada consiste en un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH). La cadena liviana consiste en un dominio variable (VL) y un dominio constante. La unión al antígeno está dada por tres regiones complementarias determinantes (CDR, del inglés: Complementarity-determining regions) localizadas en los dominios VH y VL (fig. 10) (Romer, Leonhardt, & Rothbauer, 2011).

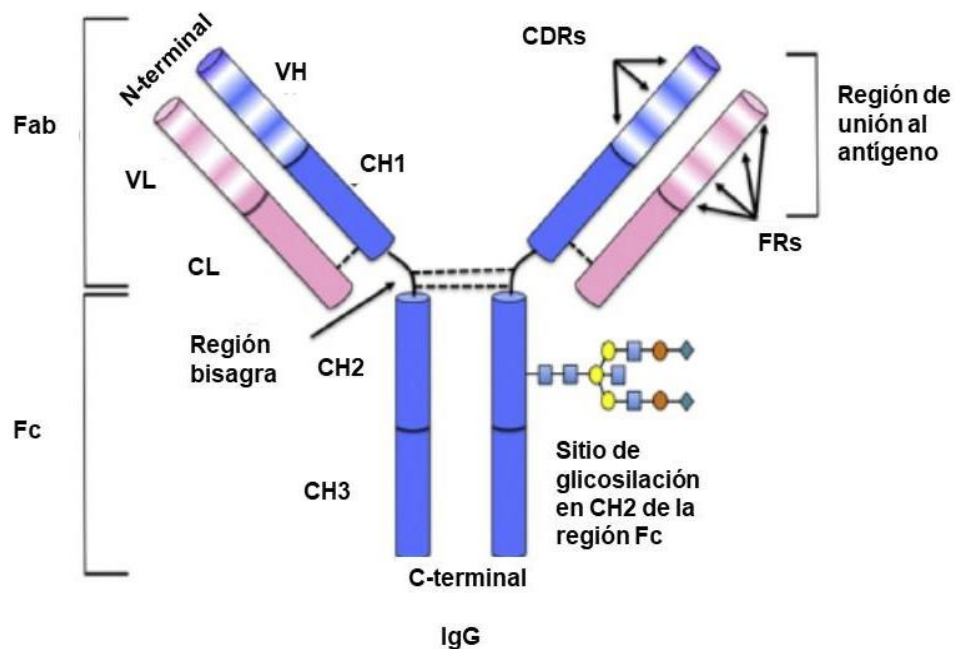


Figura 10. Esquema de la estructura de un anticuerpo IgG (O'Kennedy, Fitzgerald, & Murphy, 2017).

En la década de los 90', varios anticuerpos y fragmentos de anticuerpos radio-marcados fueron aprobados por la FDA para su uso en imagenología del cáncer en Estados Unidos. Tal fue el caso de: satumomab-pendetida (anti-TAG72), capromab-pendetida (anti-glicoproteína), arcitumab (anti-CEA), y norfetumab-merpentan (anti-glicoproteína). Sin embargo, esta primera generación de agentes imagenológicos fue poco exitosa debido a sus orígenes murinos, vida media en circulación muy elevada, moléculas blanco poco específicas y baja sensibilidad (Wu, 2014).

Uno de los requisitos más comunes para el uso clínico de anticuerpos es que tengan baja inmunogenicidad. Esto se puede lograr a través de la humanización de los anticuerpos murinos. También que sean moléculas inertes, ya que un efecto que genere interacción biológica resultando en perturbaciones funcionales (tales como activación celular o inducción de apoptosis) puede generar efectos secundarios y problemas de seguridad del procedimiento. Las interacciones con la región Fc con el sistema de complemento y con los receptores de Fc se pueden evitar al utilizar fragmentos de anticuerpos que no contengan la región Fc o los dominios CH2 (Wu, 2014). Las dosis de anticuerpos requeridas para imagenología son menores a aquellas para usos terapéuticos, por lo que la toxicidad se limita más que nada a reacciones inmunológicas (Warram et al., 2014).

Se ha demostrado que, para tumores sólidos, los mAb logran penetrar al tumor solo de manera lenta, de una forma no uniforme y alcanzando altos niveles en suero de una manera que puede asociarse a niveles tóxicos (Holliger & Hudson, 2005).

Algunas desventajas del uso de anticuerpos enteros en la clínica son un elevado peso molecular y composición compleja, que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, glicosilación de la cadena pesada, y al menos un puente disulfuro por dominio Ig. Además, para su producción se requieren sistemas de expresión eucariotas, que en general implican la transfección de células de mamífero generando clones estables, lo que requiere una puesta a punto laboriosa y costosa (Gebauer & Skerra, 2009).

La especificidad de unión al antígeno de los mAb está dada por seis regiones o CDR que se encuentran en los dominios variables siendo tres en la cadena pesada y tres en la cadena liviana (VH y VL). Los anticuerpos del tipo IgG son bivalentes, ya que tienen 2 sitios de unión para el antígeno lo cual aumenta su funcionalidad y adquiere tiempos de retención elevados (avidez). El dominio Fc recluta funciones efectoras citotóxicas a través del sistema del complemento y/o con interacciones con receptores de Fc; además puede adquirir mayor vida media en suero (mayor a diez días) mediante la interacción con el receptor neonatal FcRn presente en células presentadoras de antígeno (Holliger & Hudson, 2005).

Algunas técnicas de ingeniería molecular han logrado la construcción de moléculas "single chain-Fv" (scFv) que comprende los dominios VH y VL de un mAb unidos por un péptido corto (linker). Este tipo de moléculas tienen un peso molecular aproximado de 25 kDa y puede ser producido por una variedad de sistemas de expresión (Reddy & Robinson, 2010).

En el año 2012, la facturación del mercado biofarmacéutico fue de aproximadamente 100-120 billones de dólares americanos por año. Esto se debió al marketing que en ese momento estaban teniendo los mAb y fragmentos de anticuerpos, las tecnologías de mayor crecimiento de productos biofarmacéuticos aprobados (Spadiut, Capone, Krainer, Glieder, & Herwig, 2014). Al 2017, 74 anticuerpos innovadores y proteínas de fusión Fc habían sido aprobadas para tratamientos de enfermedades en al menos uno de los principales mercados (por ejemplo: Estados Unidos o Japón). De esos 74, 7 han sido retirados del mercado por tener baja eficacia, baja toxicidad para su propósito o por falta de interés por parte del mercado. A su vez, de esas 74 moléculas, 5 tenían su secuencia completa de origen murino, 9 eran anticuerpos quiméricos, 26 eran anticuerpos humanizados, 23 eran anticuerpos humanos, y 11 eran proteínas de fusión Fc (Strohl, 2018).

En el año 2016, las proteínas recombinantes comprendían a 7 de las 10 drogas más vendidas a nivel mundial. De esas 7, 5 eran mAb (Humira, Rituxan, Remicade, Avastin, Herceptin). Esto evidencia que los mAb están teniendo un impacto en la industria farmacéutica para tratar enfermedades, satisfacer necesidades médicas, así como ayudar al crecimiento de dicha industria (Strohl, 2018).

Fragmentos de anticuerpos

La farmacocinética es clave para la imagenología. Los anticuerpos nativos son muy buenos para usos terapéuticos ya que tienen un tiempo en circulación de entre una a tres semanas, lo que asegura tiempos de exposición a la droga reduciendo la frecuencia de administración de la misma. Para usos imagenológicos, se requieren tiempos más cortos de circulación para lograr imágenes con mejor contraste, lo que se ha logrado a través de los fragmentos de anticuerpos. Los mismos retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo parental y llegan a tiempos de circulación de entre días y hasta horas (Wu, 2014).

Moléculas con un peso molecular inferior a los 60 kDa tienen una eliminación renal, mientras que moléculas con peso molecular superiores son eliminadas a través del hígado, controladas por la presencia o ausencia de la región Fc (Wu, 2014).

Las técnicas de imagenología no invasiva con anticuerpos permite tener un primer abordaje del fenotipo de la superficie celular. Además, la detección y cuantificación de marcadores específicos de tumor pueden localizar y proveer información sobre la naturaleza y extensión de la enfermedad. La evaluación imagenológica de todo el

organismo de la expresión de una molécula blanco brinda mucha información debido a la heterogeneidad de las metástasis, tanto intra-lesión como entre lesiones (Freise & Wu, 2015).

El uso de los anticuerpos monoclonales e inhibidores de moléculas blanco que se unen a antígenos de membrana asociados a tumor, permiten el desarrollo del inmuno-PET como método para la toma de decisiones terapéuticas. Esto es así ya que logra confirmar la expresión de antígenos en lesiones sin necesidad de realizar biopsia, por lo que se podría saber si un paciente tiene mayor probabilidad de respuesta a determinada terapia. Además, el inmuno-PET es capaz de brindar información dosimétrica útil para la planificación de un tratamiento de radio-inmuno-terapia estimando la dosis de radiación necesaria (Freise & Wu, 2015; Reddy & Robinson, 2010).

La eficacia de los anticuerpos con radio-trazadores para inmuno-PET depende de: a) el antígeno blanco, que esté presente en abundancia en el tumor y no en células normales; b) el anticuerpo, que debe de tener suficiente afinidad como para unirse de manera estable en el tumor; c) que el anticuerpo no unido al antígeno debe de tener una rápida cinética de eliminación, y quedar en circulación el menor tiempo posible. Las características físicas de los anticuerpos como son el tamaño, afinidad y valencia, afectan directamente la eliminación y retención en el tumor de los mismos (tabla 1) (Reddy & Robinson, 2010).

Además, para las modalidades de SPECT y PET, la densidad de antígeno blanco presente en las células es esencial. En el caso de un experimento de micro-PET utilizando un fragmento de anticuerpo ^{124}I anti-CEA, no logró detectar células con baja expresión del antígeno específico (25.000 copias/células). Asimismo, otros estudios con fragmentos de anticuerpos sugieren un mínimo de 50.000-100.000 copias/célula del antígeno para ser detectados (Wu, 2014). La habilidad de los anticuerpos de unirse al antígeno blanco con afinidades a niveles de nanomolar o picomolar permite el desarrollo de agentes imagenológicos de alta sensibilidad (Freise & Wu, 2015).

Otro aspecto importante al momento de desarrollar anticuerpos para imagenología molecular es si en la unión al antígeno blanco, el anticuerpo se internaliza o no. La cinética de internalización o reciclado va a impactar en el grado de acumulación del anticuerpo y/o la molécula blanco. Además, va a ser importante para la selección del radionucleido y de la forma de conjugación química al anticuerpo (Wu, 2014). Si la molécula es internalizada, los metabolitos radioactivos quedarán atrapados en el interior de las células, logrando una máxima acumulación deseable en las células blanco. Sin

embargo, los metabolitos podrían ser retenidos en otros órganos de eliminación generando ruido de fondo (Freise & Wu, 2015).

Tabla 1. Propiedades y características que se buscan al momento de diseñar un anticuerpo o fragmento del mismo para usos imagenológicos. Figura tomada y adaptada de Wu, 2014.

| Propiedades deseadas de agentes imagenológicos basados en anticuerpos | |
|--|--|
| ➤ | Baja inmunogenicidad |
| ➤ | Bivalente para una mejor retención en el tumor |
| ➤ | Inerte |
| ➤ | Cinética rápida <i>in vivo</i> |
| ➤ | Bajo peso molecular (para mejor penetración al tejido) |
| ➤ | Vía de eliminación preferentemente por riñón o hígado |
| ➤ | Conjugación sitio-específica |
| ➤ | Preferentemente no-glicosilado |
| ➤ | Producción y purificación eficientes bajo condiciones cGMP |
| ➤ | Estable en suero |









| Format | Composition | Valency | Approx. MW (kDa) | Typical Serum $t_{1/2}$ | Clearance Route | Suggested Reference | |
|---|---------------------|--|------------------|-------------------------|-----------------|---------------------|--------------------------|
|  | Intact IgG | $(V_H + V_L)_2$ | Bivalent | 150-160 | 1-3 weeks | Hepatic | Ogasawara et al., 2013 |
|  | F(ab') ₂ | $(V_H C_H1 + V_L + C_L)_2$ | Bivalent | 110 | 8-10 h | Hepatic | Lütje et al., 2014 |
|  | Minibody | $(scFv + C_H3)_2$ | Bivalent | 75 | 5-10 h | Hepatic | Tavaré et al., 2014 |
|  | Fab | $V_H C_H1 + V_L + C_L$ | Monovalent | 50-55 | 12-20 h | Renal | Chakravarty et al., 2014 |
|  | Diabody | $(scFv)_2$ | Bivalent | 50 | 3-5 h | Renal | Tavaré et al., 2014b |
|  | scFv | $V_H + V_L$ | Monovalent | 28 | 2-4 h | Renal | Kim et al., 2014 |
|  | Nanobody | $V_H H$ (Camelid) | Monovalent | 12-15 | 30-60 m | Renal | Bannas et al., 2014 |
|  | Affibody | Z domain of protein A (<i>S. aureus</i>) | Monovalent | 7 | 30-60 m | Renal | Strand et al., 2014 |

Figura 11. Propiedades de anticuerpos y fragmentos recombinantes y enzimáticos de los mismos. Figurada tomada de Freise & Wu, 2015.

En la elección del radiomarcado se debe buscar coincidir, idealmente, la vida media del radionucleido con la vida media del anticuerpo o fragmento del mismo. El fluor-18 tiene un período de desintegración de 109,8 minutos el cual coincide con la rápida eliminación de fragmentos de anticuerpos como los scFv, nanobodies y affibodies (fig. 11). Para fragmentos más grandes, como los anticuerpos enteros o minibodies, y que no internalicen en las células, el ^{124}I de vida media de 4,18 días es un mejor radio marcado. ^{64}Cu y ^{89}Zr son ideales para fragmentos de anticuerpos que se internalicen, con tamaños medios, como pueden ser los scFv, minibodies y diabodies, así como también anticuerpos enteros (fig. 11). El ^{68}Ga es cada vez más utilizado en fragmentos de anticuerpos pequeños como nanobodies y affibodies por su corta vida media de 68 minutos (Freise & Wu, 2015).

Casi cualquier sonda para imagenología puede ser conjugada a un anticuerpo. La conjugación se da covalentemente al anticuerpo en relaciones molares muy bajas para evitar interferencias con el sitio de unión al antígeno. El radio-marcado puede ser de forma directa o indirecta. Esta última puede ser a través de un *linker* o un agente quelante (Warram et al., 2014).

Para obtener imágenes de alto contraste con anticuerpos enteros se debe de esperar varios días luego de la inyección. Los fragmentos de anticuerpo Fab (50 kDa) y F(ab)2 (100 kDa) son generados por digestión con la enzima papaína de los anticuerpos enteros. La obtención de imágenes utilizando los Fab comenzó hace casi 30 años atrás, con el Fab, derivado de un mAb murino, IMMU-4 contra el antígeno carcino-embriónico (CEA). El mismo fue conjugado a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para obtención de imágenes de cáncer colorrectal (Romer et al., 2011).

scFv y Diabodies

Los scFv son fragmentos de anticuerpo de ~25-30 kDa que comprenden la región variable de la cadena pesada y la cadena liviana unidas por un péptido flexible (*linker*) que puede ser de entre 12-25 residuos de extensión (fig. 12). La proteína resultante retiene la especificidad del anticuerpo parental. Si bien los dominios pueden ser orientados VL-linker-VH o VH-linker-VL, la misma puede afectar la expresión, estabilidad y afinidad al antígeno. Los péptidos linker más utilizados son (Gly4-Ser)3 flexibles ya que son ricos en glicinas, o linkers provenientes de proteínas naturales multidomínios, aunque también se pueden incorporar aminoácidos con carga para aumentar la solubilidad (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016; Klement et al., 2015; Moradikalbolandi & Davani, 2016).

El tamaño más pequeño de los scFv (~28kDa) en comparación con el anticuerpo entero hace que sea más fácil su captación y penetración al tejido tumoral. Además, tienen una eliminación más rápida disminuyendo el tiempo de exposición y así su toxicidad (Zarei & Vaziri, 2014). La monovalencia de los mismos acelera su eliminación, por lo que se han construido bloques dimericos, trimericos y multimericos para adaptar el tiempo de eliminación a la aplicación que se busque (Olafsen & Wu, 2011; Romer et al., 2011).

Para aumentar la vida media en circulación de los scFv se utilizaron algunas estrategias como: conjugar al scFv poli-etilen-glycol (PEG) o albúmina de suero humana (HSA), la multidimerización a través de la fusión de streptavidina-scFv y fusiones de cierres de leucina o alfa hélices a la región C-terminal del scFc vía una región bisagra (Olafsen & Wu, 2011).

Los sistemas de expresión más utilizados para los scFv son bacterianos, principalmente *E. coli*, además de sistemas eucariotas como *Pichia pastoris*, células de insectos, de plantas y de mamíferos (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016; Zarei & Vaziri, 2014).

Los dímeros de scFv forman los Diabodies, y se generan acortando el linker a menos de 10 residuos entre los dominios variables. El linker más corto hace que el scFv se abra y se entrecruce un scFv con otro, formando una unión no covalente. Se logra así una molécula de mayor peso molecular que el scFv y bivalente (~50 kDa) (fig. 12), lo cual mejora la captación por parte del tumor. Si el linker es menor a 3 aminoácidos, se pueden producir trímeros y tetrámeros (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016; Holliger & Hudson, 2005).

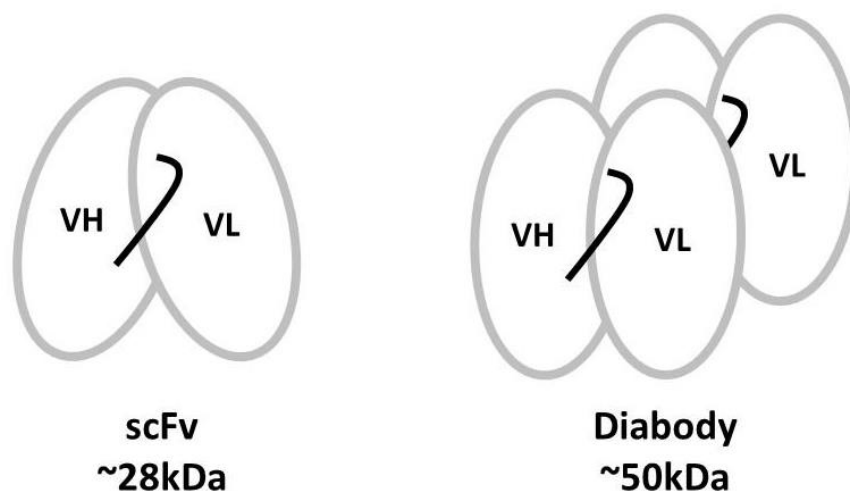


Figura 12. Esquema representativo de los fragmentos de anticuerpo scFv y diabody.

Minibodies

Para evitar la acumulación en el riñón de los fragmentos de anticuerpos menores a 60 kDa, se comenzaron a diseñar otros fragmentos mayores a dicho peso molecular. Tal es el caso de los minibodies, que esencialmente son un scFv con un CH3 de la IgG1 humana (fig. 13). El primer minibody diseñado fue el anti-CEA T84.66 mAb por Hu, et al. Para la formación del dímero utilizaron dos estrategias: mediante un linker de dos aminoácidos formando una unión no-covalente (LD minibody), o a través de una región bisagra y un *linker* flexible con diez aminoácidos adicionales (Flex-minibody) permitiendo una unión covalente en la región bisagra (Hu et al., 1996).

El ^{123}I -Flex-minibody obtuvo mejores resultados en imagenología SPECT, con una localización del tumor a las 4 horas post-inyección y con un ruido de fondo casi nulo a las 19 horas post-inyección. Dado estos estudios iniciales, el formato Flex-minibody (con un linker de por lo menos 10 aminoácidos y una región bisagra) fue el utilizado en todos los estudios posteriores encontrados en la literatura con minibodies (Olafsen & Wu, 2010).

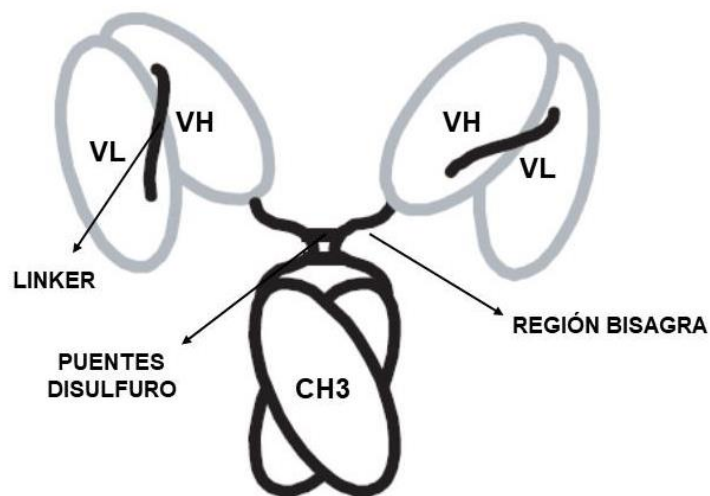


Figura 13. Esquema de un minibody en su estado dimérico (Olafsen et al., 2004).

En estudios del grupo de investigación de Kim et al., se logró expresar un minibody anti-EGFR, derivado del anticuerpo monoclonal parental Cetuximab, en *Escherichia coli* utilizando un linker de 18 aminoácidos, con una orientación del scFv VH-VL, y un hinge-CH3 proveniente de la secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina humana IgG1.

La expresión fue en el periplasma celular, con la secuencia líder *pelB* en la cepa BL21 (DE3) (Chi, Kim, Yoo, Kim, & Hong, 2016; Y. P. Kim et al., 2014).

En un estudio imagenológico con un minibody anti-PSCA en comparación con su anticuerpo parental, se vio que las mejores imágenes obtenidas con el minibody fueron a las 21 horas post-inyección, y las imágenes con el anticuerpo entero se obtuvieron una semana post-inyección. Sin embargo, el minibody mostró una disminución de nueve veces en su afinidad cuando fue evaluado *in vitro* (Leyton et al., 2008). En un estudio siguiente, por el mismo grupo de investigación, la afinidad de los minibodies fue modificada mediante evolución dirigida utilizando *error prone PCR*. Tres minibodies fueron seleccionados, donde uno de ellos mostró mejoras en la calidad de las imágenes *in vivo* por inmuno-PET (Lepin et al., 2010).

En otro estudio con un minibody anti-CD20 y con un scFv anti-CD20, basados en el mAb anti-CD20 rituximab, se obtuvieron imágenes en un modelo murino xenográfico por PET a las 21 horas post inyección con ambos fragmentos (Olafsen et al., 2009).

El primer ensayo clínico en humanos utilizando inmuno-PET fue entre los años 2003-2005 en el Centro Médico VU en Ámsterdam utilizando ^{89}Zr -cmAb U36 para el diagnóstico de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Se analizaron 20 pacientes donde se vio que el inmuno-PET tuvo mayor sensibilidad y especificidad que el CT y la MRI, identificando todos los tumores primarios y 18/25 metástasis en nodos linfáticos (Warram et al., 2014).

Otros agentes imagenológicos

Si bien los mAb y sus fragmentos derivados han sido las moléculas de unión más ampliamente utilizadas, el desarrollo de nuevas tecnologías de diversificación y selección permitieron la generación de nuevas proteínas de unión artificiales con un plegado diferente al de las Ig. Estas moléculas logran combinar la alta especificidad y afinidad por sus antígenos con un pequeño tamaño, altos niveles de producción en *E. coli* y una alta estabilidad térmica y química. Algunos ejemplos de este tipo de proteínas son los affibodies, monobodies y los DARPins (del inglés: desinged ankyrin repeat proteins), entre otros (Gebauer & Skerra, 2009).

Un ejemplo de dichas proteínas que están siendo investigadas para usos en imagenología molecular es el trabajo de Xu et al., donde diseñaron un affibody anti HER2 conjugado a ^{68}Ga para aplicaciones en PET. En este trabajo obtuvieron datos

satisfactorios de la molécula en PET tanto en modelos animales como en pacientes humanos con tumores de mama (Xu et al., 2019).

Sistemas de expresión de fragmentos de anticuerpos recombinantes

El mercado bio-farmacéutico comienza en la década de los 70' con la introducción de técnicas de ADN recombinante. Los investigadores Stanley Cohen y Herbert Boyer inventaron la clonación de ADN, lo que permitió la transferencia de genes entre diferentes especies. Esto llevó al desarrollo de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas, como fue el caso de la insulina y la hormona de crecimiento, las cuales fueron clonadas y expresadas en *E. coli* en 1978 y 1979 respectivamente (Nielsen et al., 2014).

En el mercado hay más de 300 productos biofarmacéuticos incluyendo proteínas y anticuerpos, donde los anticuerpos monoclonales han capturado la mayor cuota de mercado, seguidos por las hormonas y factores de crecimiento. Estos biofármacos son producidos principalmente en células de mamíferos (56%), en segundo lugar, en *E. coli* (24%), y en tercer lugar provienen de levaduras (13%) (fig. 14). La producción de anticuerpos recombinantes es uno de los sectores que más crece en la industria biofarmacéutica debido al desarrollo de nuevas técnicas de ingeniería genética que permiten manipular genes de los anticuerpos. Esta manipulación hace posible la configuración deseable de propiedades efectoras y de unión, incorporación de *tags* y proteínas de fusión (Ayyar, Arora, & Shankar, 2017).

Sistemas de expresión

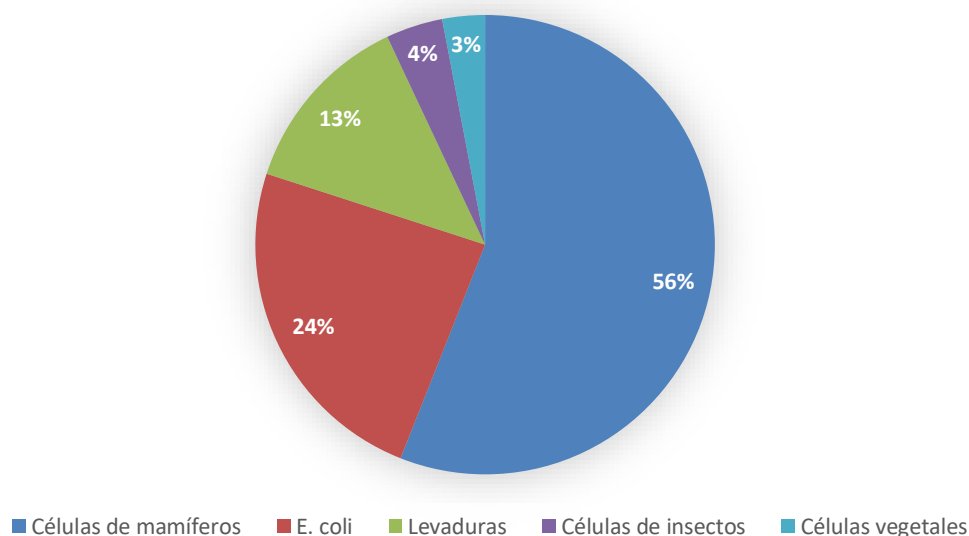


Figura 14. Porcentaje de la producción de biofármacos en diferentes sistemas de expresión (Nielsen et al., 2014).

Los anticuerpos son estructuras complejas que requieren de maquinaria celular sofisticada para una adecuada expresión y conformación. La expresión va a depender del tamaño de la proteína, secuencia y formato, así como también el número de puentes disulfuro tanto intra- como inter-molécula, y modificaciones postraduccionales necesarias para el funcionamiento del anticuerpo (Ayyar et al., 2017). Existen muchas opciones de sistemas de expresión de anticuerpos recombinantes, entre ellas están: bacterias, líneas celulares de mamíferos, células de insectos, levaduras y hongos filamentosos (Ma & O’Kennedy, 2017; Kaur, Kumar, & Kaur, 2018).

Expresión en *Escherichia coli*

Los sistemas procariotas son los más ampliamente utilizados en la producción de moléculas recombinantes por su rápido crecimiento, bajo costo, la capacidad de alcanzar altas densidades celulares, facilidad en su manipulación genética, y por contar con un sistema genético muy bien conocido. La bacteria gram negativa *E. coli* fue el primer microorganismo a ser utilizado en la producción de un biofármaco recombinante, y para el año 2014 contaba con el 40% de la producción de biofármacos producidos en el mercado (Spadiut et al., 2014).

E. coli es utilizado como sistema de expresión proteica debido a que es un organismo muy bien caracterizado genéticamente, de fácil manipulación genética, condiciones simples de fermentación, simple de escalar, bajo costo y tiempos relativamente cortos entre la transformación y expresión de la proteína. Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se deben de decidir una serie de variables que pueden afectar la expresión proteica, principalmente la elección del vector y del hospedero (fig. 15). Algunas desventajas de este sistema son la presencia de endotoxinas, falta de maquinaria enzimática sofisticada, y ausencia de glicosilación (Ahmad et al., 2018; Baral & Arbabi-Ghahroudi, 2012).

La expresión citoplasmática se asocia a un mayor rendimiento intracelular, también se asocia a la formación de cuerpos de inclusión debido a que los puentes disulfuro no se forman correctamente en dicho compartimiento celular, y por la falta de elementos que ayuden a la correcta conformación proteica. Esto se puede solucionar a través de la co-expresión de chaperonas o haciendo que la expresión proteica se de en el periplasma fusionando a la proteína un péptido señal en el N-terminal. Otro método que puede ser utilizado es el "refolding" de los cuerpos de inclusión (Spadiut et al., 2014).

Algunas proteínas recombinantes requieren para su expresión funcional un ambiente oxidante para una correcta formación de puentes disulfuro. Los mismos son una unión covalente entre dos residuos de cisteína y son esenciales, en los casos en que están presentes. El periplasma es un compartimento celular de las bacterias gram negativas y dirigir la secreción de la proteína recombinante a dicho compartimento se logra a través de un péptido señal, en la región N-terminal. Los más utilizados son Lpp, LamB, LTB, MalE, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, PelB, PhoA, PhoE y SpA. En particular, el péptido señal pelB permite la secreción de la proteína en un estado desplegado hacia el periplasma a través de la vía Sec-dependiente. El péptido señal es clivado y la proteína recombinante se pliega en el periplasma con la ayuda de chaperonas e isomerasas que favorecen la correcta formación de puentes disulfuro. Una limitante que tiene la expresión periplasmática es la saturación de la maquinaria de translocación, lo cual puede tener efectos tóxicos y por consiguiente bajar los rendimientos de la producción (Kaur et al., 2018).

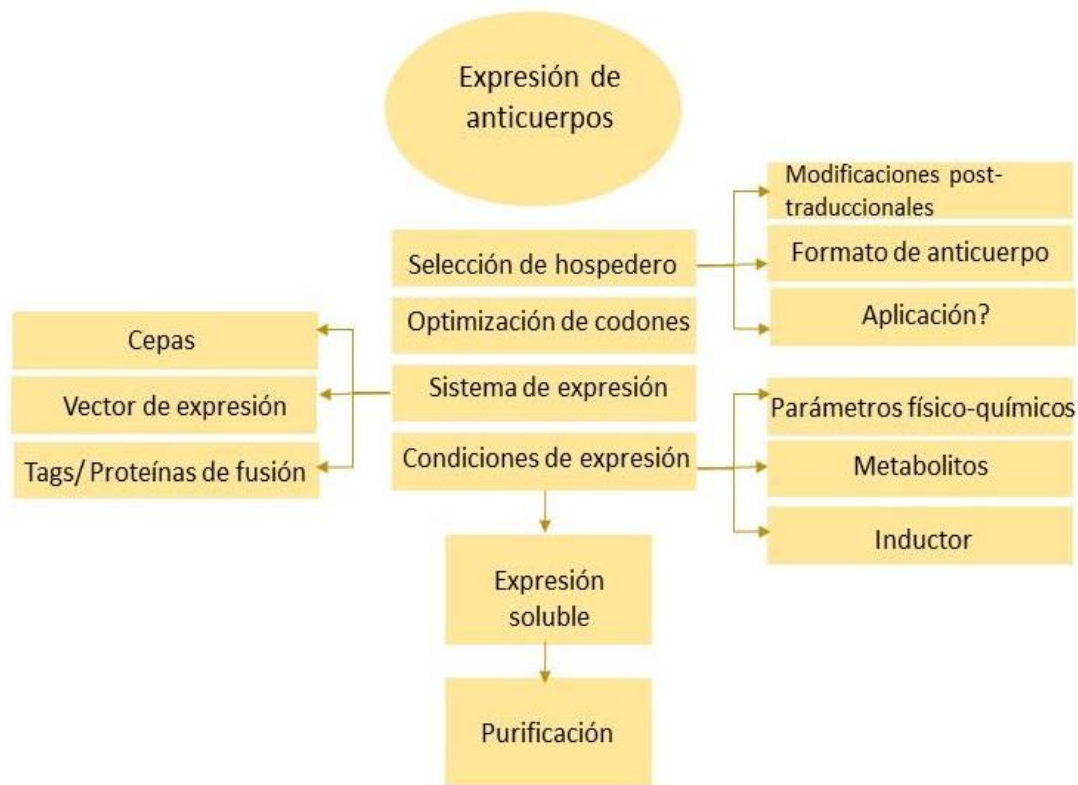


Figura 15. Factores a tener en cuenta para una óptima expresión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

Vector de expresión

La expresión de proteínas recombinantes en bacterias está dada por plásmidos de multicopia auto-replicantes que cuentan con un promotor fuerte, como puede ser el promotor T7 de bacteriófago λ , el operón lac de *E. coli*, o el operón sintético trp entre otros (Agustín Correa & Oppezzo, 2011; Spadiut et al., 2014).

Normalmente los plásmidos de expresión contienen un origen de replicación, un promotor, un sitio de multiclonado, un tag de afinidad y un marcador de resistencia. Los promotores más utilizados son: el promotor lac, del operón lac (lactosa), el promotor T7 utilizado en vectores pET, y el sistema de promotor de arabinosa que contienen el promotor del operón araBAD (arabinosa). En el caso del promotor T7, el gen de interés es clonado bajo la regulación de un promotor que es reconocido por la ARN polimerasa del fago T7, la cual está usualmente localizada en el genoma bacteriano bajo el control transcripcional del promotor lacUV5. Esto permite la inducción por lactosa o su análogo isopropil- β -D-1-tiogalacto-piranosida (IPTG).

En los vectores pBAD, el gen *araC* inhibe la expresión del promotor *araBAD* en ausencia de L-arabinosa o presencia de glucosa, y la activa en la ausencia de glucosa y presencia de L-arabinosa. Este sistema permite modular la expresión en un rango de concentraciones de L-arabinosa, y además tiene como ventaja el bajo costo de la L-arabinosa en comparación con el IPTG (Ahmad et al., 2018; Agustín Correa & Oppezzo, 2011; Kaur et al., 2018).

Adicionalmente, la expresión puede ser alterada por la presencia de codones poco comunes en *E. coli* lo cual podría afectar el crecimiento celular o los rendimientos de la expresión proteica. Para esto, se puede sustituir los codones pocos frecuentes mediante la síntesis química del gen de interés, o utilizar una cepa de *E. coli* que esté suplementada por ARNt que se encuentran en baja cantidad. Para este último caso, existen algunas cepas comerciales como son BL21 CodonPlus (Novagen), y Rosetta (Invitrogen), ambas demostraron ser efectivas para la expresión soluble de varias proteínas recombinantes (Agustin Correa & Oppezzo, 2015).

Cepas

Una correcta elección de la cepa de *E. coli* permite una mejor expresión y rendimiento de la proteína. La cepa BL21 y sus derivadas son muy utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes ya que son deficientes para la adenosina trifosfato (ATP) proteasa Lon-dependiente, y en la proteasa OmpT. Esto permite una reducción en la degradación de la proteína recombinante y aumentar así su rendimiento. Para vectores con promotores T7, la mejor cepa es BL21(DE3) ya que produce la ARN polimerasa para dicho promotor. Los promotores *lac* y *trc* son reconocidos por la ARN polimerasa de *E. coli* y puede ser expresado en cualquier cepa como, por ejemplo, BL21, Top10 o DH5 α .

La formación de puentes disulfuro se da en el periplasma de *E. coli* a través de las proteínas Dsb (DsbA, B, C, D y G). Las proteínas DsbC y G son isomerasas que se encargan de corregir la formación incorrecta de puentes disulfuro. Por otra parte, las mutaciones en la reductasa glutatión (*gor*), y la reductasa tiorredoxina (*trx*) aumentan la formación de puentes disulfuro ya que se favorece un ambiente más oxidante. Tal es el caso de la cepa Origami la cual es mutante para las dos reductasas previamente nombradas.

Además, la cepa de *E. coli* Shuffle expresa en el citoplasma la proteína DsbC y contiene también las mutaciones *trxB*-/*gor*-, lo que permite una mejor formación de puentes

disulfuro en el citoplasma. En el caso de los vectores pBAD, las cepas deben de ser araBAD⁻ y araEFGH⁺, que permiten el transporte de L-arabinosa, pero no la metabolizan. Algunos ejemplos son, Top10, o LMG194. Existen muchas cepas modificadas para optimizar la expresión de proteínas recombinantes tóxicas para *E. coli* (Agustín Correa & Oppezzo, 2011; Kaur et al., 2018).

Proteínas de fusión

Las proteínas recombinantes que son expresadas en *E. coli*, pueden formar en algunos casos agregados o cuerpos de inclusión debido a una incorrecta formación de su estructura terciaria. El uso de proteínas de fusión es una estrategia para mejorar la solubilidad y la formación de una correcta estructura terciaria. Entre ellas, las más utilizadas y que están disponibles comercialmente, son MBP, GST, Trx, DsbC, NusA, Sumo (Agustín Correa et al., 2014; Hee, Dong, Nam, & Hwan, 2011; Kaur et al., 2018)

Las proteínas de fusión favorecen una correcta conformación de la proteína recombinante, además de protegerla de proteólisis intracelular y aumentar la solubilidad de la misma. En general, estas proteínas de fusión son removidas luego de la purificación con proteasas específicas a través de sitios de clivado entre la proteína de fusión y la proteína de interés (Kaur et al., 2018).

Purificación

La cromatografía de afinidad es un método de separación basado en interacciones altamente específicas, entre un antígeno y un anticuerpo, entre una enzima y un sustrato o entre un ligando y un receptor. Los anticuerpos recombinantes pueden ser purificados a través de cromatografías de afinidad, que separan los anticuerpos mediante interacciones reversibles con targets inmovilizados o tags. El tag más utilizado para purificar proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* es el His-tag, que consiste en 6-10 histidinas en tándem que interactúa reversiblemente con metales como el níquel o cobre. Este tag tiene como ventaja su tamaño pequeño (0,84kDa) y su naturaleza inerte.

El Strep-tag II es otro tag de afinidad que consiste en ocho residuos (WSHPQFEK) que es reconocido específicamente por una versión modificada de la streptavidina (strep-Tactin). Además, existe la versión Twin-Strep-tag, el cual tiene mayor estabilidad y afinidad en la unión con la Strep-Tactin y consiste en dos strep-tag-II conectados por un

linker corto. El mismo permite purificar con mayor eficiencia muestras diluidas (Agustin Correa & Oppezzo, 2015; Han et al., 2017; Schmidt et al., 2013)

Expresión en sistemas eucariotas

Cuando la expresión de proteínas recombinantes requiere modificaciones post-traduccionales, o la expresión en sistemas procariotas no resulta en una proteína soluble y homogénea, se recurre a otros sistemas de expresión como ser el de células eucariotas, comúnmente células de insectos y células de mamíferos. Dentro de estas últimas, las más utilizadas son las células CHO y las células HEK. Tanto las células de insectos como las de mamíferos son cultivadas idealmente en suspensión, ya que esto permite alcanzar niveles de densidad celular más elevados, y así un mayor nivel de expresión proteica por litro de cultivo. Además, el uso de medios de cultivo libres de suero facilita la purificación de la proteína cuando esta es secretada (Mckenzie & Abbott, 2018).

La mayoría de los anticuerpos terapéuticos son producidos en células de mamíferos debido a sus modificaciones post-traduccionales y generan menos modificaciones inmunogénicas. Por ejemplo, la producción industrial de proteínas del tipo IgG en células CHO alcanzó los 12 g/L debido al resultado de nuevas tecnologías que mejoraron las líneas celulares, optimización de los medios de cultivo y procesos de producción (Jäger et al., 2013).

Células HEK 293

La expresión transitoria en células de mamíferos es cada vez más utilizada para la expresión de proteínas debido al desarrollo de protocolos de transfección eficientes, así como por la disponibilidad de líneas celulares que crecen en suspensión en altas densidades. Para la expresión transitoria, se utilizan principalmente las células HEK-293 y CHO-K1. Esta transfección sencilla de realizar permite altos niveles de expresión para proteínas glicosiladas, sin necesidad de generar líneas celulares estables. En las células HEK-293 se utilizan vectores con el promotor de citomegalovirus humano (CMV) con una fuerte actividad transcripcional (Vink, Oudshoorn-Dickmann, Roza, Reitsma, & de Jong, 2014).

Las células HEK 293 fueron generadas a partir de tejido embrionario que fue transformado con ADN de adenovirus 5. De esta línea celular derivaron otras líneas como la HEK 293T y HEK 293E que son capaces de mediar la propagación episomal de vectores que contengan orígenes de replicación de SV40 (HEK 293T), ó EBV (HEK 293E). La transfección de ADN plasmídico en estas células se puede realizar con fosfato de calcio, liposomas catiónicos y polímeros. El polímero catiónico polietilenamida (PEI) logra combinar una alta eficiencia en la entrega del plásmido con una baja toxicidad y fácil manipulación (Jäger et al., 2013).

Así como en la expresión en *E. coli*, en células de mamífero también se puede expresar la proteína recombinante con proteínas de fusión, principalmente para brindarle a la proteína de interés nuevas propiedades. Estos pueden ser, péptidos señal ó fragmentos Fc derivados del gen de la inmunoglobulina γ . Lo cual facilita la eficiencia de producción y secreción. Además, la porción Fc al estar altamente glicosilada y contar con un pH neutro, ayuda a aumentar la solubilidad en proteínas hidrofóbicas (Lo et al., 2002).

Células S2

Además de las células HEK, otro sistema de expresión eucariota utilizado son las células Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster*. Dicho sistema implica generar clones estables en células S2 seleccionadas a través de un plásmido que contenga el gen de interés. Estas células S2 transfectadas y estables pueden ser cultivadas en altas densidades celulares en suspensión, lo cual permite un escalado del cultivo y maximizar la producción de la proteína recombinante (Mckenzie & Abbott, 2018).

Las células S2 son derivadas de cultivos primarios de células embrionarias de estadios tardíos de *Drosophila melanogaster*. Estas células son relativamente sencillas de cultivar, crecen de forma semi-adherentes, en ausencia de CO₂ a 28°C. Las proteínas recombinantes expresadas en las células S2 pueden ser secretadas al medio de cultivo facilitando la purificación de la proteína de interés en comparación con una expresión intracelular.

Este sistema de expresión ha sido utilizado para la producción de antígenos para vacunas, así como para diversas proteínas heterólogas (Astray, Suárez-patiño, & Calil Jorge, 2010; Kanthala, Mill, Riese, Jaiswal, & Jois, 2016) Las células S2 son muy eficientes en la expresión de proteínas secretadas al medio en comparación con otras células de insectos convencionales (Vatandoost & Bos, 2016; Yamashita, A; Nango, E; Ahikawa, 2017).

Algunas proteínas recombinantes han sido expresadas en las células S2 como, por ejemplo, la proteína recombinante truncada de la subunidad DEN2-80E de la cápside del virus del Dengue, o la glicoproteína viral gp 120 del virus HIV, y la glicoproteína del virus de la rabia (RVGP). Todas han sido expresadas en altos niveles y conservado la actividad biológica (Moraes et al., 2012a).

El uso de clones estables tiene la ventaja de una alta reproducibilidad en términos cualitativos y cuantitativos de la expresión del producto en comparación con la expresión transitoria. La desventaja es que se requiere de más tiempo para la obtención de clones estables si lo comparamos con la expresión transitoria (Yamashita, A; Nango, E; Ahikawa, 2017).

Los vectores para la expresión de proteínas en células S2 generalmente cuentan con: un gen para un origen de replicación bacterial (pUC ori), un promotor de metalotioneina (pMt) para la expresión del gen de interés, un gen promotor copia de *Drosophila* (pCopuro) usado para la selección de la expresión, un gen de ampicilina para la selección en bacterias, la señal poliadenilada SV40, y la secuencia señal de secreción de la proteína de unión de la cadena pesada de la inmunoglobulina de *Drosophila* (Bip) (Moraes et al., 2012a).

Antecedentes del tema en nuestro grupo de investigación

En nuestro grupo de investigación, el estudio del antígeno tumoral Tn comienza con el desarrollo y caracterización del anticuerpo monoclonal murino IgM 83D4. El mismo fue producido a partir de la inmunización de ratones con suspensiones celulares obtenidas de secciones de tejido de carcinoma de mama, fijados en formol e incluidos en bloques de parafina con el fin de generar marcadores útiles en inmunopatología (Pancino et al., 1990). En ensayos *in vitro*, el anticuerpo 83D4 mostró reactividad con tejido mamario tumoral pero no con el tejido no tumoral. Luego se identificó el epítipo como una glicoproteína de alto peso molecular (>400kDa) heterogénea, que corresponde al antígeno Tn (GalNAc α -O-Ser/Thr).

Mediante el estudio de reconocimiento de 83D4 con diferentes glicopéptidos por BIAcore, se evidenció que el reconocimiento por el antígeno es diferencial, no reconociendo glicopéptidos mono-Tn, mientras que es muy reactivo con glicopéptidos en *clusters* de dos o tres antígenos Tn consecutivos (Osinaga et al, 2000). Particularmente las constantes de asociación de los motivos tri-Tn en conformación

Serina-Treonina-Treonina (S-T-T KD = $1,0 \times 10^{-9} \text{M}$) así como tres Treoninas consecutivas (T-T-T DK= $9,9 \times 10^{-9} \text{M}$) o Tn en tres Serinas consecutivas (S-S-S KD= $2,0 \times 10^{-9} \text{M}$) fueron determinadas (Mazal et al., 2013).

El anticuerpo 83D4 es un excelente marcador de malignidad en estudios inmunocitoquímicos en líquido pleural y de ascitis, ya que identifica las células de carcinoma sin ser reactivo con las mesoteliales (Beuzelin-Yvraut, Bourguignat, Phillips, Roseto, & Osinaga, 1995; Osinaga et al., 1992). El antígeno Tn es una estructura altamente específica asociada al cáncer, que se expresa en aproximadamente el 90% de los carcinomas humanos (Springer, 1984).

Dada la especificidad que presenta el anticuerpo 83D4, el mismo se presenta como una potencial herramienta para el diagnóstico y/o terapia del cáncer. Sin embargo, su peso molecular elevado impide que tenga una adecuada cinética y biodistribución, por lo que se construyó un fragmento de anticuerpo scFv a partir de la región variable del 83D4.

Dicho fragmento de anticuerpo fue expresado en *E. coli* con la proteína de fusión MBP, y capaz de retener la especificidad del 83D4 (Babino et al., 1997). Sin embargo, su bajo peso molecular y su naturaleza monovalente derivó en una menor afinidad, además de un bajo nivel de retención y rápida eliminación limita los niveles de exposición del scFv a las células tumorales.

Por esta razón, se realizó un clonado molecular y expresión de un anticuerpo quimérico conteniendo la región variable VH y Vk del 83D4 y la región constante de una IgG1 humana. El mismo fue expresado en la línea celular murina X-63, las cuales fueron transfectadas con posterior obtención de clones estables. Este anticuerpo quimérico anti-Tn (Chi-Tn) retuvo la capacidad de unión al antígeno, así como la habilidad de su región Fc de activar el sistema del complemento humano (Pablo Oppezzo et al., 2000). El anticuerpo Chi-Tn reconoce y media la muerte de células tumorales mamarias *in vivo*, con 90% de respuestas curativas cuando se asocia con ciclofosfamida (Hubert et al., 2011). En búsqueda de mejorar el potencial anti-tumoral del anticuerpo Chi-Tn, se desarrolló una inmunotoxina conjugando el anticuerpo a la auristatina F. Esta molécula mostró fuerte actividad anti-tumoral en diferentes modelos celulares *in vitro*. así como en tumores de melanoma humano desarrollados *in vivo* en ratones *nude* (Sedlik et al., 2016).

Posteriormente, se diseñó un Diabody anti-Tn a partir de la secuencia de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 83D4, el cual se expresó de forma recombinante en sistemas procariotas y eucariotas. Para este constructo se clonaron los dominios

variables en una orientación VH-VL, en *E. coli* utilizando diversas estrategias e expresión y purificación, así como en células de *Drosophila melanogaster* S2. El Diabody-Tn logró reconocer de forma específica el antígeno en modelos *in vitro*. Sin embargo, la expresión de la proteína recombinante fue en cuerpos de inclusión en los sistemas procariontes, y aunque se probaron métodos de re-folding o expresiones a bajas temperaturas, los rendimientos de la proteína soluble fueron bajos.

La expresión en sistemas eucariotas, más específicamente en células S2 de *Drosophila*, fue el método que presentó mejor rendimiento de proteína pura por litro de cultivo. A su vez, el Diabody anti-Tn presentó una baja afinidad por el antígeno, donde varias moléculas tendrían que interactuar de forma cooperativa para poder retener la molécula de aOSM y así generar una señal detectable por ELISA indirecto. Mediante BIAcore utilizando glicopéptidos sintéticos como fuente de antígeno Tn, se observó que si bien hay reconocimiento específico, la interacción presentó una elevada constante de disociación en comparación con el anticuerpo Chi-Tn (Schvartzman, 2015).

Objetivo

Diseñar, producir y caracterizar un minibody anti-Tn como herramienta biotecnológica aplicable a imagenología molecular del cáncer.

Objetivos específicos

1. Diseño de minibodies anti-Tn recombinantes
2. Evaluación de sistemas de expresión procariotas y eucariotas.
3. Caracterización proteica de los minibodies.
4. Determinación de la funcionalidad *in vitro* del minibody seleccionado.
5. Evaluación del minibody seleccionado en estudios imagenológicos mediante inmuno-PET en modelos de cáncer de pulmón.

Materiales y métodos

Antígeno Tn

Se utilizó como fuente de antígeno Tn la forma desialilada de la mucina submaxilar ovina (OSM), que contiene predominantemente al antígeno Sialil-Tn expuesto. Fue preparada por tratamiento con 0.01N de HCl a 80°C durante 1 hora luego de la cual se neutralizó el pH con NaOH 1.0N y la fracción insoluble fue separada mediante centrifugación 5 minutos a 14.000g.

Anticuerpo monoclonal Chi-Tn

El Chi-Tn es un anticuerpo quimérico ratón/humano del isotipo IgG1k, el cual consiste en el fragmento genómico que codifica para las regiones variables VH and VL del anticuerpo monoclonal murino IgMk -83D4 y las regiones constantes de un IgG1 humano. El Chi-Tn fue producido en células de mieloma murino X-63 (Oppezco, 2000). Este anticuerpo reconoce específicamente al antígeno Tn en *clusters* y fue utilizado como testigo positivo de los ensayos.

Líneas celulares

Las líneas celulares de origen humano MCF-7 (carcinoma mamario), A549 (adenocarcinoma pulmonar de pulmón de células no pequeñas), HCT116 (carcinoma colo-rectal), y H838 (adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas) fueron adquiridas en *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células fueron cultivadas en DMEM suplementados con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), en estufa a 37°C en presencia de 5% de CO₂.

Secuencia

El diseño del minibody anti-Tn se generó a partir de las secuencias del anticuerpo monoclonal murino 83D4, y de la inmunoglobulina humana IgG1 (fig. 16). La secuencia de los dominios variables de la cadena pesada VH (GenBank: AF201962.1) y de la cadena liviana VL (GenBank: AF201961.1) corresponden al anticuerpo 83D4.

Se consideró el ADN que codifica para la región bisagra-CH3 de la inmunoglobulina IgG-1 humana. La secuencia del *linker* fue de 18 aminoácidos según el trabajo previo de Kim y colaboradores (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) (Kim et al., 2014), y la secuencia de la

región bisagra (hinge) fue de 25 aminoácidos con una región flexible rica en glicinas adaptado de los trabajos previos de Kim y Klement (LEPKSCDKTHTCPPCGGGSSGGGSG) (Kim et al., 2014; Klement et al., 2015). El ADN fue generado en Genescript en el vector comercial pUC57.

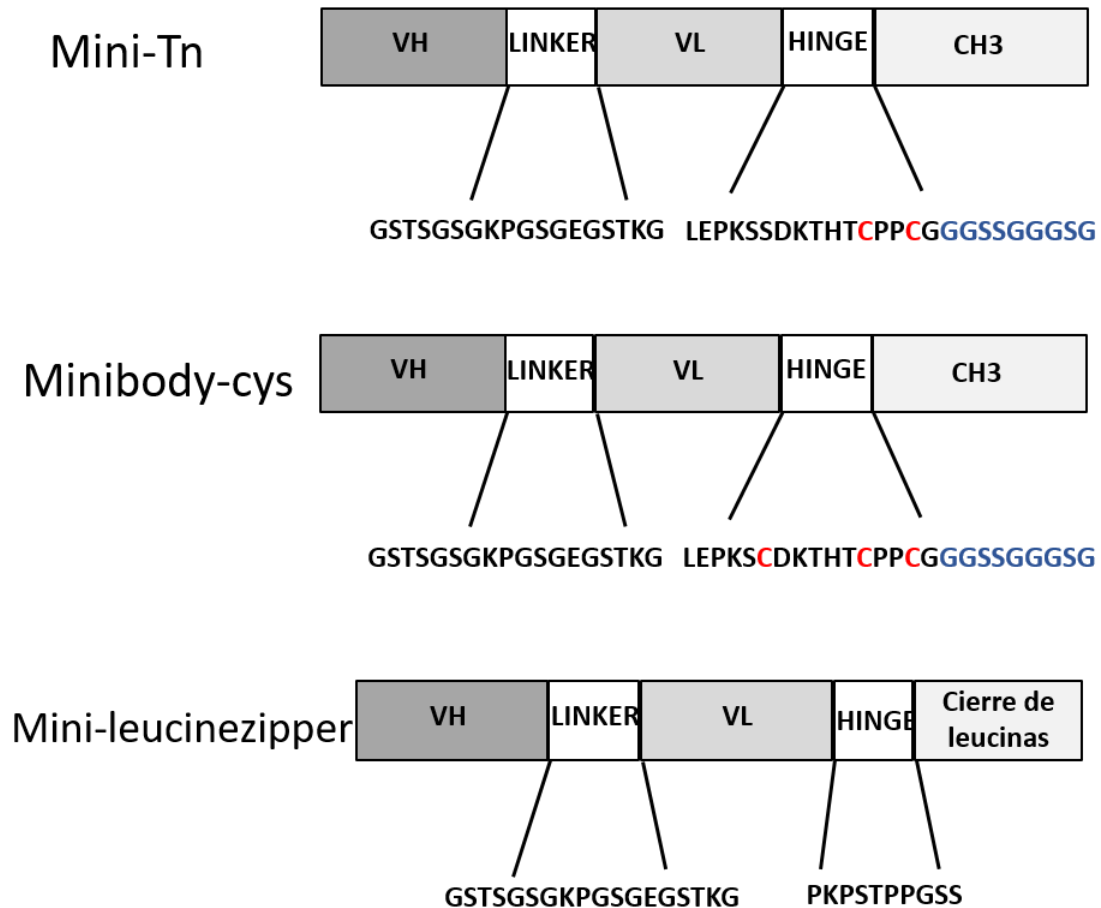


Figura 16. Esquema representativo de los constructos.

Clonado del minibody en diferentes vectores de expresión

Para el clonado del minibody en diferentes vectores de expresión por *Restriction-Free cloning* (RF), primero se generó un megaprimero, conteniendo al gen de interés y en ambos extremos secuencias complementarias al sitio de inserción de los diferentes vectores.

La estrategia de RF se basa en sustituir un gen por otro en una posición determinada (Unger, Jacobovitch, Dantes, Bernheim, & Peleg, 2010). Esta metodología comprende dos rondas de amplificación por PCR; una para la síntesis del megaprimero en la cual se

amplifica el gen de interés flanqueado con secuencias pertenecientes al sitio de clonado en el plásmido de expresión. En la segunda ronda se emplea el megaprimer purificado y como molde el plásmido de interés (tabla 2 y 3).

Para la amplificación del fragmento de ADN, se sintetizaron dos oligonucleótidos, el MiniFor, el cual tiene complementariedad con el sitio de clivado para la proteasa TEV y con parte del dominio VH del minibody, y el MiniRev el cual tiene complementariedad con parte del dominio CH3 del minibody, un codón stop y complementariedad con parte de la secuencia strep-tagII.

MiniFor:

GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCCAGGTCCAACACTGCAACAATCGGATGC

MiniRev:

CTGCGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCCTTATTTACCCGGTGACAGGGACAGGC

Tabla 2. Protocolo del clonado del minibody mediante RF

| Reactivos | Volumen |
|------------------------------------|--------------|
| ADN molde 80ng/μl | 0,5 μl |
| Primer MiniFor 10mM | 2 μl |
| Primer MiniRev 10mM | 2 μl |
| Buffer HF 5X | 10 μl |
| dNTP | 1 μl |
| ADN polimerasa Phusion (Finnzymes) | 1 μl |
| Agua mQ | 33,5 μl |
| Volumen total | 50 μl |

| Temperatura | Tiempo | ciclos |
|--------------------|--------|--------|
| 98°C | 30'' | 1 |
| 98°C | 10'' | 30 |
| 60°C | 25'' | |
| 72°C | 35'' | |
| 72°C | 3' | 1 |

Con el producto de PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1,5%, durante 30 minutos a 120 mA. La banda correspondiente al megaprimer, con un peso molecular de 1100 pb, fue purificada del gel mediante el Kit Nucleospin Gel and PCR Clean up. La muestra fue cuantificada por Nanodrop.

Sistemas de expresión procariota

Clonado del minibody en vectores pT7

Para la expresión del minibody en cepas de *E. coli*, se realizó el clonado en diferentes vectores de expresión. Los vectores fueron cedidos por la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo. Los mismos contaban con un promotor T7, resistencia a la ampicilina, y diferentes proteínas de fusión según el esquema (fig. 17).

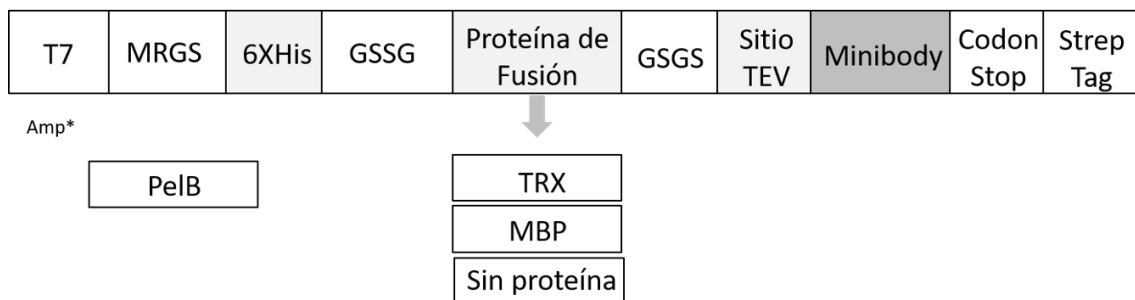


Figura 17. Esquema representativo del vector de expresión para *E. coli*. El vector cuenta con un promotor T7, resistencia a la ampicilina, sitio de clivado para la proteasa TEV, secuencia de 6 histidinas (HisTag), y las diferentes proteínas de fusión evaluadas en este trabajo (TRX, MBP) así como el péptido señal pelB.

Se clonaron 4 vectores: dos con proteínas de fusión, uno sin proteína de fusión y uno con el péptido señal pelB. Las proteínas de fusión fueron: MBP y TRX (fig. 17).

Tabla 3. Protocolo del clonado del minibody en diferentes vectores de expresión

| Reactivos | Volumen |
|------------------------------------|--------------|
| vector | 40 ng |
| megaprimer | 200 ng |
| Buffer GC 5X | 10 µl |
| dNTP | 1,5 µl |
| ADN polimerasa Phusion (Finnzymes) | 1 µl |
| Agua | c.s. |
| Volumen total | 50 µl |

| Temperatura | Tiempo | ciclos |
|--------------------|--------|--------|
| 98°C | 3´ | 1 |
| 98°C | 20´´ | 35 |
| 60°C | 1´ | |
| 72°C | 4´ | |
| 72°C | 10´ | 1 |

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima Dpn1 (*New England BioLabs*) con el fin de digerir el ADN parental (aquellos vectores que no hayan recibido el inserto) (tabla 4).

Tabla 4. Protocolo de digestión del ADN con enzima DPN1

| Reactivo | Volumen |
|-----------------|---------|
| Producto de PCR | 44 µl |
| 10X NEBuffer | 5 µl |
| DPN1 | 1 µl |

| Temperatura | Tiempo | ciclos |
|-------------|--------|--------|
| 37°C | 15´ | 1 |
| 80°C | 20´ | 1 |
| 6°C | 5´ | 1 |

Los productos de la digestión fueron purificados mediante el Kit *Nucleospin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel), siguiendo indicaciones del fabricante. El ADN purificado fue eluído en 15 µl de agua mQ.

Selección de colonias

Los productos de la digestión con Dpn1 fueron utilizados para la transformación de bacterias competentes que circularizan y amplifican el plásmido. Se transformaron células de *E. coli* XL1 *Blue* en una cuba de electroporación, donde se añadieron 50 µl de células + 4 µl de ADN. La electroporación fue a 500 mV, 1 pulso de 0,08 segundos. Las células fueron crecidas durante 1 hora a 37°C con agitación, y luego sembradas en placas de LB/Amp y conservadas a 37°C durante 18 horas. Cada placa correspondía a un vector con una proteína de fusión, o sin fusión. Las colonias fueron analizadas por PCR para verificar la presencia del inserto (tabla 5).

Tabla 5. Protocolo de PCR de colonias para verificación de inserto.

| Reactivos | Volumen |
|------------------------------------|--------------|
| ADN molde | colonia |
| Primer MiniFor 10mM | 0,8 µl |
| Primer MiniRev 10mM | 0,8 µl |
| Buffer GC 5X | 4 µl |
| dNTP | 0,5 µl |
| ADN polimerasa Phusion (Finnzymes) | 0,5 µl |
| Agua mQ | 13 µl |
| Volumen total | 20 µl |

| Temperatura | Tiempo | ciclos |
|-------------|--------|--------|
| 98°C | 40'' | 1 |
| 98°C | 10'' | 26 |
| 69°C | 30'' | |
| 72°C | 30'' | |
| 72°C | 4' | 1 |

Con los productos de PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1,5%, durante 30 minutos a 120 mA. Las colonias que fueron positivas para el inserto fueron crecidas durante toda la noche en 3ml de medio LB/Amp. Luego, el ADN fue purificado del cultivo mediante el Kit *Nucleospin Plasmid clean-up* (Macherey-Nagel), y cuantificado por Nanodrop. Los productos purificados fueron secuenciados para verificar la secuencia del minibody en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur.

Generación de mutaciones en la secuencia del minibody

Se realizaron dos cambios a la secuencia original del minibody, con la finalidad de favorecer una conformación adecuada de la molécula. La primera modificación consistió en sustituir la región CH3 del minibody por una secuencia de leucinas que adquieren la conformación de *leucine zipper*, dos alfa hélices anfipáticas paralelas, que interactúan entre sí. Además, se cambió el largo del *hinge*, haciéndolo más corto (sin la región flexible rica en glicinas). Esto favorecería la dimerización proteica y generaría dímeros estables (Klement, 2015; Busch, 2002). Esta molécula será nombrada de ahora en más como **minileucine-zipper** (fig. 18).

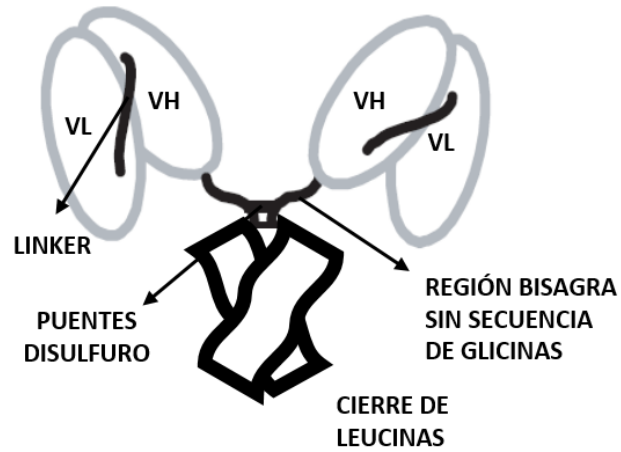


Figura 18. Esquema de la estructura de la proteína recombinante minileucine-zipper.

La segunda modificación consistió en una mutación puntual, cambiando una Serina por Cisteína en la región del *hinge* (Yan et al., 2011). Esto genera un puente disulfuro adicional, quedando un total de 3 puentes disulfuro en el hinge, con el objetivo de favorecer la dimerización. Esta molécula será nombrada de ahora en más como **minibody-cys** (fig. 19).

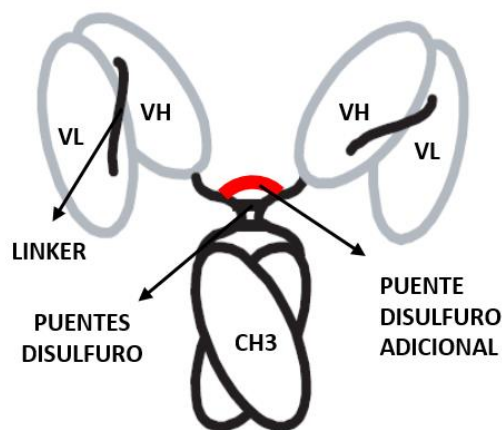


Figura 19. Esquema de la estructura de la proteína recombinante minibody-cys.

Generación del minileucine-zipper

Para la modificación de la región hinge-CH3 se adquirió de forma comercial la secuencia de hinge-leucine zipper según Klement et. al. La secuencia del *linker*, y de los dominios VH y VL no fueron modificados. La secuencia del *hinge* fue de 10 aminoácidos sin la región flexible rica en glicinas (PKPSTPPGSS) (Klement et al., 2015). El ADN fue generado en Genescript en el vector comercial pUC57. Se diseñaron dos oligos para generar un nuevo megaprimer:

Primer For (minileucine-zipper):

CGTTTGGCGGTGGCACCAAACCTGGAAATTAAACC

Primer Rev (strep):

GAAGTGCAGGGTGGCTCCAGCTGCCGGATCC

Una vez adquirido el ADN, el procedimiento de generar un megaprimer y el clonado de los vectores fue realizado como fue citado previamente. El clonado fue realizado usando como ADN molde, los vectores que ya contaban con la secuencia del minibody, produciendo así una sustitución de una secuencia por otra. Los vectores clonados para expresión en *E. coli* derivados del pET32a fueron los que contenían las proteínas de fusión: TRX, MBP y el péptido señal pelB.

Generación del minibody-cys

Para la modificación de una serina por cisteína en la región del hinge, se diseñó un primer (cys rev) y se generó un megaprimer mediante PCR, utilizando como primer forward el miniFor, según protocolo previamente citado.

Primer cys rev:

GGCGGGCACGTGTGGGTTTTGTCCGCaCGATTTCCGGTTCCAGTTTAATTC

MiniFor:

GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCCAGGTCCAACCTGCAACAATCGGATGC

Este megaprimer fue clonado en el vector para expresión en *E. coli* pET32a con fusión a MBP, siguiendo el procedimiento ya citado.

Expresión del minibody en *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* analizadas para la expresión del minibody fueron: Shuffle pMJS9, BL21, y Rossetta.

Cepa Shuffle pMJS9

Esta cepa presenta mutaciones en tioredoxin reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*) y expresa la chaperona de enlaces disulfuro DsbC de forma constitutiva, siendo una cepa optimizada para la expresión citoplasmática de proteínas con enlaces disulfuro. El vector pMJS9 presenta la resistencia al antibiótico cloranfenicol y tiene clonados de forma policistónica las enzimas Erv1P y DsbC bajo control del promotor inducible por arabinosa pBAD. Erv1P es una sulfhidril oxidasa de *S. cerevisiae* que se encarga de la catálisis “de novo” de enlaces disulfuro, mientras que DsbC es una isomerasa de *E. coli*. De esta forma, la pre-expresión de estas enzimas proporciona una herramienta para la síntesis de proteínas con enlaces disulfuro en el citoplasma de la célula.

Las células fueron electro-transformadas, y crecidas durante 18 horas en 20 ml de medio 2YT/Amp a 37°C con agitación. Se pasaron los 20 ml del cultivo a 800 ml de medio 2YT/Amp/Cloranfenicol, e incubadas a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una DO ~ 0,6. El cultivo fue mantenido durante 30 minutos a 30°C con agitación. Luego se agregaron 20 ml de Arabinosa al 20% y se incubó el cultivo durante 30 minutos a 30°C con agitación (pre-inducción). Se agregaron 160µl de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M, como agente inductor. La inducción fue durante 24 horas a 20°C con agitación. Para esta cepa, se utilizaron los vectores con las proteínas de fusión: TRX y MBP, además del vector sin proteína de fusión.

Cepa BL21(DE3)

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

Las células fueron quimio-transformadas, y crecidas durante 18 horas en 20 ml de medio 2YT/Amp a 37°C con agitación. Se transfirieron los 20 ml del cultivo a 1L de medio M9/Amp suplementado con 5µg/ml de vitamina B1, 0,4% de casaminoácidos, 0,1% de

MgCl₂ 1M, 0,01% de CaCl₂ 1M, y 10 ml de glucosa al 20%. Se incubó a 25°C durante 30 horas. Luego se agregaron 100 ml de medio de inducción (Bacto-tryptone/ Bacto-Yeast extract/glicerol) y 100 µl de IPTG 1M. Se incubó durante 60 horas a 25°C (Baral & Arbabi-Ghahroudi, 2012). En esta cepa se utilizó para expresar el vector con el péptido señal pelB para expresión periplasmática.

Cepa Rossetta

Rossetta es una cepa derivada de BL21, diseñada para potenciar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones poco frecuentes para *E. coli*. Las células fueron quimio-transformadas, y crecidas durante 18 horas en 20 ml de medio 2YT/Amp a 37°C con agitación. Se pasaron los 20 ml del cultivo a 800 ml de medio 2YT/Amp, e incubadas a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una DO ~ 0,8. Se agregaron 800 µl de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M, como agente inductor. La inducción fue durante 18 horas a 20°C con agitación. Para esta cepa, se utilizó el vector con la proteína de fusión TRX, y el vector sin proteína de fusión para la expresión del minibody.

Evaluación de la expresión proteica citoplasmática

La expresión citoplasmática del minibody fue evaluada en las cepas Rossetta y Shuffle pMSJ9. Luego de la inducción, se recuperaron las bacterias por centrifugación del medio durante 20 minutos a 4000 g y a 4°C. El pellet fue resuspendido en *buffer* Tris-HCl 50 mM NaCl 500 mM, Imidazol 40 mM pH 8 conteniendo inhibidor de proteasas (Roche), DNAasa1 (1µg/ml) (Sigma), y lisozima 1mg/ml, y se congeló a -80°C durante 18 horas. Luego, el pellet fue descongelado, sonificado con macrotip (4 pulsos de 20 segundos, consistiendo cada pulso en 2 segundos a 45% de amplitud y 1 segundo de descanso en hielo), y centrifugado a 15000 g, a 4°C durante 40 minutos de forma de separar la fracción soluble de la insoluble. La fracción soluble (sobrenadante) fue filtrada por 0,22 µm y fue purificada mediante cromatografía de afinidad IMAC (ver apartado imac).

Evaluación de la expresión proteica periplasmática

La cepa que se utilizó para evaluar la expresión periplasmática fue BL21 (DE3) con el plásmido de expresión que contenía el péptido señal pelB. Luego de la inducción, se recuperaron las bacterias por centrifugación del medio durante 20 minutos a 4000 g y a

4°C. El pellet fue resuspendido en 150 ml de *buffer* de lavado (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM, pH 8), y centrifugado a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C. Al pellet se le realizó un shock osmótico para la extracción de la fracción periplasmática, al ser resuspendido en *buffer* sacarosa (TRIS-HCl 10mM, 25% de sacarosa, EDTA 1mM, pH 8) e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugo a 14.000 g durante 25 minutos a 4°C. Se conservó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en la solución de shock fría (Buffer Tris-Hcl 10 mM pH 8, 0.5 mM MgCl₂) y se incubo en hielo durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugó durante 25 minutos a 14.000 g y a 4°C y se conservó el sobrenadante conteniendo la fracción periplasmática. La misma fue dializada contra el *Binding Buffer* (Tris-HCl 50 mM NaCl 500 mM, Imidazol 40 mM pH 8) durante toda la noche para luego ser purificada por cromatografía de afinidad IMAC.

Sistemas de expresión eucariota

Clonado del minibody en el vector pCMV-GFP-Fc

El vector de expresión pCMV fue facilitado por el Laboratorio de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo. El clonado del minibody en el vector siguió el mismo protocolo citado previamente. El mismo cuenta con una fusión Fc (dominio CH2 y CH3 de la cadena pesada de la IgG1h), con el objetivo de obtener mayores niveles de expresión de la proteína recombinante (Lo et al., 1998). Células *E. coli* electro-competentes fueron transformadas con el vector purificado mediante Kit Nucleospin y se realizó un cultivo de 50 ml de medio LB/Amp. Se realizó una segunda purificación utilizando el QIAGEN Plasmid Purification Midi Kit para obtener mayores cantidades de ADN. La purificación se realizó según indicaciones del fabricante.

Clonado del minibody en el vector pDroext

El vector de expresión pDroext fue facilitado por el Laboratorio de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo. Este plásmido fue diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en células S2 a partir del plásmido derivado del pMT (Invitrogen). El mismo está compuesto por un promotor de metalotioneina (pMT de *Drosophila*), el cual permite la inducción de la expresión proteica con el agregado de metales divalentes, contiene además una señal de exportación BiP

(péptido señal perteneciente a *D. melanogaster*) para la traslocación de la proteína recombinante.

Finalmente, el plásmido pDroext contiene un doble strep-tag (twin-strept-ag) que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad seguido de un sitio de clivaje para la proteasa TEV. El plásmido contiene las secuencias necesarias para su amplificación en bacterias, con resistencia a Ampicilina. El mismo fue amplificado, purificado y cuantificado para el posterior sub-clonado con las construcciones del minibody de forma análoga a las descritas en los apartados anteriores. Como vector de selección de clones transfectados se utilizó el vector pCoPuro (Invitrogen) que codifica para la resistencia al antibiótico Puromicina. El sub-clonado de la secuencia del minibody en el plásmido pDroext se realizó por RF-cloning como fue descrito anteriormente.

Expresión del minibody en células HEK293T

Las células HEK293T son fibroblastos de riñón embrionario humano. Las mismas fueron cultivadas en medio DMEM, 8% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico Penstrep (PS), a 37°C y 5% de CO₂. Para la expresión del minibody en estas células se realizó una transfección transitoria. Para ello, los cultivos fueron adaptados a un medio DMEM con 5% de SFB (típicamente dos cambios de medio). La transfección se realizó con cultivos a un 80% de confluencia. Se preparó el mix de transfección ADN:Polietilenimina (PEI) en la condición 1:10, y 1:20. El mix de transfección se preparó en tubos de polystyrol, diluyendo el PEI en Optimem. Se incubó el mix a temperatura ambiente durante 30 minutos (formación de complejos PEI-ADN). Posteriormente, se dispersó el mix sobre el cultivo celular. Se contaba también con un control sin transfectar. Se realizó el primer cambio de medio a las 16 horas post-transfección, y se tomaron muestras del sobrenadante cada día durante 10 días para test de ELISA. A su vez, se realizaron cambios de medio cada día, conservando el sobrenadante a -20°C con previa centrifugación a 2000 rpm.

Expresión del minibody en células S2 de *Drosophila melanogaster*

Las células S2 son derivadas de un cultivo primario de embriones de *Drosophila melanogaster*. Estas células crecen a 28°C sin CO₂ tanto en frascos formando una mono-capa semi-adherente, como en matraces con agitación creciendo en suspensión.

Para la expresión del minibody, las células S2 fueron descongeladas en medio Schneider conteniendo penicilina-estreptomicina y suplementado con Suero Fetal Bovino inactivado al 10% (Gibco) y 1/5 de medio condicionado (medio recuperado del cultivo luego de centrifugar el mismo). Las células se sub-cultivaron cada vez que la densidad celular alcanzo 10-20x10⁶ células/mL.

Generación de una línea celular policlonal estable S2-minibody

Las células S2 fueron sembradas a una densidad de 6x10⁶ células por botella T25. Se prepararon dos condiciones, una para el minibody, y otra como un control sin transfectar (como control del antibiótico de selección). Las co-transfecciones se realizaron con 2 µg de la construcción pT350-Minibody junto con el plásmido de selección pCoPuro en una relación 20:1 usando el kit comercial de transfección Effectene (Quiagen) según indicaciones del fabricante.

Luego de 24 hs de cultivo se removió completamente el medio de transfección y se agregó medio de cultivo Schneider nuevo suplementado con SFB 10% y medio condicionado de las S2 parentales. Luego de 72 hs de la transfección se inició el proceso de selección mediante la adición de Puromicina (concentración final de 6 µg/mL) en las células transfectadas y control. El cambio de medio se realizó cada 5 días y dos semanas luego de la transfección se inició la adaptación de las células S2 a medio de cultivo libre de proteína (Insect Xpress medium, Lonza). Para la propagación celular se comenzó con botellas T25, luego botellas T75, y finalmente botellas T150. En las T150 las células se mantuvieron hasta el inicio de los cultivos de alta densidad para la posterior inducción y expresión proteica

Para la inducción, se realizó una puesta a punto de la concentración de inductor. Se prepararon 3 placas con 3 ml de cultivo a una densidad de 5x10⁶ células/ml. Se probaron dos concentraciones de inductor (5 y 10 µM CdCl₂) y un control sin inducir. Se fueron retirando alícuotas del sobrenadante a los días 3, 6 y 10 luego de la inducción para estudios de actividad en test de ELISA y Western Blot.

Una vez elegida la condición de inducción, las células fueron propagadas con alta densidad en medio Insect Xpress con puromicina (6 µg/mL) en frascos matraz de 250 mL a 28°C y 120 rpm. La inducción fue con CdCl₂ 5µM con una densidad celular de 7,5x10⁶ células/mL, durante 6 días a 28°C y 120 rpm.

Purificación de los minibodies

Purificación mediante cromatografía de afinidad IMAC

Las proteínas expresadas en *E. Coli* fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Los sobrenadantes conteniendo las fracciones solubles de las expresiones en citoplasma y periplasma fueron filtrados (0.22 µm) y cargados en columnas HisTrap (GE Healthcare) de 5 ml previamente equilibradas en *Binding Buffer* a un flujo de 1ml/min utilizando una bomba peristáltica P-1 (GE Healthcare).

La columna se conectó posteriormente a un equipo AKTA Purifier (GE Gealthcare) y se lavó con *Binding Buffer* hasta que la absorbancia a 280 nm se estabilizara. La elución se efectuó mediante un paso de 50% de *buffer* de Elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM pH 8). Se colectaron alícuotas de la elución detectada a 280 nm. Luego de la purificación por IMAC, se realizó un corte con la proteasa TEV para clivar el minibody de la proteína de fusión y realizar cambio de *buffer* mediante diálisis, durante toda la noche a 4°C.

Purificación mediante columna de afinidad Proteína A HiTrap

El minibody expresado en las células de HEK 293T fue purificado mediante la columna de afinidad Proteína A HiTrap. El sobrenadante total conservado a -20°C fue descongelado el día de la purificación y centrifugado a 11.000 g durante 40 minutos a 4°C, y posteriormente filtrado con filtros Millipore 0,22µm. El mismo fue diluido al medio con PBS 1X, previamente filtrado, para ser cargado a la columna. Este procedimiento fue realizado durante toda la noche en cámara fría con bomba peristáltica.

Para la purificación se utilizaron 3 buffers:

- PBS 1X
- Buffer B: Citrato de sodio 100 mM pH 4,6- primera elución.
- Buffer C: Citrato de sodio 100 mM pH 3- segunda elución.
- Fosfato dibasico 1M- 100 μ l en la placa para neutralizar el pH.

La columna fue conectada a un equipo AKTA Purifier y se realizó un lavado con PBS 1X hasta que la DO se estabilizó. Luego, se realizó una primera elución con el buffer B pH 4,6 y una segunda elución con el buffer C pH 3. Las fracciones correspondientes a cada elución fueron recolectadas y mantenidas a 4°C.

Purificación mediante cromatografía de afinidad StrepTactin^{XT} Superflow

El minibody expresado en las células S2 de *Drosophila melanogaster* fueron purificadas por cromatografía de afinidad empleando columnas StrepTactin^{XT} (Streptactin Superflow, Iba Life Science) de 5mL. Para eso, el cultivo luego de los seis días de inducción fue centrifugado a 8.000 g durante 20 minutos y a 4°C. Se ajustó a pH 8 el sobrenadante con Tris 1M pH 9, y se agregó un inhibidor de biotina (biotin blocking solution) a 2,4 mL por litro de cultivo.

El sobrenadante fue mantenido a 4°C durante toda la noche. Luego, se centrifugó nuevamente el sobrenadante a 11.000 g- 4°C durante 40 minutos. Se filtró por filtro 0.22 μ m y se volvió a ajustar el pH a 8. Se cargó en la columna previamente equilibrada en *Binding Buffer* (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM pH 8). y se lavó con *Binding Buffer* hasta que la absorbancia a 280nm se estabilizara. La elución se realizó con 5 ml de *Binding Buffer* conteniendo 50 mM de biotina. Luego de la elución, la columna se regenero con 15 ml de NaOH 20mM y luego se equilibró y conservó con *Binding Buffer*.

Las fracciones correspondientes al sobrenadante, fracción no unida, lavados y eluidos se recuperaron y se separaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% y tinción con *Coomasie*. En todas las purificaciones las condiciones fueron: flujo 1mL/min y presión limite columna 0,3 MPa. Luego de la purificación por StrepTactin, se realizó un corte con la proteasa TEV para clivar el minibody del twin-strep-tag mediante diálisis, durante toda la noche a 4°C.

Caracterización de los Minibodies

Cromatografía de exclusión molecular

Para evaluar el estado oligomérico del minibody se realizaron cromatografías de exclusión molecular a nivel analítico utilizando la columna Superdex 200 (10/300) (GE Healthcare) conectada a equipos AKTA. Las columnas fueron equilibradas con *buffer* Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM pH 8 un flujo de 0,5 ml/min y presión máxima de 1,50MPa recomendadas por el fabricante. Se inyectaron 500µl de muestra y se hizo un seguimiento del volumen de retención mediante absorbancia a 280 nm. Los picos de absorbancia fueron comparados con los volúmenes de elución de proteínas estándar para estimar el tamaño molecular o el grado de oligomerización.

Espectrometría de masa

La verificación de la presencia del minibody fue analizada por espectrometría de masa en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo. La proteína fue extraída de geles de poliacrilamida, digeridos con tripsina, purificados y analizados en un equipo MALDI/TOF/TOF. Los péptidos trípticos identificados fueron comparados con digestiones teóricas de la secuencia peptídica de las construcciones, así como comparado con bases de datos publicas utilizando el software MASCOT.

Transferencia y Western Blot

Las proteínas resueltas en los geles de poliacrilamida SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) por transferencia electrónica durante 1 hora a 200 mA. Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con una solución de BSA 3% en PBS 1X. Los lavados se realizaron con PBS 1X/Tween-20 0,1%, durante 5 minutos con agitación (300 rpm). Luego del bloqueo se realizaron 3 lavados y se incubaron los anticuerpos primarios diluidos en PBS 1X, Tween-20, 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de lavar las membranas con PBS 1x-0.1% Tween (5 lavados de 10 min) se incubó con el anticuerpo secundario α - IgGh (Dako) conjugados con peroxidasa a una dilución de 1:4000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados y la membrana fue expuesta a una solución de revelado durante 1min con ECL, 1:1 solución A y B (A: 2.5 mM de luminol (Sigma), 0.4 mM de ácido p-cumárico (Sigma), 100 mM de Tris-HCl pH 8.5; B: 100 mM de Tris-HCl pH 8.5, 0.018 %de H₂O₂) y exposición con películas fotográficas X-Ray film (Agfa) en oscuridad.

Estudios de funcionalidad *in vitro*

Para determinar la capacidad de reconocimiento del minibody-Tn al antígeno Tn, se llevaron a cabo algunos ensayos de funcionalidad. Los estudios de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) y test de ELISA fueron realizados con el antígeno Tn proveniente de la mucina submaxilar ovina (OSM) desialilada. Para observar la funcionalidad del minibody en un contexto celular, se realizaron ensayos de IF-I y citometría de flujo en las líneas celulares MCF-7, A549, H838, y HCT116. Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron en cortes de tumores provenientes de tumores generados en ratones *nude* inoculados con la línea de cáncer de pulmón humano A549, para determinar la funcionalidad del minibody-Tn en un contexto tisular.

Ensayo de SPR

Los biosensores basados en resonancia plasmónica de superficie (SPR por “surface plasmon resonance”) se utilizan para detectar y cuantificar interacciones moleculares. Uno de los interactores (ligando) es inmovilizado en la superficie carboximetilada de un chip, el cual posee una delgada lámina de oro necesaria para que tenga lugar el fenómeno óptico de resonancia plasmónica de superficie, cuando se hace incidir sobre la misma un haz de luz polarizada a un ángulo muy acotado. Por otra parte, el otro interactor (analito) es inyectado a flujo constante sobre dicha superficie y la unión entre ambos es evidenciada como un cambio en el ángulo al cual ocurre dicho fenómeno, el cual es proporcional a la cantidad de moléculas unidas y a su tamaño.

El ensayo fue realizado inmovilizando a través de unión por aminas el antígeno (asialo OSM) (10 µg/ml) diluído en acetato de sodio 10 mM, pH 4, sobre un chip CM5 sensorchip (GE Healthcare), siguiendo instrucciones del proveedor. El minibody-Tn fue inyectado como analito a un flujo de 20 µl/min sobre la superficie con el ligando inmovilizado, utilizando un rango de concentraciones desde 25-700 nM.

El ensayo de SPR fue realizado en la unidad de Biofísica de Proteínas (UBP) del Institut Pasteur de Montevideo en un Biacore 3000 a 25°C en un buffer HEPES 0,01M pH 8,2, NaCl 0,15M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 0,005% v/v. El análisis de los datos fue realizado con el software BIAevaluation (GE Healthcare) y los datos obtenidos luego de sustraer la señal se una inyección de buffer y de una superficie control sin inmovilizar (doble referencia) se ajustaron a un modelo de “Analito Bivalente”.

Test de ELISA

La funcionalidad del minibody fue inicialmente evaluada mediante su capacidad de reconocer al antígeno Tn en el test de ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) con 0.2 µg de asialoOSM por pocillo en *buffer* carbonato (NaHCO₃-Na₂CO₃ 0,05M pH 9,6), durante toda la noche a temperatura ambiente. Los sitios de uniónin específicos se bloquearon con BSA 0,5% en PBS por 1 hora a 37°C. A continuación, se adicionaron diluciones seriadas de las muestras a analizar en *buffer* PBS, Tween-20 0,1%, BSA 0,5% y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubó con anticuerpo anti-IgGh 1/1000 conjugado con peroxidasa (Sigma) en una dilución a temperatura ambiente durante 1 hora. En todos los casos posteriores a cada incubación se realizaron tres lavados con *buffer* PBS Tween 0,1%. La actividad peroxidasa se evidenció con ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzo-tiazolino-6 sulfónico)) y H₂O₂ 30% en Buffer Citrato Fosfato 0,1M pH 5,0. La reacción colorimétrica se desarrolló durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 450 nm en lector de placas. En todos los casos, se utilizó como control positivo del ensayo el anticuerpo quimérico Chi-Tn, y como control negativo se utilizaron pocillos sin anticuerpo primario (minibody y Chi-Tn).

Inmunofluorescencia indirecta (IF-I)

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IF-I) en células tumorales humanas Tn positivas y Tn negativas para el anticuerpo Chi-Tn. Se cultivaron las células MCF-7, HCT116, A549, y H838 al 50% de confluencia en cubreobjetos de vidrio durante toda la noche. Las células fueron fijadas con paraformaldehido (PFA) 4% en PBS 1X a 4°C durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,3% en PBS a 4°C durante 20. Los cubres fueron conservados a -20°C.

Todas las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios se llevaron a cabo en PBS 3% de SFB. Las incubaciones con los anticuerpos primarios fueron de 1 hora con agitación suave, lavando posteriormente 5 veces con PBS; y las incubaciones del anticuerpo secundario fueron de 30 min con agitación suave, lavando después 5 veces con PBS. Se incubó durante 5 minutos con 0,5 µg/ml de DAPI, realizando luego 3 lavados con PBS. A continuación, se procedió al montaje de las preparaciones con medio de montaje Mowiol 4-88 (Sigma).

Ensayo de Citometría de flujo

La actividad del minibody fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando las líneas celulares tumorales humanas, tanto Tn positivas como Tn negativas para el anticuerpo Chi-Tn. Las células fueron fijadas con PFA 4% frío durante al menos 30 minutos, y posteriormente lavadas con PBS. Las células fueron mantenidas durante toda la noche a 4°C en PBS. Para permeabilizar las células se utilizó PBS-SFB 1%-Tween 0,1% con el que se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos con fondo cónico (ThermoFisher). Cada pocillo contaba con 2×10^5 células. Las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm y se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en buffer PBS-SFB 1%-Tween 0,1% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron centrifugadas durante 8 minutos a 2500 rpm y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario, diluido en buffer PBS-SFB 1%-Tween 0,1% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS, y se resuspendieron las células en 300 μ l de PBS para proceder al análisis por citometría de flujo.

Ensayo de inmuno-histoquímica

Para los ensayos de inmuno-histoquímica se contó con cortes histológicos brindados por la Dra. Cecilia Silva (Cátedra de Anatomía Patológica de Facultad de Medicina). Los mismos provenían de tumores generados con líneas celulares humanas en ratones *nude*. Las láminas contaban con cortes en parafina, de manera que se procedió en primer lugar con el deparafinado. Para ello, se realizaron tres lavados de 5 minutos con el solvente xilol, luego tres lavados de 5 minutos con etanol 95%, un lavado de 5 minutos con agua destilada, y por último un lavado de 5 minutos con tampón de lavado (TBST) (0,05 mol/L Tris-HCl, 0,15 mol/L NaCl, 0,05% Tween 20, a pH=7,5). Posterior al deparafinado se realizó un bloqueo con H₂O₂ al 3% durante 20 minutos, luego de los cuales se realizaron dos lavados con TBST durante 5 minutos. Se procedió con el bloqueo de sitios específicos con suero de cabra 30% en solución diluyente de anticuerpos (Tris 50 mM, BSA 1%, pH= 7,5) durante 20 minutos.

Como consiguiente se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios, diluidos en la solución diluyente de anticuerpos, durante 1 hora. Se probaron distintas diluciones de minibody y del quimérico ChiTn. Luego se realizaron 3 lavados con TBST y los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario en una dilución de 1/150. Para el revelado se utilizó un cromógeno-sustrato el cual fue incubado durante 5-10 minutos o hasta que se observaran cambios en la tinción de los cortes. Se realizó 1 lavado con agua destilada y se incubó con hematoxilina durante 5 minutos. Finalmente, se realizó

un lavado con agua corriente durante 15 minutos, 10 inmersiones en amonio 37 mM, y un último lavado con agua destilada durante 5 minutos. Para el montado de las láminas se procedió con 2 lavados de 5 minutos con etanol 95%, 1 lavado de 5 minutos con xilol. El montado se realizó con bálsamo Mowiol. Todo el procedimiento fue realizado a temperatura ambiente.

Estudios de funcionalidad *in vivo*

Animales

Para los ensayos *in vivo*, se utilizaron ratones *nude*, proporcionados por el bioterio central de Medicina Nuclear de FMUSP (Facultad de Medicina, Universidad de San Pablo) y mantenidos allí. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la FMUSP (FMUSP 056/15).

Antes de realizar los procedimientos experimentales, los animales fueron aclimatados por ≥ 7 días, y mantenían acceso ilimitado a comida y agua. Cada caja contenía 5 ó 6 animales, en un ambiente controlado a 22 ± 2 °C, humedad de 55 ± 5 %, y ciclos de 12 horas de oscuridad/luz.

Bio-conjugación del Chi-Tn y Minibody DFO-Bn-NCS y ^{89}Zr radio-marcado

La bio-conjugación se realizó según el protocolo descrito previamente (Vosjan et al., 2010) con las siguientes modificaciones: se utilizaron 500 μl de solución de anticuerpo (2,2 mg/ml), y se llevó a un volumen de 900 μl utilizando PBS. Se ajustó el pH a 8,9-9,1 con 0,1 M Na_2CO_3 . Se agregaron 20 μl de solución fresca de DFO-Bn-NCS en DMSO a una concentración de 0,2 mg/ml a la solución de anticuerpo. Se incubó durante 2 horas a 37°C en termo-agitador a 500 rpm.

Luego de la incubación, la solución fue filtrada en filtro Amicon 10 kDa, y lavada 2 veces en PBS 0,1 M, y extraída en PBS 0,01 M. Para el minibody, se realizó el mismo procedimiento, a excepción de que se utilizó 500 μl de minibody (4,63 mg/ml), y 20 μl de Df-Bn-NCS (1 mg/ml).

A la solución de ^{89}Zr (100 μL ~ 18,5 MBq) se agregaron 100 μl de ácido oxálico 1 M, y 3x30 μl de solución de Na_2CO_3 2 M, y se incubó a 22-25°C durante 3 minutos. Luego, se agregaron 300 μl de HEPES 0,5 M a pH 7,2, seguido de 100 μl de la solución DFO-ChiTn (250 μg) ó DFO-minibody (100 μg), y finalmente 700 μl de HEPES 0,5 M.

La solución fue incubada durante 1 hora con agitación y a 30°C. Las muestras fueron luego concentradas utilizando filtros de 10 kDa. El rendimiento del radio-marcado fue evaluado utilizando ITLS-SG con 50mM de DTPA (pH 7) como fase móvil, y ITLC-SG pre-saturada con BSA y EtOH: NH₄OH: H₂O (2:1:5) como fase móvil. Las secciones de las bandas fueron contadas utilizando un contador gamma automático.

Captación tumoral en imagenología *in vivo* de ratones nude

Las células de cáncer de pulmón humano A549, fueron cultivadas en medio de cultivo Ham F12, con 10% de suero fetal bovino, a 37°C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células fueron desprendidas al alcanzar el 80% de confluencia, y suspendidas en PBS a una concentración de 2.5x10⁷ células/ml.

Se inocularon 100 µl de la suspensión de células en el flanco inferior izquierdo de ratones *nude* machos anestesiados, con un peso de entre 24-27 gr, y se esperaron entre 30-40 días. Cuando los tumores alcanzaron los 0.4-0.6 mm³, se inyectaron 3,4-3,9 MBq de ⁸⁹Zr-DFO-Chi-Tn en la vena de la cola, y luego se tomaron imágenes de los animales a 24, 48, y 63 horas post-inyección, mientras que para ⁸⁹Zr-DFO-minibody se inyectaron 1.4 MBq, y se tomaron imágenes a las 2, y 18 horas post-inyección.

Para la obtención de imágenes, los animales fueron anestesiados con Isoflurane® al 3% en oxígeno 100%, y fueron posicionados con la región del tumor en el centro del campo de visión del scanner pequeño para animales PET (Triumph™ - Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, U.S.A). Los sinogramas de emisión fueron reconstruidos interactivamente en un único marco de tiempo de 30 minutos (OSEM 3D; 20 interacciones y 4 sub-sets), luego de ser corregidas en atenuación, dispersión y decaimiento radiactivo.

El análisis de las imágenes de PET fue realizado con PMOD 3.4 software (PMOD™ Technologies Ltd, Switzerland), donde se dibujaron volúmenes de interés (VOI) sobre el tumor y la región muscular contralateral, utilizando las imágenes de CT como referencia. Los valores promedio y máximos obtenidos en los VOI fueron usados para determinar la proporción de captación no específica del tumor.

Biodistribución *ex vivo* en ratones *nude*

Luego de la última toma de imágenes, los animales fueron sacrificados bajo anestesia. Los órganos (cerebro, tiroides, pulmones, corazón, riñones, estómago, vejiga, hígado, intestino grueso, intestino delgado, y bazo), fluidos (sangre y orina) y tejidos (muscular, óseo, y tumoral) fueron disecados, pesados, y se midió la radioactividad en un contador

gamma. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g).

Auto-radiografía

Los tumores de los animales sacrificados fueron extirpados, sumergidos en compuesto OCT Tissue-Plus (Scigen, Gardena, CA), y conservados a -20°C. Se cortaron series de 30 µm y fueron montaron en porta-objetos y expuestos a placas *phosphor-imaging* (BASMS-2325; Fujifilm, Tokyo, Japan) durante 3 horas a 21-25°C. Luego, fueron leídos en un lector de placas Typhoon 7000IP (GE Healthcare, Chicago, IL) a una resolución de 25 µm pixeles.

Resultados

Expresión de los minibodies

El primer objetivo de este trabajo consistió en la obtención de formas recombinantes del fragmento de anticuerpo Minibody anti-Tn, a partir de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) y la cadena liviana (VL) del anticuerpo monoclonal quimérico Chi-Tn, generado previamente por nuestro grupo de investigación (Oppezzo et al., 2000). El diseño del minibody-Tn consistió en las regiones VH y VL unidas al dominio CH3 de la inmunoglobulina IgG1 humana a través de una región bisagra (hinge), y a su vez, se encuentran unidas entre sí a través de un *linker* de 18 aminoácidos (GSTSGSGKPGSGEGSTKG). Para el clonado del gen que codifica para el minibody, se generó un megaprimer el cual fue clonado en diversos vectores de expresión, incluyendo vectores para expresión en *E. coli*, células de mamífero y células de *Drosophila melanogaster*.

Con este fin, la expresión del minibody-Tn fue evaluada tanto en sistemas procariotas como en sistemas y eucariotas. En el caso de los vectores de expresión para *E. coli*, la construcción génica del Minibody anti-Tn incluía en su región amino-terminal un *tag* de histidina (His6), para su posterior purificación seguido por la secuencia para el sitio de corte proteolítico TEV. En los vectores de expresión para sistemas eucariotas contaban además con un dominio Fc, en el caso del vector pCMVExFc para la expresión en células HEK 293T, y un twin-strep-tag, en el caso del vector pDroExt para la expresión en células S2.

Se expresaron en *E. coli* tres minibodies: minibody-Tn, minibody-cys, con una cisteína adicional en la región del hinge, y un minileucine-zipper, con una secuencia de leucinas sustituyendo al dominio CH3 de la inmunoglobulina. En los sistemas de expresión eucariota, se expresó solamente el minibody-Tn, ya que las otras dos variantes fueron diseñadas para generar un mejor plegamiento y formación de puentes disulfuro en *E. coli*.

Sistemas de expresión procariotas

Expresión del Minibody

La expresión del minibody en cepas de *E. coli*, fue llevada a cabo clonando la secuencia del minibody en vectores de expresión pT7 derivados de pET32a (Agustín Correa et al., 2014). Los mismos contaban con un promotor T7, resistencia a la ampicilina, y diferentes proteínas de fusión según el esquema (figura 17). Para obtener los vectores con el inserto, se utilizó la estrategia de “Restriction Free Cloning” (RF), que permite la inserción de un fragmento de ADN en el sitio deseado mediante PCR (Unger, et al., 2010).

Se clonaron 4 vectores: dos con proteínas de fusión, uno sin proteína de fusión y uno con el péptido señal pelB (fig. 20) (Ortega, Prieto, Abreu, Oppezzo, & Correa, 2018). Las proteínas de fusión seleccionadas fueron: TRX y MBP. Los plásmidos pT7-Minibody fueron expresados en las cepas Rossetta, Shuffle pMJS9 y BL21 (DE3), según la proteína de fusión.

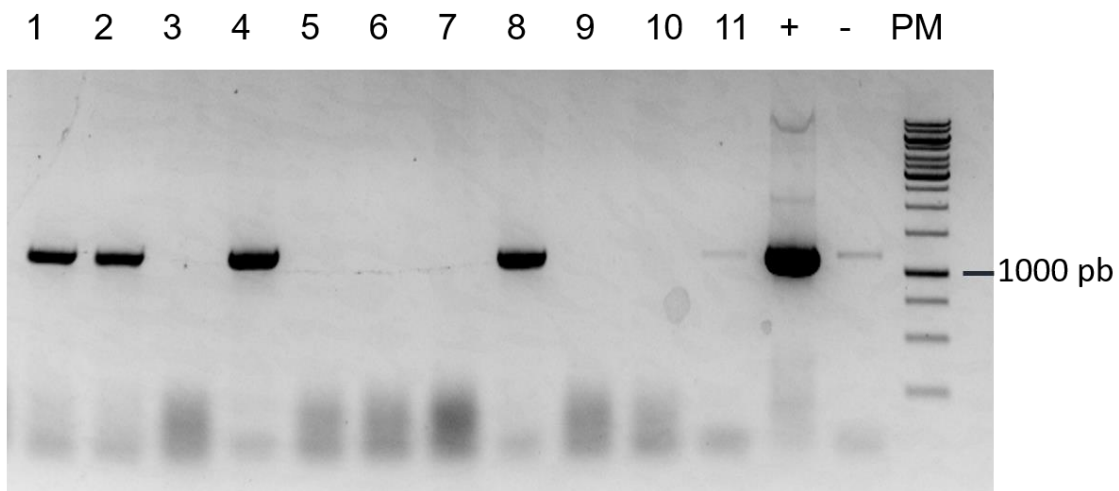


Figura 20. Productos de PCR en gel de agarosa 1,5%. Carriles 1-11 representan colonias amplificadas con oligos complementarios a la secuencia del minibody. Carriles 12 y 13 son control positivo y negativo respectivamente. Se utilizó como control positivo el megaprimer conteniendo la secuencia del minibody. En este gel representativo de las PCR de colonias, las colonias correspondientes a los carriles 1,2,4, y 8 fueron positivas para el inserto.

Expresión citoplasmática

La expresión citoplasmática del minibody fue evaluada en la cepa *Rosetta* y *Shuffle* pMJS9. Esta última, presenta el vector pMJS9 que tiene clonados de forma policistónica las enzimas Erv1P (se encarga de la catálisis “de novo” de enlaces disulfuro) y DsbC (isomerasa) bajo control del promotor inducible por arabinosa pBAD. De esta forma, la pre-expresión de estas enzimas proporciona una herramienta para la síntesis de proteínas con enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli*.

Se probaron dos proteínas de fusión, TRX y MBP, y la expresión sin una proteína de fusión la cual se evaluó solamente en la cepa *Rosetta*. En el caso de la cepa *Shuffle*, se realizó una pre-inducción con Arabinosa al 20%, y luego para ambas cepas una inducción de la expresión con 1mM de IPTG a 20°C durante toda la noche. Los cultivos fueron centrifugados para separar la fracción soluble de la insoluble, y así cargar la columna de IMAC (del inglés “Immobilized metal ion affinity chromatography”) con los sobrenadantes. Dicha columna presenta una matriz de metales inmovilizados que permite la unión de las histidinas que contiene el constructo a la misma. Para eluir la proteína de interés, se realiza un lavado con buffer B, el cual contiene una alta concentración del competidor imidazol (0,5M).

En los geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de *Coomassie* se muestran las distintas fracciones de la purificación para cada condición. En las fracciones de la IMAC para el minibody sin fusión y minibody-TRX, no se observó una banda definida con un peso molecular esperado (40kDa para el minibody y 54kDa para la fusión-TRX) (fig. 21). En las fracciones antes de columna, es decir la fracción soluble antes de ser cargada en la columna de IMAC, y la fracción no unida (aquella que al ser cargada en la columna no se unió), tampoco se observó una banda en el gel del peso esperado para el minibody.

Sin embargo, en el caso de la expresión del minibody sin proteína de fusión se observa en la fracción insoluble una banda intensa del tamaño esperado (fig. 21). La misma fue analizada a través de espectrometría de masa identificándose la secuencia de aminoácidos correspondiente al minibody. Este fenómeno no se vio en la expresión del minibody con TRX.

Considerando lo anterior, podemos decir que no se observaron bandas evidentes del peso esperado en las fracciones de elución de cromatografía de afinidad IMAC, ni diferencias en el patrón de expresión en la fracción soluble entre las cepas para la fusión con TRX. Debido a que en el primer paso de purificación no se detectó presencia de la proteína recombinante, no se procedió con los siguientes pasos de purificación. No se

logó visualizar una expresión del minibody en cantidades aceptables con fusión a TRX en ninguna de las fracciones de purificación en las cepas Shuffle pMJS9 y Rossetta (fig. 21). La expresión del minibody se da de forma insoluble en *E. coli* sin proteína de fusión.

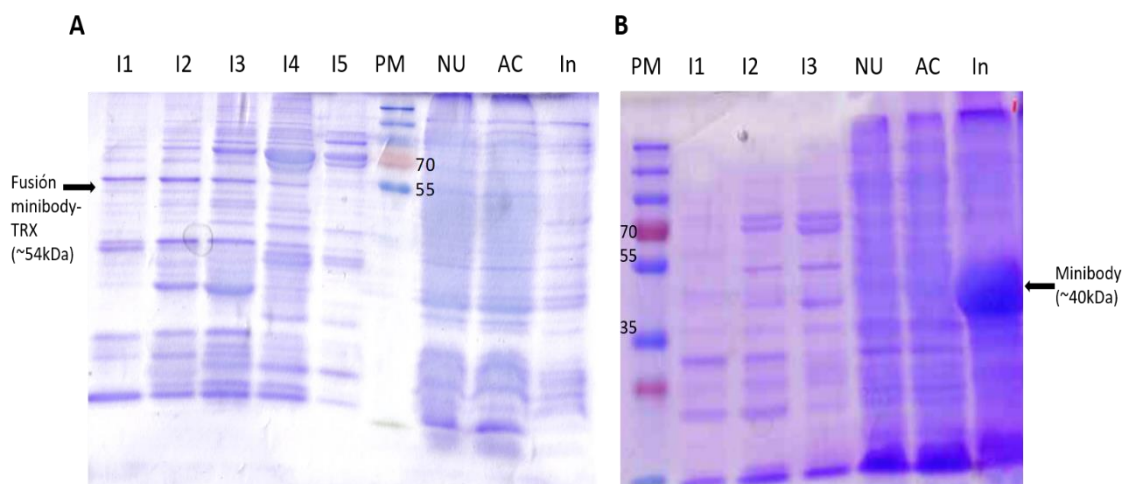


Figura 21. SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minibody en plásmido con fusión a TRX en la cepa Shuffle pMJS9 (A) y sin proteína de fusión en la cepa Rosseta (B). I1-I5: fracciones provenientes de la purificación por columna imac. NU: fracción no unida a la columna. AC: fracción antes de ser cargada a la columna. I: extracto inducido. NI: extracto no inducido. In: fracción insoluble PM: marcador de peso molecular

La expresión del minibody con fusión a MBP fue llevada a cabo en la cepa *Shuffle* pMJS9. La fusión Minibody-MBP cuenta con un peso molecular aproximado de 82kDa. En los geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de Coomasie se muestran las distintas fracciones de la purificación (fig 22). En la fracción de la IMAC se observó una banda con un peso molecular cercano a 82kDa que podría indicar la presencia de la fusión Minibody-MBP, además de otras bandas proteicas correspondientes distintas proteínas de *E coli*.

Para continuar con el proceso de purificación, se incubó a dicha fracción de purificación con la proteasa TEV, durante toda la noche a 4°C, en diálisis contra el *buffer* A de IMAC. Luego, se realizó una segunda IMAC, donde el minibody ahora sin fusión, no se une a la matriz de la columna, mientras que la proteína MBP y la proteasa TEV, que cuentan con el HIS-tag, sí se unen a la matriz de la columna. De esta manera, se espera que en la fracción no unida se encuentre el minibody, y en la fracción unida se encuentren la proteasa TEV y la proteína de fusión. En el carril C, correspondiente a la fracción clivada, se puede observar como la banda correspondiente a la fusión se vuelve menos intensa,

y aparece una banda a la altura de los 40kDa que correspondería a la proteína MBP y al minibody (fig. 22).

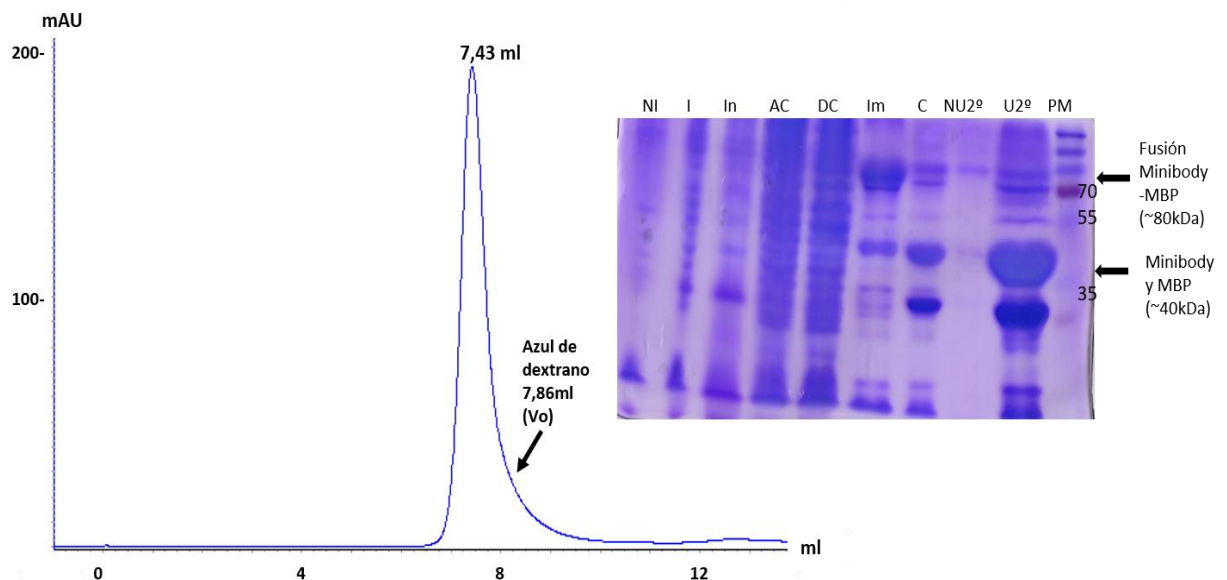


Figura 22. SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minibody en plásmido con fusión a MBP en cepa Shuffle pMJS9. NI: extracto no inducido. I: extracto inducido. In: fracción insoluble. AC: fracción antes de ser cargada a la columna. DC: fracción después de ser cargada a la columna. Im: fracción proveniente de la purificación por columna IMAC. C: muestra clivada con proteasa TEV. NU2º: fracción no unida de la 2º imac. U2º: fracción unida de la 2º IMAC. Cromatograma de gel filtración S200 10/300. Inyección de 500µl de minibody (fracción correspondiente a la proteína no unida de la segunda IMAC). El eje Y corresponde a las unidades de absorbancia en mAU. El eje X corresponde al volumen en ml. El pico de elución se detectó a los 7,43ml.

En el caso del carril correspondiente a la fracción no unida de la segunda IMAC, se observó una banda muy tenue que correspondería al minibody (40kDa), indicando poca cantidad de la proteína recombinante. Esto puede deberse a una degradación de la proteína o una unión inespecífica del minibody a la matriz de la columna. En el caso de la fracción unida de la segunda IMAC, se vio la banda correspondiente a la proteína MBP (40kDa) y la Proteasa TEV (25kDa).

La fracción no unida (2º IMAC) fue inyectada en una columna Superadex 200 10/300 para determinar el estado oligomérico de la proteína. En el cromatograma se pudo observar una elución de la proteína correspondiente a la fracción no unida de la segunda IMAC con bajos rendimientos (fig. 22). Para dicha inyección la proteína fue concentrada hasta un volumen de 500 µl. El volumen de elución fue de 7,37ml, el cual según la

calibración de la columna corresponde a un estado oligomérico agregado de tamaños superiores a 700 kDa. La fracción unida (2°IMAC) también fue inyectada en la columna Superdex 200 10/300, y tuvo un volumen de elución de 15 ml. Este volumen corresponde a proteínas de pesos moleculares cercanos a los 40 kDa, lo cual es concordante al peso molecular de la proteína MBP (datos no mostrados).

Por lo tanto, con este constructo se logró la expresión del minibody-Tn con la proteína de fusión MBP en la cepa shuffle pMJS9, en la fracción soluble, aunque con un estado oligomérico agregado, lo cual no lo hace funcional para el fin de este trabajo. La presencia del minibody fue confirmada por espectrometría de masa en la fracción no unida de la segunda IMAC.

Expresión periplasmática

La expresión en el periplasma de *E. coli* del minibody con el péptido señal pelB fue llevada a cabo en la cepa *BL21 (DE3)*. Dicho péptido permitiría la secreción del minibody en un estado desplegado hacia el periplasma a través de la vía Sec-dependiente. Luego, el péptido señal es clivado y la proteína recombinante se pliega en el periplasma con la ayuda de chaperonas e isomerasas.

Para esto, las células fueron crecidas a 37°C con agitación de 220 rpm hasta alcanzar una DO cercana a 1. La inducción fue llevada a cabo durante 60 horas a 25°C con una agitación de 130 rpm. Se indujo con medio de inducción 10X y con IPTG. El cultivo fue centrifugado, y la fracción celular fue sometida a un shock osmótico con una alta concentración de sacarosa para obtener la fracción periplasmática. Dicha fracción fue sometida a diálisis contra el *buffer A* de IMAC, para posteriormente ser cargada en la columna de IMAC. La fracción con el minibody fue eluída con *buffer B* y luego clivada. Esta última fracción fue purificada en una columna de cromatografía S200 10/300 para separar el minibody de la proteasa y verificar su estado oligomérico.

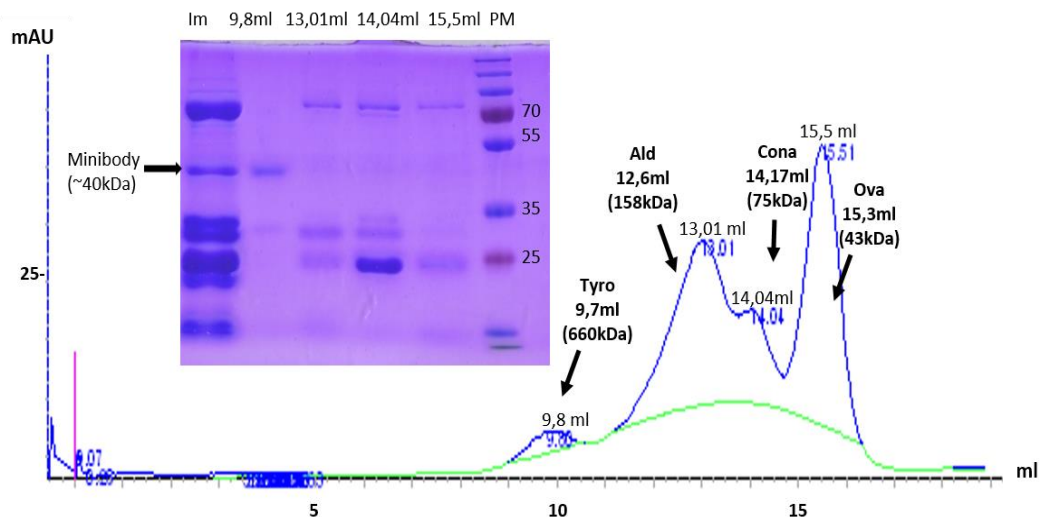


Figura 23. SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minibody en plásmido con péptido señal en cepa BL21. Im: fracción proveniente de la purificación por columna imac. P: fracciones de los picos de elución de la cromatografía de exclusión S200 10/300. PM: peso molecular. Cromatograma de gel filtración S200 10/300. Inyección de 500µl de minibody sin concentrar (fracción correspondiente a la IMAC). El eje Y corresponde a las unidades de absorbancia en mAU. El eje X corresponde al volumen de elución en ml. Tyro= tiroglobulina, Ald= aldosa, Cona= conalbúmina, Ova= ovalbúmina.

En el gel de poliacrilamida se puede ver en la fracción correspondiente la purificación por IMAC, una banda correspondiente al peso molecular esperado para el minibody (40kDa) (fig. 23). Ésta fracción fue inyectada en una columna de gel filtración, donde se vieron varios picos de absorbancia correspondientes a diferentes volúmenes de elución (fig. 23). Cada fracción correspondiente a los diferentes volúmenes de elución fue analizada en un gel de poliacrilamida, donde se puede ver que la banda correspondiente al minibody de la fracción IMAC está presente en la fracción correspondiente a 9,8 ml.

Teniendo en cuenta la calibración de la columna, dicho volumen corresponde a proteínas de 660 kDa, indicando que el minibody adquiere una conformación agregada. Por lo tanto, la expresión del minibody en el periplasma de *E. coli* fue en forma soluble, aunque su estado oligomérico corresponde a conformaciones de peso molecular superiores a 600kDa (fig. 23).

El minibody fue expresado en dos compartimentos de *E. coli*, en el periplasma y citoplasma. En este último, se probó la expresión con dos proteínas de fusión (TRX y MBP), y una expresión sin proteína de fusión. En el caso de la expresión periplasmática, se obtuvo el minibody en la fracción soluble, aunque en bajos rendimientos y con pesos moleculares superiores a los 600 kDa demostrando un estado agregado. Por otro lado, la expresión en el citoplasma fue en la fracción soluble solamente cuando se contaba

con la proteína de fusión MBP asociada al minibody. Aunque, así como sucedió con la expresión en periplasma, el minibody adquirió conformaciones tridimensionales que superaban los 500 kDa. Por lo tanto, la expresión del minibody no fue eficiente en los sistemas de *E. coli*, por lo que se procedió a la expresión de otro constructo utilizando los mismos sistemas de expresión.

Expresión del Minileucine-zipper

Si bien se logró la expresión soluble del minibody-Tn en *E. coli*, su estado oligomérico no fue el esperado, ya que las fracciones analizadas por cromatografía de exclusión fueron correspondientes a estados agregados. Con el fin de optimizar la expresión del minibody en sistemas procariotas y lograr alcanzar un estado dimerico, se sustituyó la región CH3 del minibody por una secuencia de leucinas que adquieren la conformación de *leucine zipper*, donde dos alfa hélices anfipáticas paralelas interactúan entre sí. Además, se cambió el largo del *Hinge*, haciéndolo más corto (sin la región flexible rica en glicinas). Estos cambios favorecerían la dimerización proteica y generaría dímeros estables según trabajos anteriores (Klement, 2015; Busch, 2002).

La expresión del minileucine-zipper también fue en cepas de *E. coli*, y fue llevada a cabo clonando la secuencia del minileucine-zipper en vectores de expresión derivados del pET32a con diferentes proteínas de fusión según el esquema indicado previamente. Para obtener los vectores con el inserto, se utilizó la estrategia de *Restriction Free Cloning* (RF) citada previamente. Se clonaron 3 vectores: 2 con proteínas de fusión, y uno con el péptido señal pelB. Las proteínas de fusión fueron: TRX y MBP. Debido a los resultados anteriores, no se clonó en un vector sin proteína de fusión, ya que las mismas también ayudan a la expresión soluble de la proteína recombinante.

Los plásmidos pT7-Minileucine-zipper fueron expresados en las cepas Rosetta, Shuffle pMJS9 y BL21 (DE3). Para los pasos de purificación, se decidió no realizar la segunda IMAC debido a que se observaron interacciones inespecíficas del minileucine-zipper con la matriz de la columna (datos no mostrados). Luego de la IMAC y del clivado con la proteasa TEV, se realizó la cromatografía de exclusión como método de separación de la proteína recombinante y la proteína de fusión.

Expresión citoplasmática

La expresión del minileucine-zipper en el citoplasma de *E. coli* fue probada con las proteínas de fusión TRX y MBP en la cepa Shuffle pMJS9. La expresión y purificación para ambos casos fue según detallada previamente. Como primer paso de purificación, se realizó una IMAC para obtener la fracción del minileucine-zipper con la proteína de fusión. Luego, se realizó el clivado con la proteasa TEV y se procedió a separar ambas proteínas mediante una cromatografía gel filtración S200 10/300. En los geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de *Coomassie* se muestran las distintas fracciones de la purificación donde el minileucine-zipper tiene un peso molecular estimado de 32kDa.

Para el caso de la expresión con la proteína de fusión MBP, se puede observar en el gel de poliacrilamida una banda del peso esperado de la fusión (~72kDa) en la fracción de purificación IMAC (fig. 24). Dicha banda sufre una disminución en su intensidad luego del clivado con la proteasa TEV, lo cual se observa en el carril de la fracción clivada, a la vez de que surge una nueva banda a la altura del peso molecular cercano a los 30kDa (fig. 24). Ésta banda podría corresponder tanto al minileucine-zipper o bien a la proteasa TEV.

Para deliberar si la nueva banda que se observa en la fracción clivada corresponde al fragmento de anticuerpo o la proteasa TEV (o ambas), se analizaron las muestras correspondientes a todos los volúmenes de elución de la cromatografía de exclusión molecular. En los carriles correspondientes a los volúmenes de 12, 13 y 15 ml se puede observar dicha banda. Esto podría indicar diferentes estados oligoméricos del minileucine-zipper, además de la presencia de la proteasa (fig. 24). A su vez, se puede ver una banda a los 10 ml, que podría corresponder a la fusión minileucine-zipper-MBP, que no fue clivada, mostrando también un estado conformacional agregado (fig. 24).

Según la calibración de la columna, el volumen de exclusión esperado para la columna S200 10/300 es cercano a 14,5ml, que correspondiente a proteínas de peso molecular de 60kDa aproximadamente. Dicho volumen correspondería a una conformación dimerica del minileucine-zipper (64kDa). En ese volumen de elución se puede ver una banda correspondiente al peso molecular esperado, aunque en cantidades muy bajas.

Esta construcción fue expresada con la proteína de fusión TRX en la cepa Shuffle pMJS9, además en la cepa de *E. coli* Rossetta con ambas proteínas de fusión, mostrando resultados similares (datos no mostrados).

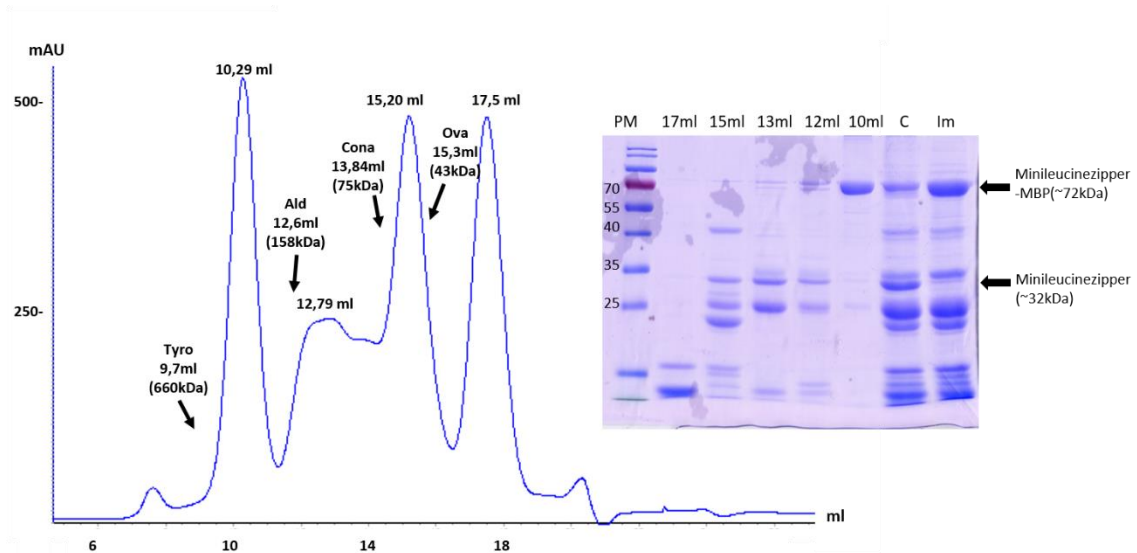


Figura 24. Cromatograma de gel filtración S200 10/300 y SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minileucine-zipper con fusión a MBP en cepa Shuffle. Im: fracciones provenientes de la purificación por columna IMAC. C: fracción clivada con proteasa TEV. En los demás carriles se indican las fracciones correspondientes a los volúmenes de exclusión de la cromatografía en columna S200 10/300.

Expresión periplasmática

La expresión del minileucine-zipper con el péptido señal pelB fue llevada a cabo en la cepa *BL21 (DE3)* según el procedimiento previamente descrito. Se ve en la fracción clivada una banda del peso molecular esperado de 32kDa (fig. 25). Dicha fracción fue evaluada en una cromatografía S200 10/300, donde la banda en el gel de poliacrilamida de 32kDa está presente en los volúmenes de exclusión de 12 y 13 ml. Según los estándares de calibración de la columna, las proteínas que eluyen a dichos volúmenes cuentan con pesos moleculares superiores a los 75 kDa e inferior a 158 kDa. Se espera que el minileucine-zipper adopte una conformación dimérica (64 kDa), dicho volumen correspondería a conformaciones triméricas o tetraméricas (fig. 25).

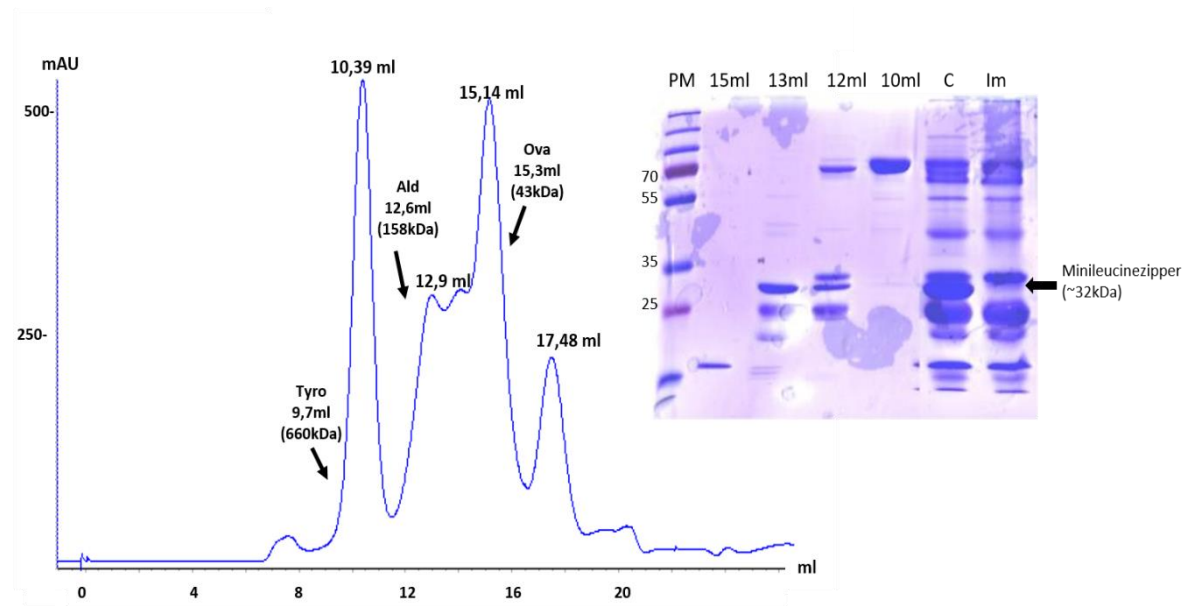


Figura 25. Cromatograma de gel filtración S200 10/300 y SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minileucine-zipper péptido señal pelB cepa BL21. Im: fracción proveniente de la purificación por columna IMAC. C: clivado con proteasa TEV. En los demás carriles se indican las fracciones correspondientes a los volúmenes de exclusión de la gel filtración S200 10/300

Para el formato minileucine-zipper, la expresión en *E. coli* fue evaluada en el citoplasma con proteínas de fusión (TRX y MBP), y en el periplasma. Bandas con el peso molecular esperado fueron obtenidas en la fracción soluble en todos los casos, aunque la conformación tridimensional que adoptó la proteína fue de pesos moleculares superiores al esperado para una conformación dimérica. De esta manera, la expresión del minileucine-zipper no fue eficiente en sistemas procariontas.

Expresión del Minibody-cys

Una segunda modificación fue realizada en la secuencia original del minibody, donde fue introducida una mutación puntual, cambiando una serina por una cisteína en la región del *hinge* (Yan et al., 2011). Esto genera un puente disulfuro adicional, quedando en total 3 puentes disulfuro en la región del *hinge*, con el objetivo de favorecer la dimerización. La expresión del minibody-cys fue citoplasmática, llevada a cabo con fusión a MBP en la cepa *Shuffle* pMJS9, teniendo en cuenta que los mejores resultados de la expresión del minibody-Tn fueron con la proteína de fusión MBP. Además, la cepa *Shuffle* pMJS9 favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma de *E. coli*.

Las fracciones de purificación se pueden observar en los geles de SDS-PAGE teñidos con Azul de *Coomassie*.

En este caso, se llevó a cabo una purificación por columna IMAC como primer paso de purificación, donde en el gel de poliacrilamida se puede observar una banda de peso molecular cercano a los 80 kDa, que es el peso esperado de la fusión Minibodycys-MBP. Cuando la fracción de la IMAC fue clivada con la proteasa TEV, se ve en el gel que aparece una banda a la altura de los 40 kDa, correspondiente tanto al minibody-cys como a la proteína MBP (fig. 26).

Una segunda IMAC fue llevada a cabo, donde se espera que el minibody eluya en la fracción no unida a la matriz. En el gel se detecta una banda a la altura de 40 kDa correspondiente a dicha fracción, correspondiente al minibody-cys. La fracción no unida a la matriz fue analizada por espectrometría de masa, confirmando la presencia del minibody-cys, y además fue analizada por cromatografía de gel filtración para conocer su estado conformacional. En el cromatograma se vio que la proteína tiene un volumen de exclusión de 7,56 ml, eluyendo en el volumen de exclusión. La proteína adquirió una conformación con tamaños que no llegan a entrar a la matriz de la columna (fig. 26). Por lo tanto, el minibody-cys se expresó en *E. coli* de forma soluble en un estado oligomérico agregado.

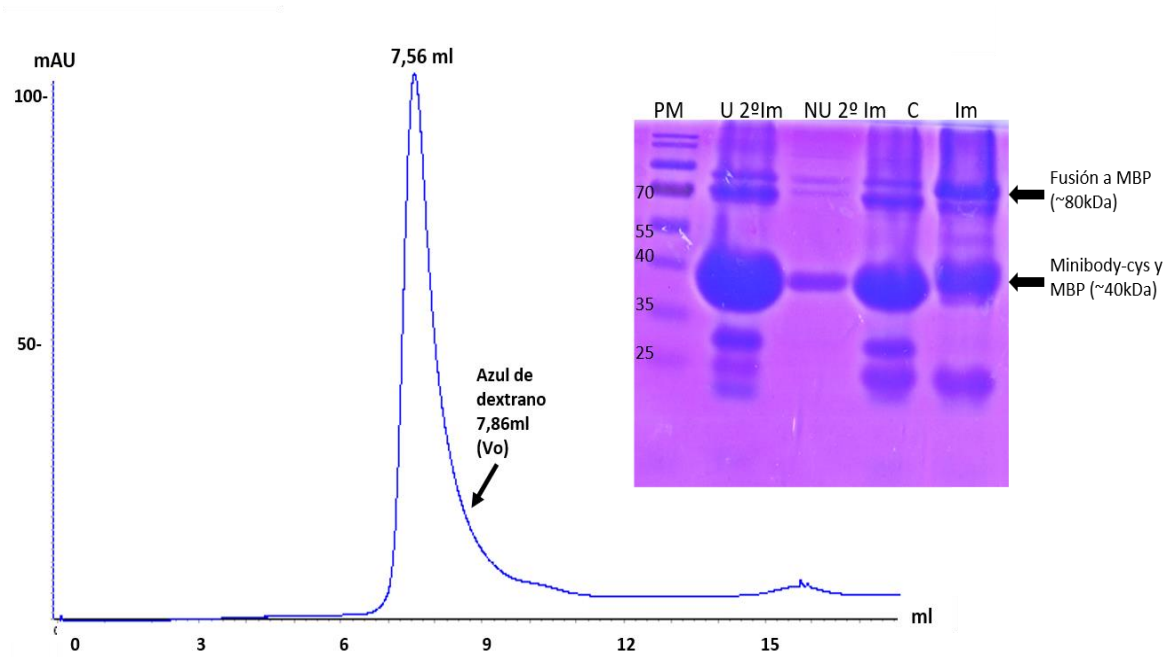


Figura 26. Cromatograma de gel filtración S200 10/300 y SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minibody-cys con fusión a MBP en la cepa Shuffle pMJS9. Im: fracción proveniente de la purificación por columna IMAC C: clivado con proteasa TEV. NU2°Im corresponde a la fracción no unida a la matriz de la columna. U2°Im corresponde a la fracción unida a la matriz de la columna de IMAC.

En suma, la expresión de los tres minibodies en sistemas procariontes fue en formas agregadas en la fracción soluble cuando contaban con proteína de fusión o expresión periplasmática. Se evaluaron distintas proteínas de fusión, cepas y métodos de expresión y purificación, pero en ninguno de los casos se logró obtener una conformación dimérica de la molécula.

Minibodies en *E. coli*

Para el diseño del minibody, se utilizó como base la secuencia del anticuerpo quimérico Chi-Tn y la secuencia del dominio CH3 del anticuerpo IgG1 humano. A partir de allí, se realizaron además cambios en la secuencia para mejorar la expresión de la molécula en sistemas procariontes. Dichos cambios fueron una mutación puntual en la región del hinge para favorecer la dimerización (minibody-cys), y un cambio en la secuencia del CH3, sustituyéndolo por un cierre de leucinas (minizip). Por lo tanto, se expresaron en *E. coli* tres variantes del minibody. Las expresiones que fueron solubles y que lograron ser purificadas se evaluaron en test de ELISA, para determinar la capacidad de unión por su antígeno.

La expresión soluble de los minibody-Tn en *E. coli* se obtuvo con la proteína de fusión MBP en la cepa Shuffle pMJS9; la expresión del mini-leucinezipper fue soluble con las proteínas de fusión TRX y MBP; y el minibody-cys fue expresado de forma soluble en la cepa Shuffle pMJS9 con la proteína de fusión MBP. En todos los casos, si bien los minibodies se obtuvieron en la fracción soluble, contaban con una conformación oligomérica agregada. Se probó la funcionalidad de las distintas fracciones de purificación (fig. 27), y en todos los casos, las fracciones fueron testeadas sin diluir.

En el caso del minibody-Tn, se vio que aumentaba su actividad en el test de ELISA al clivar la proteína de fusión (minibody clivado). La fracción correspondiente a la elución a los 7 ml de la cromatografía de exclusión, también demostró actividad contra el antígeno Tn. Para el caso del mini-leucinezipper y para el minibody-cys, no se vio una actividad significativa en el test de ELISA, ya que los valores de absorbancia para todas las fracciones de purificación fueron muy bajos en relación al control positivo.

Por lo tanto, si bien el minibody-Tn expresado con la proteína de fusión MBP fue el que obtuvo mejores resultados en el test de ELISA, su estado conformacional no fue el esperado. Se probaron técnicas de *re-folding*, aunque los resultados no fueron positivos por lo que se decidió expresar el minibody en sistemas eucariotas. Por otro lado, los cambios en la secuencia nucleotídica del minibody no fueron eficientes para obtener una conformación dimérica, por lo que no se continuó con estos diseños en los siguientes experimentos.

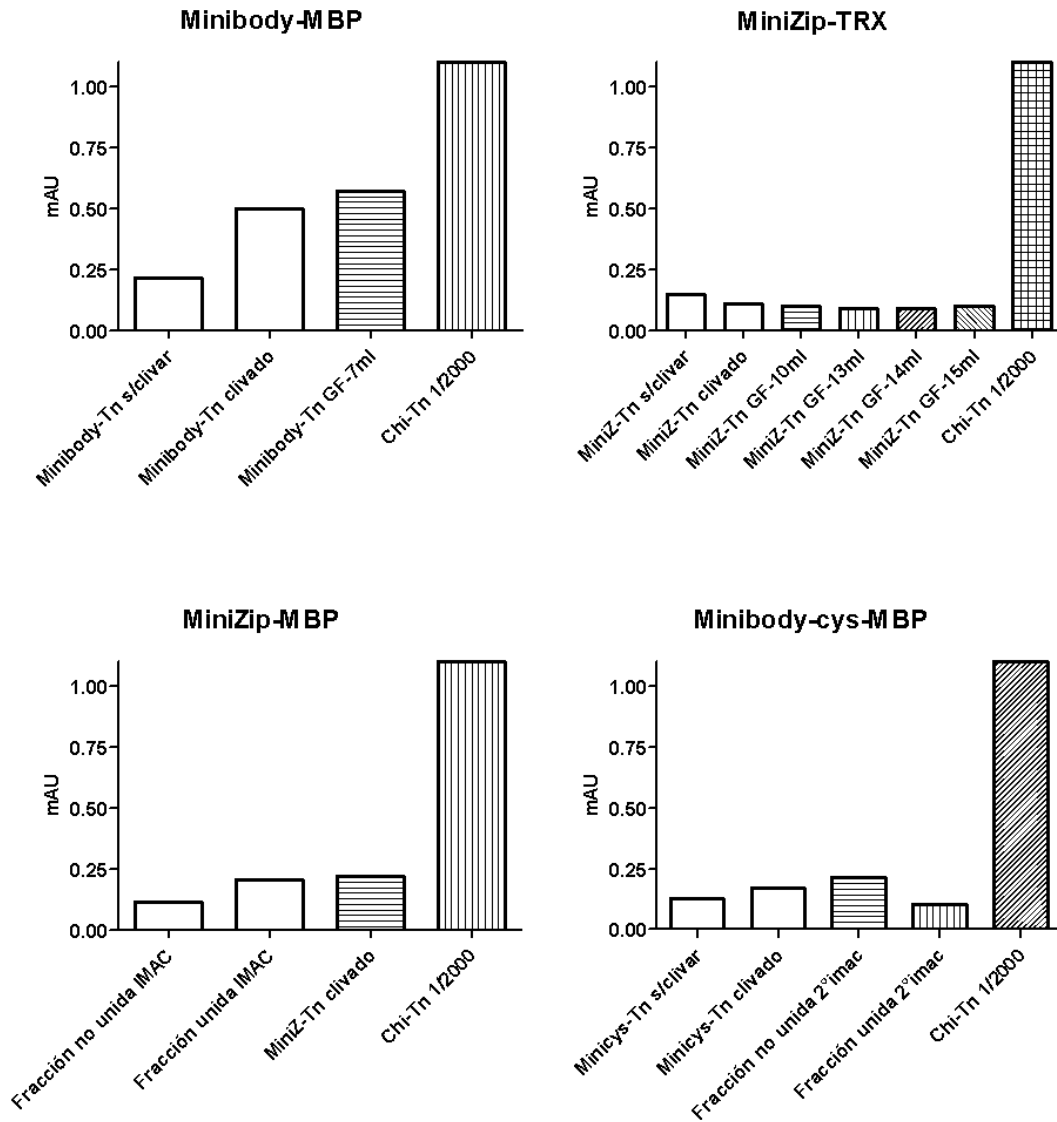


Figura 27. Test de ELISA. Se sensibilizó la placa con la mucina OSM desialilada y se evaluó la presencia del minibody en las diferentes fracciones de purificación. Fracciones correspondientes a la expresión del minibody en la cepa Shuffle pMJS9 con fusión a MBP. Minibody s/clivar corresponde a la fracción de IMAC y la fracción de GF 7ml correspondiente a la fracción de gel filtración en estado agregado. Se utilizó como control positivo el anticuerpo quimérico Chi-Tn 1/1000. Todos los valores cuentan con el blanco restado (BSA).

Sistemas de expresión eucariotas

Debido a que los sistemas procariotas no fueron efectivos para la expresión de los minibodies en su conformación dimérica, se procedió a evaluar sistemas de expresión eucariotas. En particular, se utilizaron las células de mamífero HEK 293T y las células S2 de *Drosophila melanogaster*. Para estos sistemas sólo se evaluó la expresión del minibody-Tn, y no sus variantes minibody-cys y minileucine-zipper comentadas anteriormente.

Expresión del Minibody-Tn

Células HEK 293T

El clonado del minibody-Tn en el vector de expresión pCMVExtFc fue siguiendo el mismo protocolo citado previamente en la sección materiales y métodos. El mismo cuenta con una fusión Fc (dominio CH2 y CH3 de la cadena pesada de la IgG1 humana), con el objetivo de obtener mayores niveles de expresión de la proteína recombinante tomando como referencia los resultados de trabajos anteriores (Lo et al., 1998) y aporta un método de purificación eficiente adicional, mediante el uso de resinas conteniendo la proteína A inmovilizada. Dicha porción Fc está separada del constructo por un sitio de reconocimiento para la proteasa 3C para permitir la remoción del Fc luego de su purificación.

Para la expresión del minibody-Tn se transfectaron de forma transitoria las células HEK 293T. Se probaron dos condiciones de relación ADN: PEI (1:10 y 1:20), y control sin transfección. Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes cada día durante 10 días para test de ELISA, y los mismos fueron conservados a -20°C hasta el día de la purificación.

En el test de ELISA no se detectó actividad específica contra el antígeno Tn de la asialo-OSM en ninguno de los sobrenadantes colectados (fig. 28). Se continuó con el proceso de purificación ya que la falta de actividad en el test de ELISA podría deberse a bajas concentraciones del minibody-Tn en los sobrenadantes.

La purificación del minibody-Tn fue en columna de afinidad Proteína A HiTrap, el sobrenadante fue cargado a dicha columna, donde la región Fc se une específicamente a la proteína A de una manera pH-dependiente. La proteína A tiene una capacidad de unión óptima a un pH de 8-9 y permite la purificación en un único paso del anticuerpo y logrando altos grados de pureza y homogeneidad (Bio-Rad, 2016).

Para la elución de la fracción unida se realizaron dos pasos de pH, donde una primera elución se dio con el buffer B pH 4,6 (donde se espera que eluyan proteínas del suero presentes en el medio de cultivo) y una segunda elución con el buffer C pH 3 (donde se espera que eluya el minibody-Tn). La fusión minibody-Fc tiene un peso molecular esperado de ~70kDa. En el paso a pH 3 hubo una pequeña elución con una mAU inferiores a 50 observada en el cromatograma, siendo una cantidad poco significativa.

Ambas fracciones de elución fueron colectadas y analizadas en un gel de poliacrilamida, en el cual, no se detectó ninguna banda del peso esperado en la fracción de elución a pH 3 (fig. 29). Como no se detectó actividad específica en los test de ELISA con los sobrenadantes, y no se logró una fracción de purificación con la proteína de interés, consideramos que las células HEK 293T no fueron un sistema de expresión eficiente para el minibody-Tn en las condiciones evaluadas.

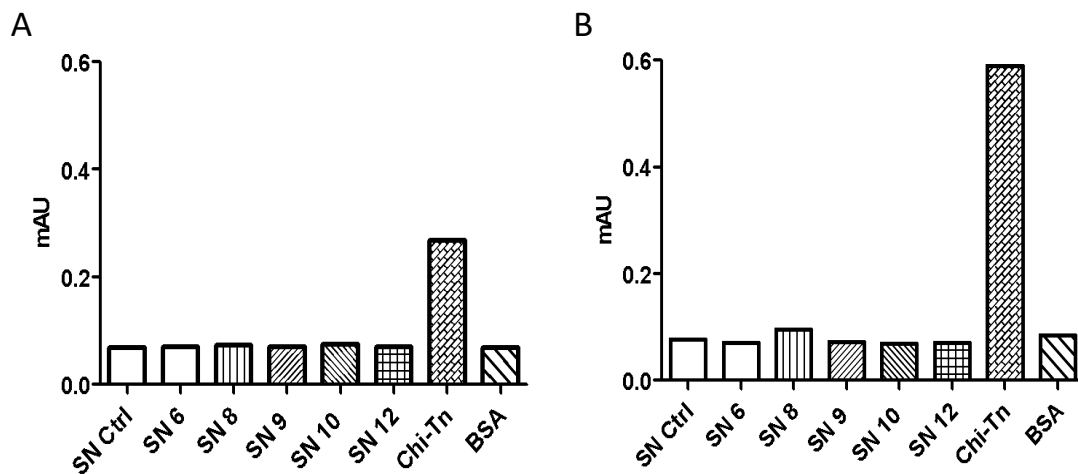


Figura 28. Test de ELISA. Se sensibilizó la placa con asialo-OSM y se testeó la presencia del minibody en los sobrenadantes de los cultivos de células HEK 293T mediante actividad. Se utilizó como control positivo el anticuerpo quimérico Chi-Tn. A) Transfección del plásmido que contiene el minibody-Fc en la condición ADN:PEI 1:10. B) Transfección del plásmido que contiene el minibody-Fc en la condición ADN:PEI 1:20.

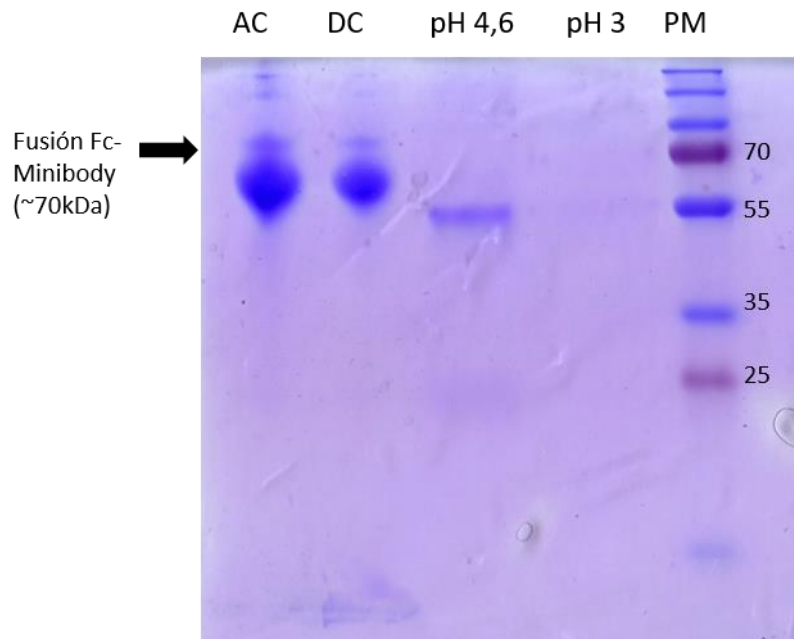


Figura 29. SDS-PAGE de fracciones de expresión y purificación del minibody-Fc en las células HEK 293T. Antes col: sobrenadante antes de ser cargado a la columna. Dsp col: sobrenadante no unido a la columna. pH4,5: fracción eluída con un step de pH 4,5. pH3: fracción eluída con un step de pH 3.

Expresión del minibody en células S2 de *Drosophila*

Para la expresión del minibody en las células S2 se utilizó el vector de expresión pDroext inducible con el agregado de metales divalentes. El mismo contiene una señal de exportación BiP (péptido señal perteneciente a *D. melanogaster*) para la translocación de la proteína recombinante hacia el RE e ingreso en la vía secretoria. El plásmido contiene las secuencias necesarias para su amplificación en bacterias, con resistencia a Ampicilina, por lo que fue amplificado, purificado como ya descrito en materiales y métodos. Como vector de selección de clones transfectados se utilizó el vector pCoPuro (Invitrogen) que codifica para la resistencia al antibiótico Puromicina por lo que las células fueron co-transfectadas con ambos plásmidos.

Para la inducción, se realizó una puesta a punto de la concentración de CdCl_2 (inductor). Se prepararon 3 placas con 3 ml de cultivo a una densidad de 5×10^6 células/ml y se probaron dos concentraciones de inductor (5 y 10 μM CdCl_2) y un control sin inducir. Se fueron retirando alícuotas del sobrenadante a los días 3, 6 y 10 luego de la inducción para estudios de actividad en test de ELISA y Western Blot (fig. 30).

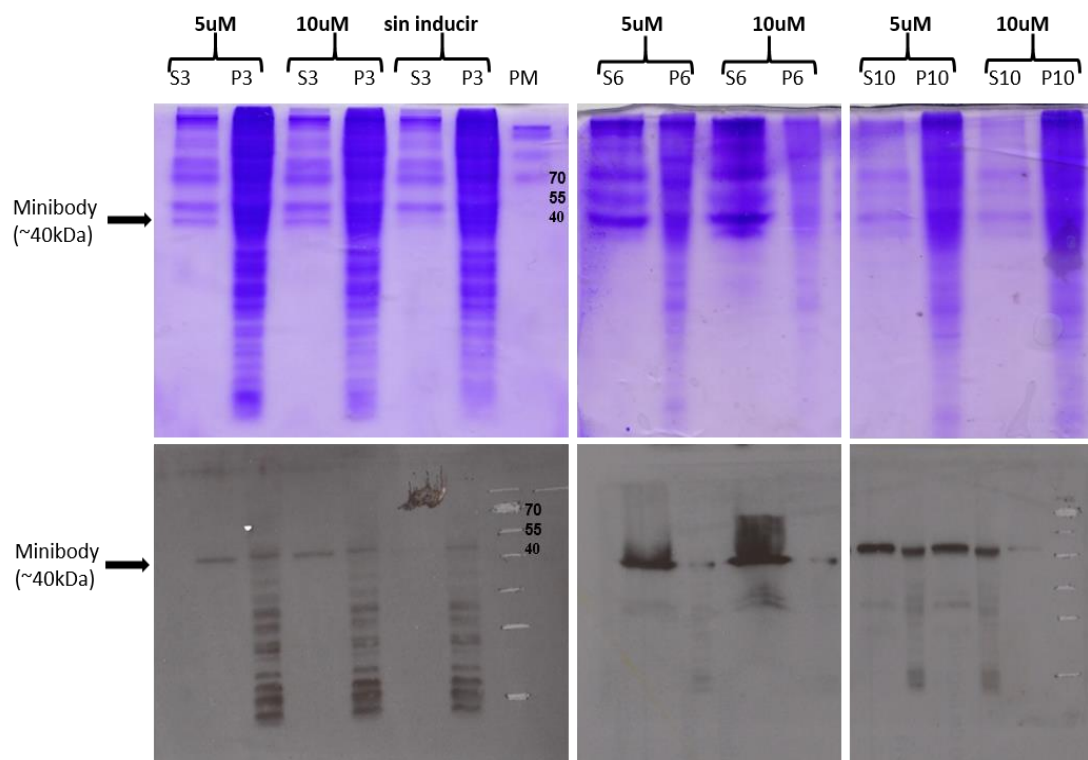


Figura 30. SDS-Page y western blot de fracciones de expresión del minibody-Tn en sobrenadante de células S2. SX: sobrenadante del día X post-inducción; PX: fracción insoluble (pellet) del día X post-inducción. Se indican dos concentraciones del inductor (CdCl_2) utilizadas en μM .

En los diferentes sobrenadantes analizados, se observó una banda en los geles de poliacrilamida y Western blot del peso molecular esperado al minibody-Tn (indicado con una flecha en la figura 30), y que no estaba presente en el control sin inductor. Se analizaron 3 tiempos de inducción (3, 6 y 10 días) para determinar cuál de ellos demostraba una mayor expresión del minibody-Tn. Mediante la técnica de Western blot, se observó una banda más intensa a los 6 y 10 días en comparación con la banda observada a los 3 días de inducción.

Si observamos los geles de poliacrilamida, la banda de mayor intensidad fue observada a los 6 días post-inducción, en comparación con los otros dos tiempos analizados. Si comparamos estos resultados con los test de ELISAs realizados con los sobrenadantes colectados, se detectó actividad a los 3 y 6 días post-inducción, mientras que a los 10 días la actividad fue menor (fig. 31). Debido a que se vio una pérdida de actividad en el sobrenadante correspondiente al día 10, se eligió el tiempo 6 días post-inducción para los siguientes experimentos.

En cuanto al inductor, las concentraciones analizadas fueron de 5 y 10 μM de CdCl_2 . Las mismas no mostraron diferencias en cantidad aparente de proteína en los geles de poliacrilamida y Western blot, ni diferencias en la actividad en test de ELISA, por lo que se eligió la concentración de 5 μM para los siguientes experimentos.

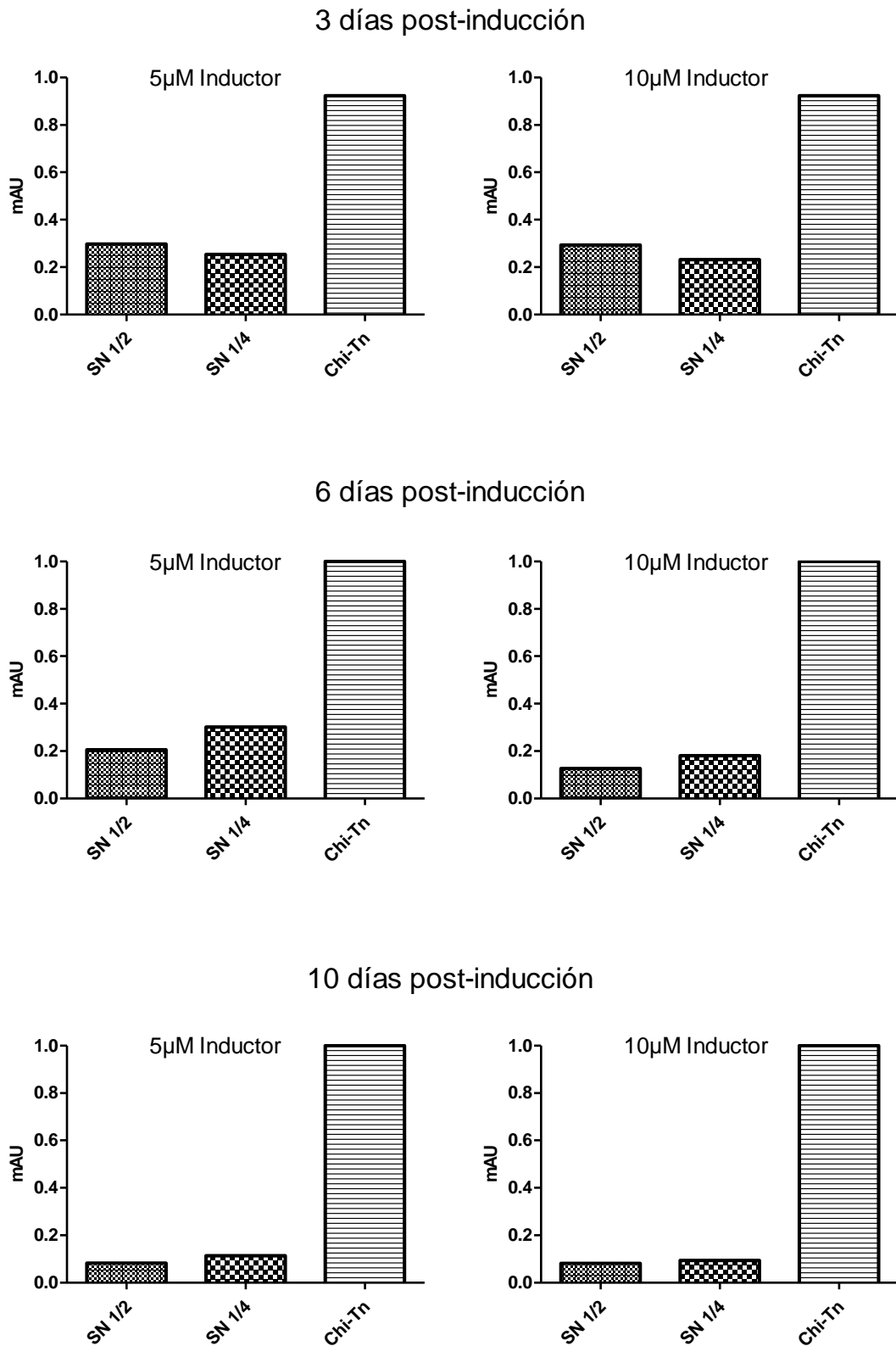


Figura 31. Test de ELISA. Se sensibilizó la placa con la mucina OSM desialilada y se testeó la presencia del minibody en los sobrenadantes de los días 3, 6 y 10 post-inducción analizando dos concentraciones de inductor (5 y 10 µM). Los sobrenadantes fueron evaluados en diluciones al 1/2 y al 1/4. Se utilizó como control positivo el anticuerpo quimérico Chi-Tn. Los valores presentados tienen restados el valor de absorbancia del blanco.

Purificación del Minibody expresado en células S2

La expresión del minibody-Tn fue en 100 ml de cultivo de células S2 inducidas con 5 μ M de CdCl₂ durante 6 días. Para la purificación se utilizó la columna Streptactin XT equilibrada en *buffer W*. El sobrenadante fue cargado en la columna, donde el twin-strep-tag que está en la secuencia del minibody-Tn se une a la matriz de la columna. La elución de la fracción unida fue con una inyección de 50 mM de biotina. Para verificar la presencia del minibody en la fracción unida de la columna, se realizó un gel de poliacrilamida y un Western blot revelado con un anticuerpo secundario anti-IgG1h. En los mismos, se pudo ver una banda específica del peso esperado del minibody y reconocida por el anticuerpo secundario (fig. 32).

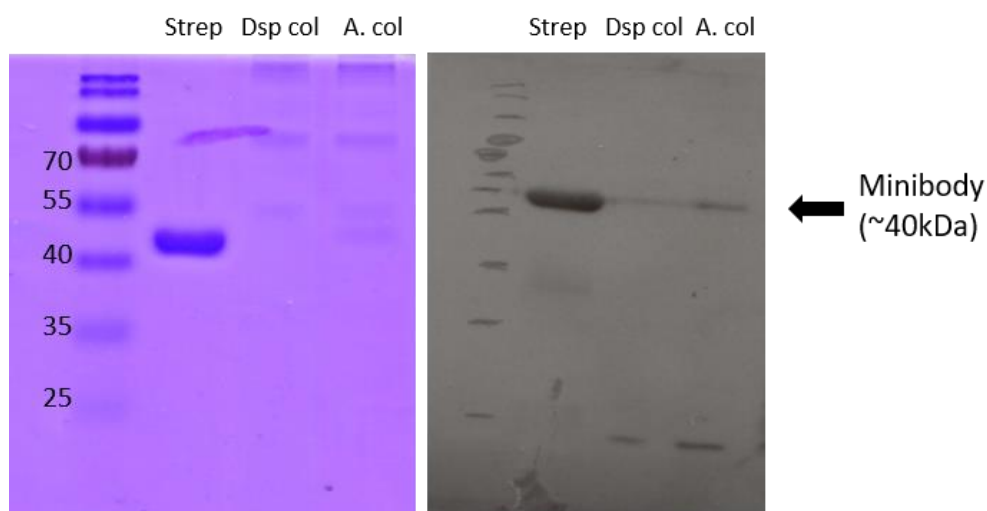


Figura 32. Gel de poliacrilamida y Western blot de las fracciones de purificación. A. col: sobrenadante antes de ser cargado a la columna; Dsp.col: sobrenadante que no se unió a la columna al ser cargada; Strep: fracción purificada mediante columna streptactin.

La fracción obtenida de la elución de la columna streptactin fue clivada durante toda la noche con la proteasa TEV contra el buffer A de IMAC para clivar el twin-strep-tag. Para separar la fracción del minibody de la fracción que contenía la proteasa y minibody sin clivar, se realizó una cromatografía por afinidad IMAC, ya que la proteasa utilizada contaba con un His-tag (el cual se une a la matriz de la columna). La fracción no unida, luego de la inyección a la columna, correspondía al minibody clivado. Con un step de 50% de buffer B se eluyó la fracción unida. El minibody ahora sin el twin-strep-tag fue analizado por una cromatografía de exclusión para determinar su estado oligomérico.

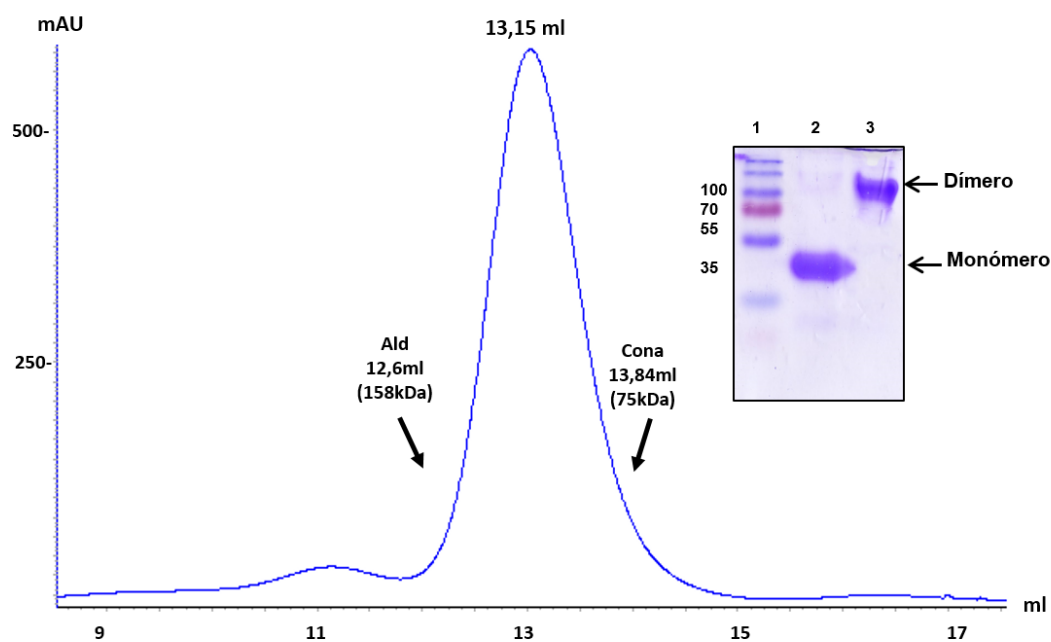


Figura 33. Cromatograma de gel filtración S200 10/300. Inyección de 500 μ l de minibody expresado en células S2 (fracción clivada correspondiente a la IMAC). El eje Y corresponde a las unidades de absorbancia en mAU. El eje X corresponde al volumen de elución en ml. En el gel de poliacrilamida se cuenta con: carril 1: peso molecular, carril 2: minibody-Tn con agente reductor (DTT), carril 3: minibody-Tn sin agente reductor.

En el cromatograma, se observó un único pico de elución a un volumen de 13,15ml (fig. 33). El mismo se aproxima a una elución de un estado dimérico en comparación con los estándares de elución, ya que se espera que el dímero cuente con un peso molecular de poco más de 80 kDa.

Adicionalmente, se analizó la formación de puentes disulfuro a través de un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras. En el carril correspondiente a la condición reductora (carril 2), se vio una banda proteica de ~40kDa, y en el carril correspondiente a la condición no reductora, se vio una banda superior a 80kDa. Esto indica que la molécula presenta formación de puentes disulfuro que favorecen su dimerización.

La fracción proveniente de gel filtración fue cuantificada mediante espectrofotometría teniendo en cuenta el coeficiente de extinción para el minibody. El rendimiento de este sistema de expresión fue de 0,5mg en 100ml de cultivo. Lo que nos lleva a un rendimiento de 5 mg/L de cultivo.

Caracterización funcional de los minibodies

Test de ELISA

El reconocimiento del Minibody al antígeno Tn se evaluó mediante ELISA utilizando la mucina aOSM como fuente de dicho antígeno. Para ello, se inmovilizó la mucina aOSM en placas de 96 pocillos, luego del bloqueo de los sitios inespecíficos, se evaluó el reconocimiento de distintas diluciones del Minibody y/o de distintas fracciones de purificación. La detección de la unión antígeno-minibody se realizó con anticuerpo de conejo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal quimérico Chi-Tn.

La expresión del minibody en las células S2 de *Drosophila* fue evidenciada en los sobrenadantes a dos concentraciones de inductor. La purificación consistió en un primer paso en columna streptactin, seguido del clivado del twin-strep-tag. Un segundo paso a través de la columna de afinidad imac para separar el minibody de la proteasa, con una posterior cromatografía de gel filtración para verificar el estado oligomérico del minibody.

El minibody-Tn purificado fue evaluado contra el antígeno Tn en distintas concentraciones. Su actividad demostró ser concentración dependiente (fig. 34), obteniéndose los mayores valores de absorbancia a la concentración de 0,4 µg/ml. Si bien, las absorbancias alcanzadas fueron menores en comparación las obtenidas con el anticuerpo Chi-Tn, esto se puede deber a que el anticuerpo secundario posee una mayor probabilidad de unión en el anticuerpo entero que en el minibody. Esto generaría una diferencia en la señal colorimétrica que se obtiene en la técnica.

A partir de los resultados obtenidos, se continuó caracterizando el minibody-Tn obtenido en el sistema de expresión eucariota de células S2. Este minibody presentó un estado dimérico verificado por la cromatografía de exclusión molecular.

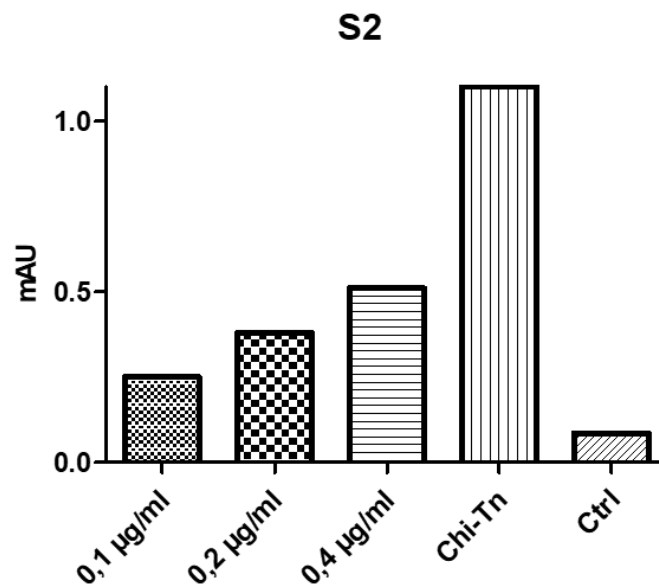


Figura 34. Test de ELISA. Se sensibilizó la placa con la mucina OSM desialilada y se testeó la presencia del minibody proveniente de la purificación por columna de afinidad Strep-tactin. Se utilizó como control positivo el anticuerpo quimérico ChiTn anti-Tn 1/1000

Ensayo de SPR

Para continuar con la caracterización de la actividad funcional del minibody, se llevaron a cabo experimentos de resonancia plasmónica de superficie, donde se utilizaron concentraciones crecientes del minibody-Tn (en un rango fue de 25 a 700 nM) inyectadas sobre el minibody-Tn. La figura 35 muestra el perfil de asociación y disociación obtenido con las distintas concentraciones de minibody-Tn, presentando una disociación completa a los pocos minutos. Se incluye también el ajuste global de los sensogramas obtenidos, a un modelo de interacción “analito bivalente” y los parámetros obtenidos del mismo se presentan en la tabla 6.

La descripción matemática del sistema con un modelo de analito bivalente resulta compleja, ya que describe dos pares de constantes cinéticas diferentes para un anticuerpo con dos sitios de unión idénticos, donde la “ k_{on2app} ” del segundo sitio es una constante aparente que depende del fenómeno de unión a través del primer sitio (con sus respectivas constantes cinéticas k_{on1} y k_{off1}).

La afinidad obtenida a partir del primer grupo de constantes cinéticas fue $K_d = 230\mu M$. En este sentido, el evento de unión del segundo sitio de unión del minibody-Tn (descrito por el segundo grupo de constantes cinéticas) depende del primero y de la disponibilidad

de antígeno Tn de la mucina asialo-OSM inmovilizada por lo que no describiría al minibody propiamente dicho. El análisis realizado tiene carácter cualitativo y no cuantitativo.

En este sentido, el minibody-Tn interacciona con el antígeno Tn de la mucina asialo-OSM, con una rápida disociación (disociación en pocos minutos), y una baja afinidad.

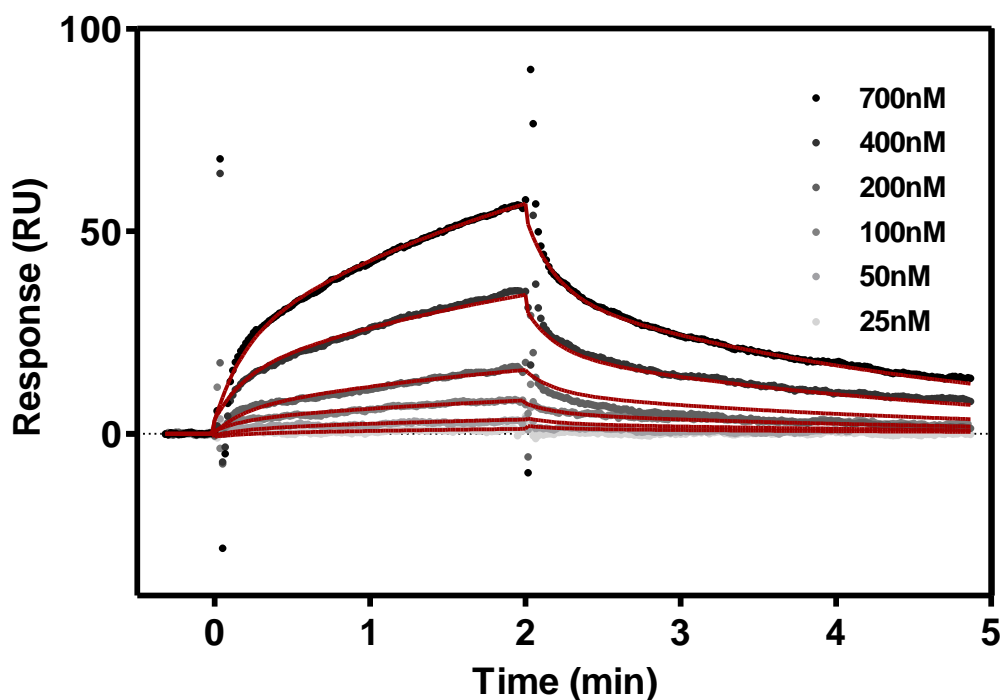


Figura 35. Sensograma. Se muestran los perfiles de asociación y disociación del minibody Tn en distintas concentraciones. Se grafican unidades relativas en función del tiempo (minutos) de las muestras analizadas.

Tabla 6. Parámetros obtenidos en los ensayos de SPR.

| k_{on1} (1/Ms) | k_{off1} (1/s) | K_{on2app} (1/RUs) | k_{off2} (1/s) | R_{MAX} | Chi2 |
|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------|
| 312 | 0,072 | $3,15 \times 10^{-6}$ | $3,69 \times 10^{-3}$ | 4.77×10^3 | 0,934 |

Inmunofluorescencia Indirecta

Para evaluar la interacción del minibody-Tn en un contexto celular, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia indirecta (IF-I) utilizando diferentes líneas celulares, tanto Tn+ como Tn- para el anticuerpo Chi-Tn. Los resultados del minibody fueron comparados con el anticuerpo quimérico Chi-Tn el cual reconoce específicamente el antígeno Tn en cluster. Las líneas celulares MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano), A549 (carcinoma pulmonar humano), HCT116 (carcinoma colo-rectal humano), y H838 (adenocarcinoma pulmonar humano) fueron evaluadas por IF-I.

La línea celular MCF-7 fue previamente estudiada en IF-I con el anticuerpo Chi-Tn, donde los resultados demostraron positividad para dicho anticuerpo (Pablo Oppezco et al., 2000; Schwartzman, 2015). Se analizaron dos concentraciones, tanto de Chi-Tn como de minibody-Tn, las cuales fueron elegidas en función a una puesta a punto utilizando la línea celular MCF-7, donde se evaluaron las concentraciones de 1; 2,5; 5; 10; 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$. Las señales con marcado fluorescente más significativo fueron detectadas en las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$, tanto para el minibody como para el Chi-Tn, por lo que se procedió a utilizar 20 $\mu\text{g/ml}$ en los siguientes experimentos de IF-I.

En el caso de la línea celular MCF-7, se observó señal de fluorescencia para el minibody, con un marcado en algunas de las células del preparado de forma clara y con un patrón puntiforme. De la misma manera, se vio para las células marcadas con el anticuerpo Chi-Tn, donde el patrón del marcado también fue puntiforme y en algunas células. No se vio marca de fluorescencia en aquellas células que fueron tratadas sólo con el anticuerpo secundario (fig. 36).

La línea celular A549, al ser incubada con el Chi-Tn, demostró ser positiva para Tn. En las imágenes obtenidas, el marcado tanto con el minibody como con el Chi-Tn fue más intenso y difuso en comparación con las células MCF-7, aunque también se observa un marcado puntiforme. El marcado fue evidente en algunas de las células del preparado, donde también se pueden ver células negativas para los anticuerpos Chi-Tn y Minibody-Tn.

Por otro lado, las líneas celulares HCT116 y H838 al ser incubadas con el anticuerpo Chi-Tn mostraron ser negativas para dicho anticuerpo, por lo que se consideraron células control. Para el minibody-Tn, no mostraron marca fluorescente en ninguna de las concentraciones evaluadas (fig. 37).

Tomando en consideración los datos de IF-I, se puede decir que el minibody-Tn tuvo un comportamiento comparable al del anticuerpo Chi-Tn, ya que, tanto las células Tn+ como las Tn-, también lo fueron para el minibody-Tn, demostrando una similitud en la especificidad de los anticuerpos.

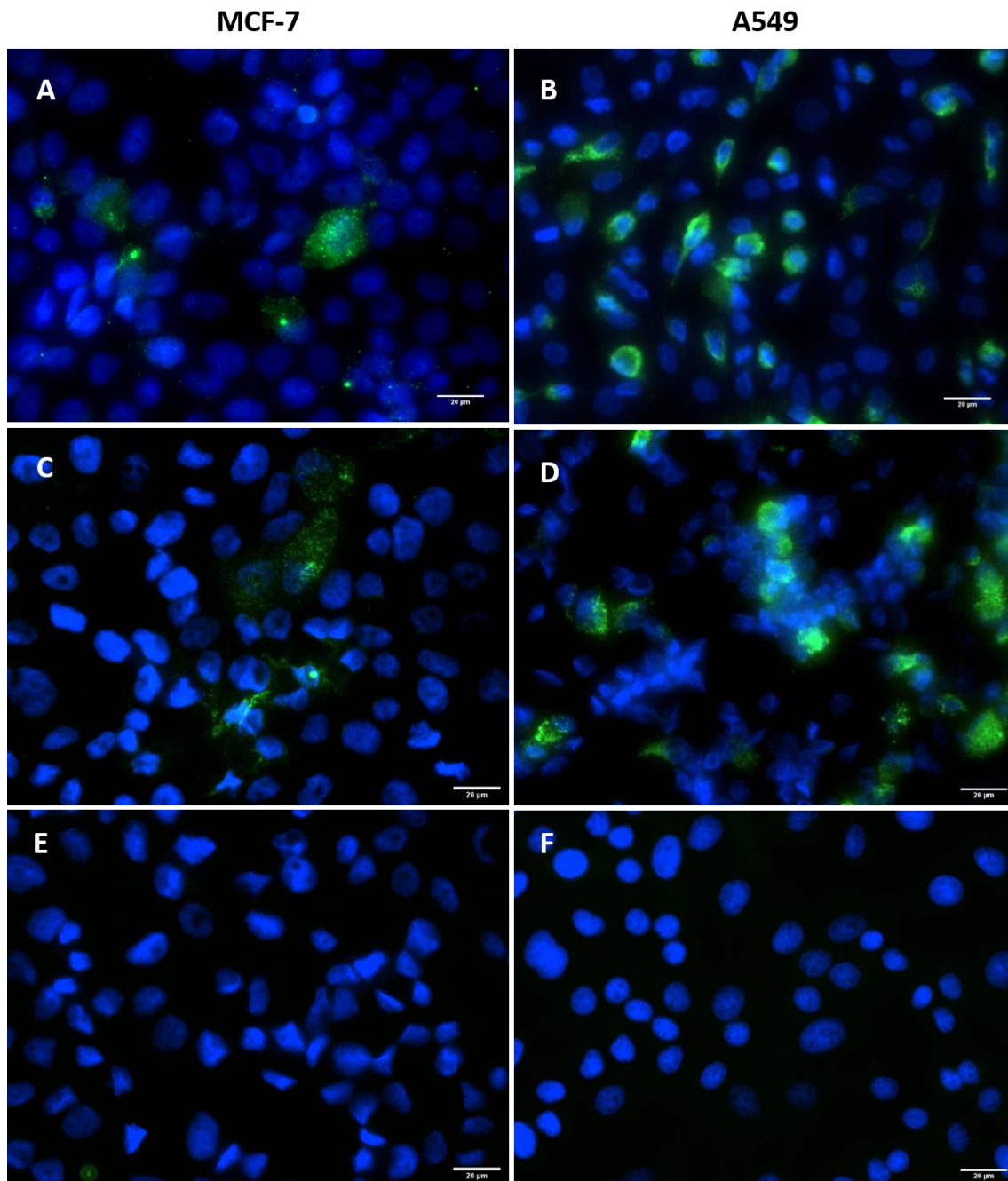


Figura 36. Inmunofluorescencia indirecta en células MCF-7 y A549. A) células MCF-7 tratadas con 20µg/ml ChiTn C) células MCF-7 tratadas con 20µg/ml Minibody E) células MCF-7 tratadas solo con anticuerpo secundario B) células A549 tratadas con 20µg/ml de ChiTn. D) células A549 tratadas con 20µg/ml minibody. y F) corresponden a células A549 tratadas solo con el anticuerpo secundario. La concentración de anticuerpo secundario fue de 1/150. Todas las imágenes se encuentran en un aumento de 40X. La barra de referencia indica un tamaño de 20µm.

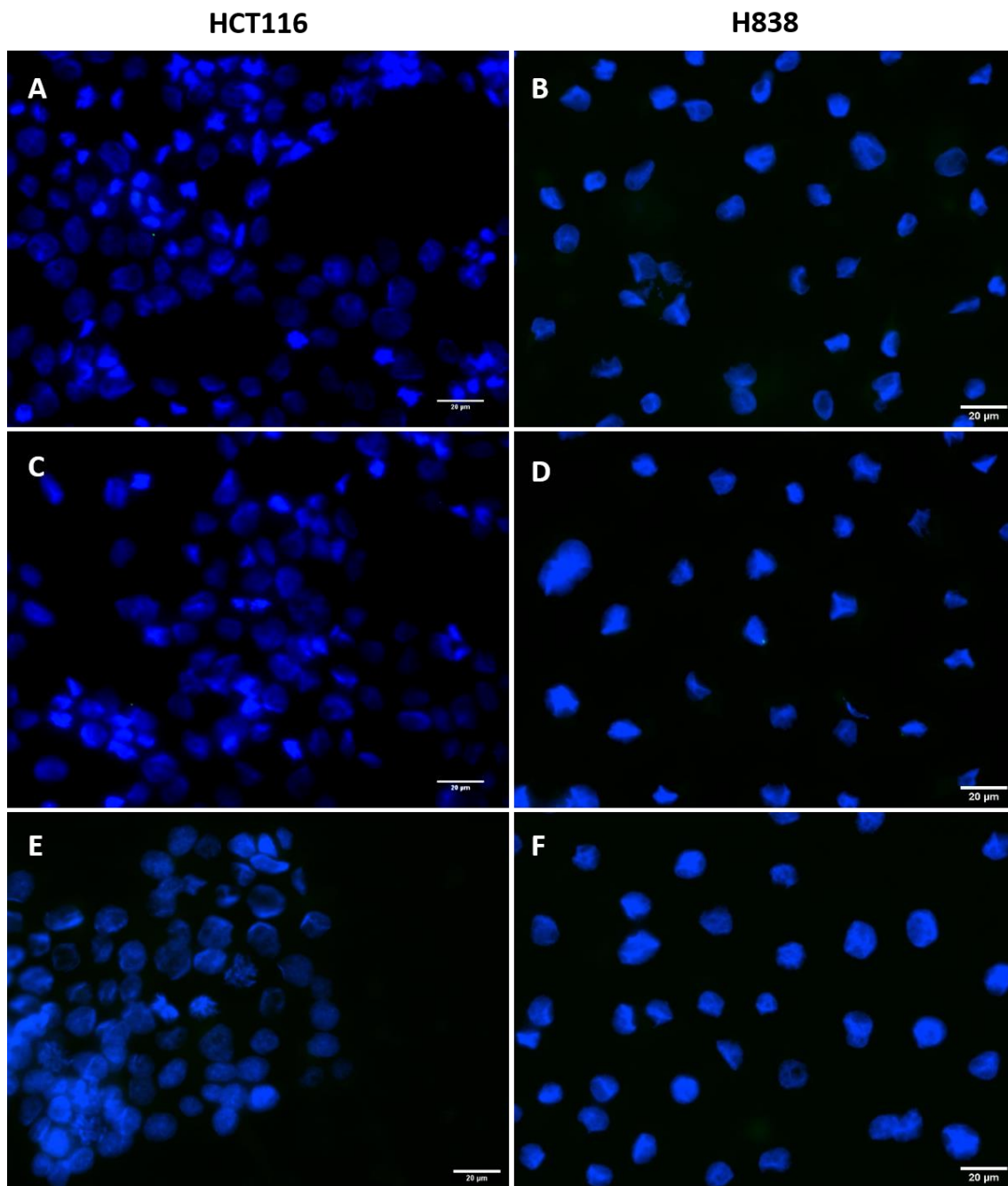


Figura 37. Inmunofluorescencia indirecta en células HCT 116 y H838. A) células HCT 116 tratadas con 20µg/ml ChiTn C) células HCT 116 tratadas con 20µg/ml Minibody E) células HCT 116 tratadas solo con anticuerpo secundario B) células H838 tratadas con 20µg/ml de ChiTn. D) células H838 tratadas con 20µg/ml minibody. y F) corresponden a células H838 tratadas solo con el anticuerpo secundario. La concentración de anticuerpo secundario fue de 1/150. Todas las imágenes se encuentran en un aumento de 40X. La barra de referencia indica un tamaño de 20µm.

Ensayo de Citometría de flujo

Las cuatro líneas celulares analizadas por IF-I fueron también analizadas por citometría de flujo con el anticuerpo Chi-Tn y el minibody-Tn. En concordancia con los datos obtenidos previamente en IF-I, las líneas celulares MCF-7 y A549 mostraron tener células marcadas con ambos anticuerpos, en comparación con el control (células sin anticuerpo primario) (fig. 38).

En este sentido, las células A549 fueron las que mostraron tener mayor intensidad de fluorescencia en comparación con la línea celular MCF-7. Esto tiene correlación con lo observado en las imágenes de IF-I, donde se observaba una mayor cantidad de células con fluorescencia en las células A549 en comparación con las células MCF-7. Además, en las células A549, el anticuerpo Chi-Tn mostró mayor intensidad de fluorescencia en comparación con el minibody-Tn. Esto también se puede observar en los histogramas para A549, donde existe una población de células con mayor intensidad de fluorescencia (fig. 39), en comparación con el minibody-Tn.

En la línea celular MCF-7, se puede ver una intensidad de fluorescencia similar en las células marcadas con el Chi-Tn y con el minibody-Tn. De la misma manera, en el histograma los picos de fluorescencia de ambos anticuerpos son casi superpuestos, mostrando una intensidad de fluorescencia similar (fig. 38 y 39).

Para el caso de las líneas celulares HCT116 y H838, se observó una intensidad de fluorescencia menor a las detectadas en las líneas celulares MCF-7 y A549, y en el caso de las células HCT116 sin diferencias significativas con respecto al control. En ambos casos se vio un comportamiento comparable entre el Chi-Tn y minibody-Tn, donde ambos anticuerpos mostraron baja intensidad de fluorescencia. Si bien en IF-I no se detectó fluorescencia en estas dos líneas celulares, por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia fue baja, y esta diferencia se puede deber a la sensibilidad de la técnica (fig. 38 y 39).

A partir de estos resultados podemos concluir que el minibody-Tn tuvo un comportamiento de marcado similar al del anticuerpo Chi-Tn en todas las líneas celulares analizadas por citometría de flujo.

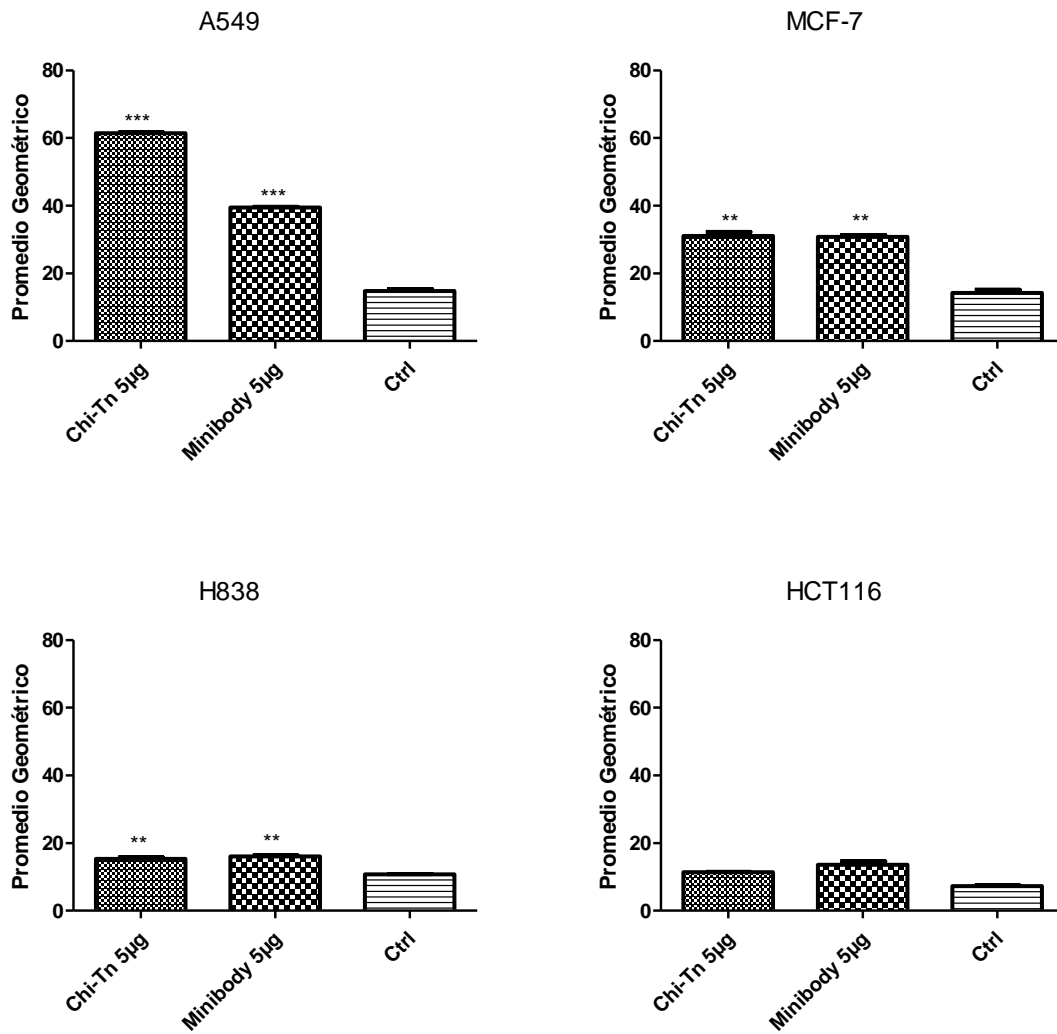


Figura 38. Gráficas representativas de la citometría de flujo para cada línea celular. Todas las líneas celulares fueron tratadas con 5 µg Chi-Tn, 5 µg de minibody-Tn, y un control sin tratar. El promedio geométrico representa un parámetro de intensidad de fluorescencia.

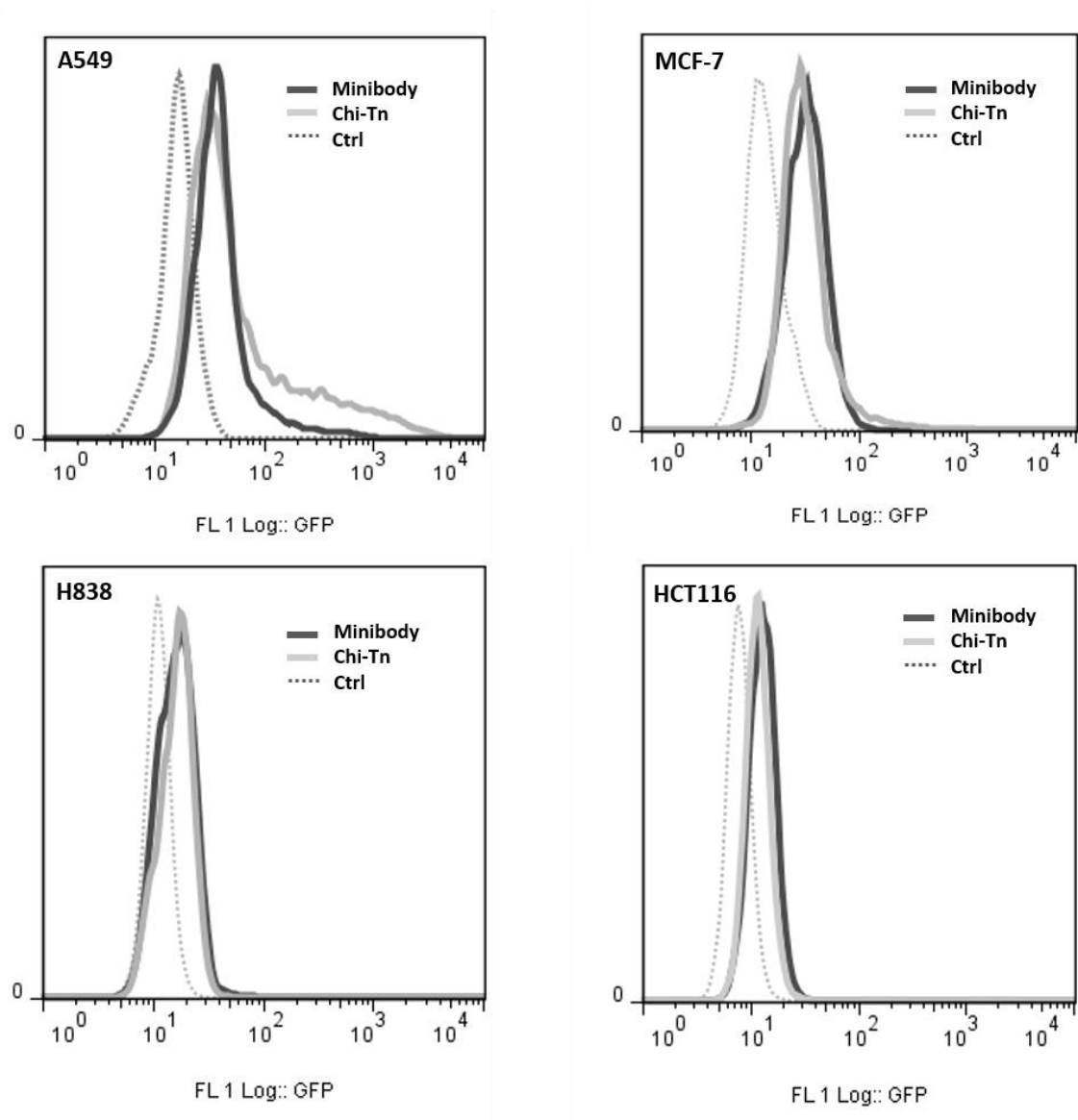


Figura 39. Histogramas de citometría de flujo para las cuatro líneas celulares representando en el eje x la intensidad de fluorescencia y en el eje Y células contadas.

Inmunohistoquímica

Para el análisis funcional en un contexto tisular del minibody-Tn, se realizaron ensayos de inmunohistoquímicas (IHQ). Los mismos fueron sobre cortes de tejidos provenientes de tumores generados con la línea celular A549, en ratones *nude*.

En el corte tisular tratado con el minibody-Tn se pueden observar células marcadas en el citoplasma, y algunas células no marcadas (negativas) (fig.40). Esto concuerda con los ensayos anteriores en la línea celular A549, tanto en I-FI como citometría de flujo, donde una población de células fue Tn positiva para el minibody-Tn (fig. 36 y 38).

Por otro lado, el corte tisular analizado con el Chi-Tn muestra una marca más abundante, tanto en cantidad de células y como en intensidad (fig.40). En los ensayos de citometría también se observó sobre esta línea celular una mayor intensidad de fluorescencia con respecto al minibody-Tn (60% vs 40%) (fig. 38). Además, la marca observada en las células muestra ser a nivel nuclear y no tanto a nivel citoplasmático ni de membrana (fig. 40).

Si bien, entre los ensayos *in vitro* a nivel celular y tisular muestran resultados complementarios, en todos los casos se demostró una actividad antígeno específica por parte del minibody-Tn y del Chi-Tn en líneas celulares de tumores humanos.

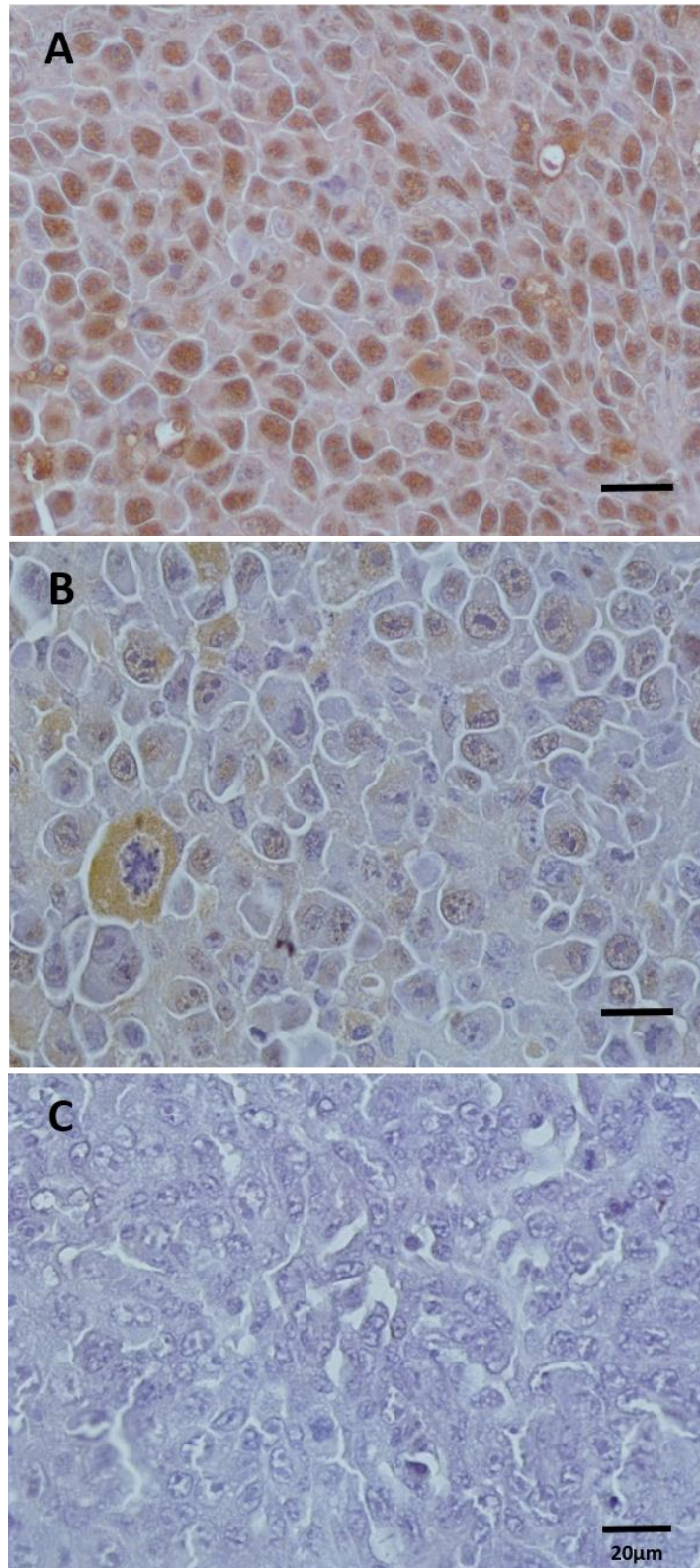


Figura 40. Inmuno-histoquímica en tejido tumoral proveniente de la línea celular A549. A) corte tisular tratado con 30µg/ml Chi-Tn. B) Corte tisular tratado con 40µg/ml de Minibody-Tn C) Corte tisular correspondiente al control negativo (tratado solo con el anticuerpo secundario). La concentración de anticuerpo secundario fue de 1/150. Todas las imágenes se encuentran en un aumento de 40X. La barra de referencia indica un tamaño de 20µm.

Funcionalidad *in vivo*

Para evaluar la funcionalidad *in vivo*, tanto del Chi-Tn como del Minibody-Tn, es que se realizaron ensayos de inmuno-PET en modelos de ratones *nude*, a los cuales se les generaron tumores a partir de la línea celular A549 de cáncer de pulmón humano. Ésta línea celular fue analizada previamente *in vitro*, en IF-I y citometría de flujo, mostrando ser positiva para ambos anticuerpos.

En este sentido, se buscó validar la aplicabilidad del minibody-Tn para usos imagenológicos por inmuno-PET, y en un modelo de cáncer de pulmón que no ha sido reportado previamente teniendo como molécula blanco al antígeno Tn.

Captación tumoral *in vivo* de ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn y ^{89}Zr -DFO-minibody

Los anticuerpos ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn y ^{89}Zr -DFO-minibody-Tn fueron preparados con una pureza radioquímica de 90% y 62%, respectivamente. Las imágenes PET mostraron una acumulación y retención de biomoléculas ^{89}Zr en los tumores de A549 en ratones luego de 63 horas post-inyección para el ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn, y luego de 18 horas post-inyección para el ^{89}Zr -DFO-minibody-Tn (fig. 41).

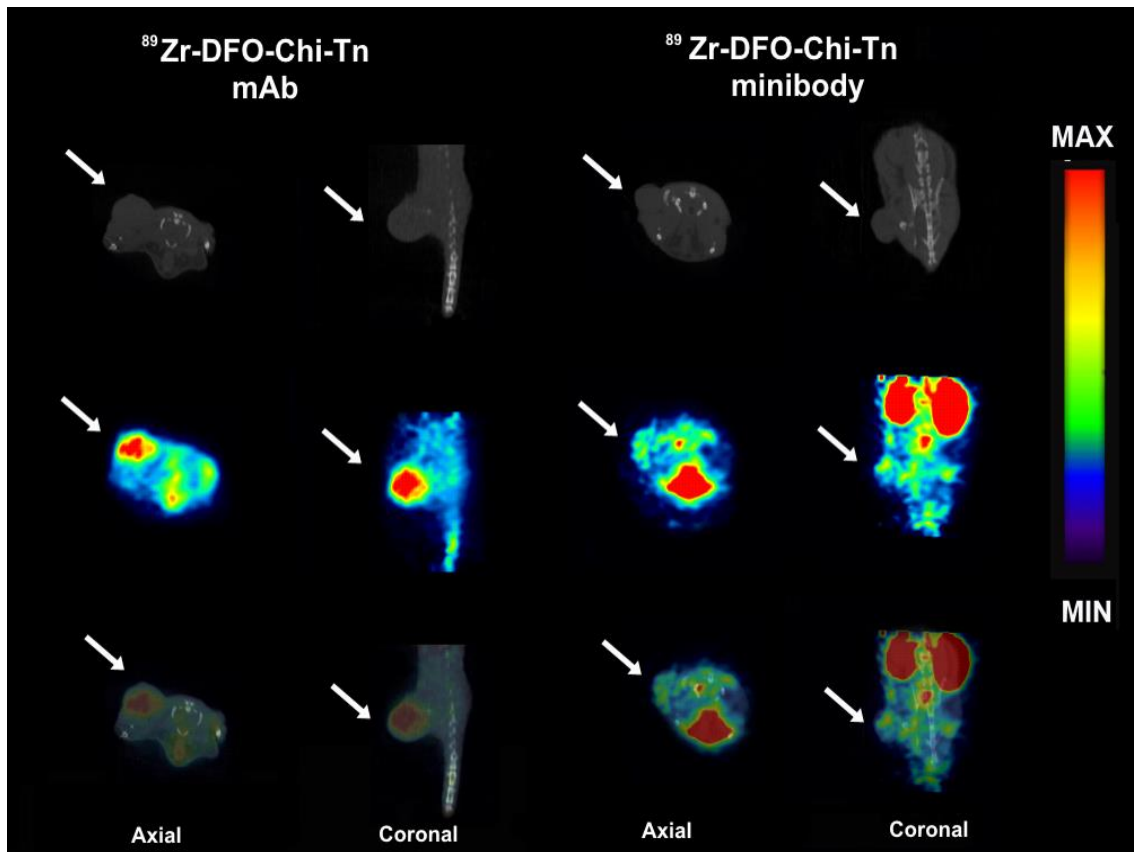


Figura 41. Imágenes de la tomografía CT, PET e imágenes fusionadas de ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn a las 63 horas post-inyección, y de ^{89}Zr -DFO-minibody a las 18 horas post-inyección. La flecha blanca indica la localización tumoral.

La captación fue basada en una proporción entre recuentos en las regiones del músculo y el tumor, considerando el recuento medio y máximo de los VOIs (del inglés: *volume of interest*), y fueron presentados individualmente (fig. 42). El promedio de los recuentos medios del VOI de la proporción tumor/músculo para ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn a 23, 50 y 65 horas fueron de 2.86 ± 0.63 , 2.91 ± 0.29 y 2.91 ± 0.29 , respectivamente, mientras que el recuento máximo de VOI fueron de 3.61 ± 0.59 , 3.65 ± 1.07 y 3.54 ± 0.61 . No se vio diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en test de ANova, al comparar el mismo grupo.

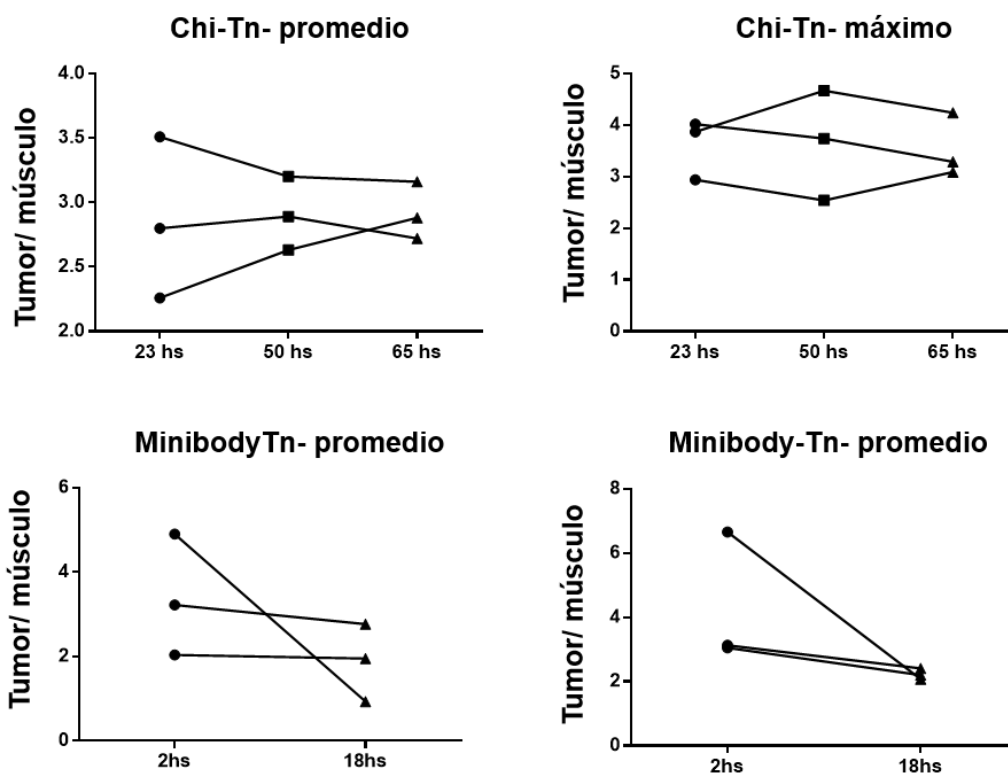


Figura 42. Representación de la captación del ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn mAb y del ^{89}Zr -DFO-Mini-Tn en una relación tumor/músculo, basado en el número obtenido por los VOIs, en diferentes tiempos de toma de imágenes.

Se demostró una proporción tumor/músculo de $2,86 \pm 0,63$, $2,91 \pm 0,29$ y $2,92 \pm 0,22$ para el anticuerpo ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn, en el análisis semi-cuantitativo de las imágenes PET en las regiones de interés. Para el ^{89}Zr -DFO-minibody-Tn, los valores fueron de $3,39 \pm 1,44$ y $1,88 \pm 0,92$, para recuentos promedios, y $4,28 \pm 2,01$ y $2,23 \pm 1,17$, para recuentos máximos, a las 2 y 18 horas PI respectivamente. Los valores no presentaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) por el test de Student.

Biodistribución ex vivo de ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn y ^{89}Zr -DFO-minibody

La biodistribución y cuantificación ex vivo demostró valor de $13,51 \pm 2,26$ a las 63 horas para el ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn y de $3,02 \pm 0,56$ a las 18 horas para el ^{89}Zr -DFO-minibody, como promedio del porcentaje inyectado por gramo (%ID/g) (tabla 6). A los mismos tiempos y respectivamente, los valores de tumor/músculo mostraron un contraste favorable señal/señal de fondo de $5,33 \pm 0,16$ y $3,99 \pm 1,45$, y $3,99 \pm 1,45$. Para el minibody, las proporciones de tumor/sangre mostraron un valor de $3,71 \pm 0,69$, mientras que para el Chi-Tn los valores no fueron tan buenos, $0,83 \pm 0,16$.

Tabla 6. Biodistribución de ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn y ^{89}Zr -DFO-minibody-Tn en tumores de pulmón derivados de células A549 en ratones nude, a las 65 horas y 18 horas post-inyección (PI) (n = 3 para cada grupo) respectivamente. Los valores están expresados en porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g) y presentado como promedio +/- SD.

| | ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn | ^{89}Zr -DFO-minibody |
|-------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Sangre | 16.27 ± 1.40 | 0.81 ± 0.02 |
| Corazón | 6.67 ± 0.43 | 3.18 ± 0.71 |
| Pulmones | 10.64 ± 1.29 | 3.04 ± 0.61 |
| Bazo | 7.99 ± 1.33 | 19.29 ± 5.38 |
| Región tiroidea | 6.06 ± 1.89 | 1.79 ± 0.23 |
| Cerebro | 0.47 ± 0.03 | 0.04 ± 0 |
| Hígado | 4.67 ± 0.08 | 12.95 ± 1.94 |
| Estómago | 2.84 ± 0.45 | 1.39 ± 0.23 |
| Intestino grueso | 3.44 ± 0.23 | 1.79 ± 0.52 |
| Intestino delgado | 3.54 ± 0.41 | 2.01 ± 0.33 |
| Riñón | 6.49 ± 0.76 | 68.59 ± 4.98 |
| Vejiga | 13.96 ± 2.50 | 5.15 ± 1.65 |
| Músculo | 2.55 ± 0.49 | 0.80 ± 0.19 |
| Hueso | 7.6 ± 3.29 | 9.26 ± 4.90 |
| Tumor | 13.51 ± 2.26 | 3.02 ± 0.56 |
| Tumor/sangre | 0.83 ± 0.16 | 3.71 ± 0.69 |
| Tumor/músculo | 5.33 ± 0.16 | 3.99 ± 1.45 |

Imágenes de auto-radiografía

Las imágenes de auto-radiografía de las secciones de 30 μm del tumor mostraron una distribución heterogénea a lo largo del tumor. El ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn mostró una alta captación en el centro del tumor, mientras que para el ^{89}Zr -DFO-minibody, se localizó principalmente en la región periférica (fig. 43).

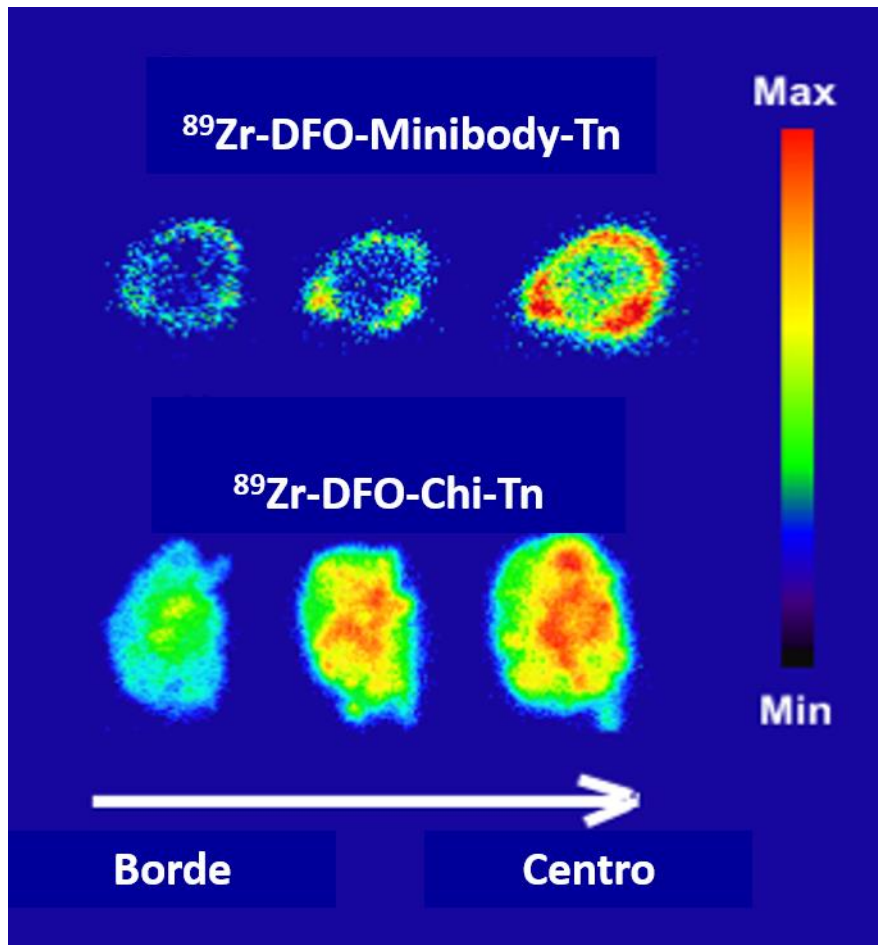


Figura 43. Auto-radiografía de las secciones tumorales luego de la administración de $^{89}\text{Zr-DFO-minibody}$ (18 horas) y $^{89}\text{Zr-DFO-Chi-Tn}$ (63 horas).

Discusión

Diseño de un fragmento de anticuerpo

Los anticuerpos monoclonales han sido considerados herramientas de diagnóstico y terapia potentes que, gracias a los desarrollos en biología molecular, han logrado ser candidatos “estrella” para el mercado inmuno-terapéutico. Debido a su capacidad de unión específica a un antígeno determinado, sus aplicaciones se extienden a herramientas de investigación en inmuno-ensayos (Western blot, o citometría de flujo, por ejemplo), aplicaciones en métodos diagnósticos, en terapia, y purificación de proteínas (Gao, Huang, Zhu, & Lv, 2018).

El creciente interés en este tipo de moléculas se debe a que cada vez es mayor el entendimiento que se tiene de las enfermedades a un nivel molecular. Los anticuerpos monoclonales son en general la ruta más rápida para una prueba de concepto cuando se tiene un nuevo blanco molecular para inhibir, activar o bloquear el mismo (Ecker et al., 2015).

Dado el crecimiento sostenido del mercado asociado a anticuerpos con aplicaciones biomédicas, es que se presenta una oportunidad para generar nuevos métodos, tecnologías, o diseños que permitan reducir el costo de producción y generar nuevos sistemas más eficientes para penetrar nuevos mercados. En este sentido, se han explorado diversos sistemas de expresión, diseños innovadores de fragmentos de anticuerpos, así como nuevos métodos de producción y purificación.

La miniaturización de los anticuerpos a través de diseños de fragmentos de los mismos permite contar con ventajas biológicas. La principal diferencia es el tamaño, donde los fragmentos pueden llegar a tamaños que logren una mejor difusión y penetración en los tejidos tumorales. Además, fragmentos que no cuenten con glicosilación podrían ser expresados en sistemas procariotas los cuales son más eficientes en términos de tiempo y costos en la producción de la proteína de interés. Por otro lado, tamaños menores a los 60kDa y sin una región Fc permiten una rápida eliminación a través de las vías renales sin una activación inmune. Este tipo de fragmentos se adaptan bien para aplicaciones de diagnóstico (Goulet & Atkins, 2019).

La importancia de estas moléculas y sus fragmentos en el área biomédica, se evidencia del hecho que, en el año 2017, existían 575 moléculas basadas en anticuerpos candidatas en ensayos clínicos en fase I y II. De esas, 493 eran IgGs, y 13 eran

fragmentos de anticuerpos. A su vez, el 62% de las proteínas y candidatos recombinantes que se producen son contra antígenos oncológicos (Strohl, 2018).

Para el diseño de fragmentos de anticuerpos se debe tener en cuenta diversos factores: sistemas de expresión, vectores de expresión, y métodos de purificación. Cuando la proteína recombinante a expresar no contiene modificaciones post-traduccionales, el sistema de expresión más utilizado es *E. coli*, por ser de bajo costo, rápido crecimiento, la capacidad de alcanzar altas densidades celulares, facilidad en su manipulación genética, y por contar con un sistema genético muy bien conocido (Spadiut et al., 2014).

En particular, los minibodies son formatos que se cuentan con los dominios VH y VL del anticuerpo entero unidos a través de una región bisagra al CH3. La presencia del dominio constante de la inmunoglobulina (CH3) permite la dimerización de la molécula aumentando así su avidéz. Esto genera fragmentos de anticuerpos de tamaños intermedios, que podrían tener aplicaciones tanto para diagnóstico como terapéuticos (Olafsen et al., 2004). En trabajos anteriores, se expresaron minibodies con especificidad a moléculas blanco asociadas al cáncer, demostrando buenos niveles de captación tumoral, y tiempos de eliminación menores que el anticuerpo entero pero mayores que fragmentos como los scFv (Hu et al., 1996; Knowles et al., 2014; Leyton et al., 2008; Olafsen et al., 2009; Tavaré et al., 2014).

Previamente, en nuestro grupo de investigación, se generaron anticuerpos y fragmentos de los mismos anti-Tn a partir del anticuerpo IgM 83D4. El primer fragmento del 83D4 generado fue un scFv anti-Tn el cual fue expresado en *E. coli* con la proteína de fusión MBP. El mismo consistía en las regiones variables pesada y liviana (VH-VL) unidos por un linker estándar (Gly4Ser3)₂ (Babino et al., 1997). El scFv-Tn tuvo que ser expresado con una proteína de fusión (MBP) para obtenerlo de manera soluble. Esto demuestra que las regiones VH y VL de éste anticuerpo presenta cierto grado de hidrofobicidad que pudo ser sobrellevada con la co-expresión de la proteína MBP. Por otro lado, dicho fragmento de anticuerpo presentó una baja avidéz por su naturaleza monomérica.

Luego, se realizó un clonado molecular y expresión de un anticuerpo quimérico conteniendo la región variable VH y V_k del 83D4 y la región constante de una IgG1 humana. El mismo fue expresado en sistemas eucariotas, en la línea celular murina X-63, las cuales fueron transfectadas con posterior obtención de clones estables (Pablo Oppezzo et al., 2000). El Chi-Tn cuenta con una alta avidéz, reconocimiento del

antígeno en contextos tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que demostró ser una herramienta de gran interés en aplicaciones terapéuticas.

Sin embargo, su peso molecular (~150kDa) no permite que sea el mejor candidato para aplicaciones imagenológicas. En este sentido se diseñó un diabody-Tn a partir de la secuencia de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 83D4, el cual es un fragmento de anticuerpo que consiste en dos scFv dimerizados. El mismo fue expresado de forma recombinante en sistemas procariotas y eucariotas. En *E. coli*, la expresión fue llevada a cabo con proteínas de fusión, y en distintas cepas, así mismo, la expresión fue en la fracción insoluble. Se realizaron técnicas de re-solubilización aunque sin éxito. Se logró purificar el diabody-Tn de forma soluble en las células de *Drosophila melanogaster* S2. Sin embargo, se obtuvieron dos poblaciones del Diabody Tn, una monomérica y otra dimérica, y las mismas presentaron una baja afinidad por el antígeno, donde varias moléculas tendrían que interaccionar de forma cooperativa para poder retener la molécula de aOSM. (Schvartzman, 2015).

Dado el interés por el antígeno Tn en cáncer y la trayectoria del grupo en el diseño de anticuerpos y fragmentos de los mismos, es que se presenta la oportunidad de generar un minibody-Tn. Este tipo de fragmento de anticuerpo cuenta con un tamaño intermedio, con potencial aplicación tanto en imagenología como en terapia. Además, su capacidad de dimerizar permite una mayor avidéz por el antígeno, en comparación con otros fragmentos de anticuerpos. La falta de las regiones CH1 y CH2 hace que la molécula no genere una respuesta inmunológica, lo que lo hace apto para aplicaciones en imagenología.

En este trabajo, se diseñaron tres minibodies (fig. 44) y se expresaron de forma recombinante en tres sistemas de expresión diferentes, con el fin de analizar su aplicabilidad en imagenología molecular por inmuno-PET. La secuencia de los fragmentos de anticuerpo anti-Tn, se diseñaron a partir de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) y la cadena liviana (VL) del anticuerpo monoclonal quimérico Chi-Tn, generado en un trabajo previo en nuestro grupo de trabajo (Oppezzo et al., 2000).

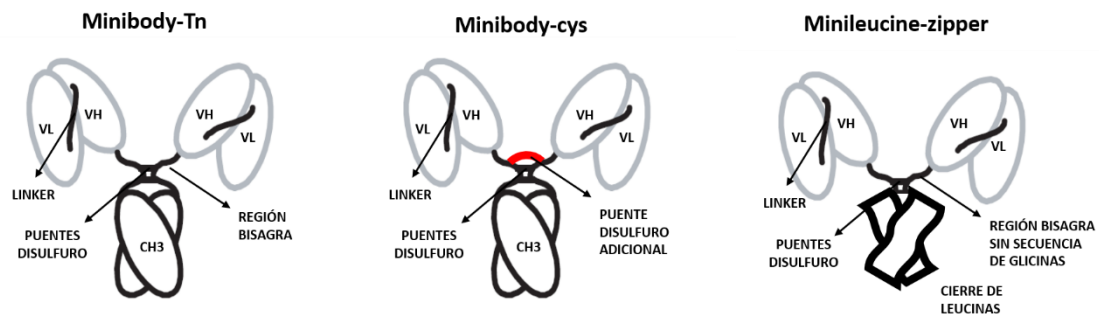


Figura 44. Esquema representativo de la estructura de los tres minibodies.

En el minibody-Tn, las regiones VH y VL están unidas al dominio CH3 de la inmunoglobulina IgG1 humana a través de una región bisagra, y a su vez, unidas entre sí a través de un *linker* de 18 aminoácidos (GSTSGSGKPGSGEGSTKG). Dicho *linker* mostró conferir mayor estabilidad y solubilidad al fragmento de anticuerpo frente a la clásica secuencia de linker de G4S3 (GGGSGGGSGGGGS) en el trabajo previo de Kim y colaboradores (Kim et al., 2014). Si bien en trabajos anteriores donde se expresaron fragmentos de anticuerpo del tipo minibody, los *linkers* fueron el G4S3, elegimos la secuencia de 18 aminoácidos porque fue el elegido para el diseño un minibody derivado del anticuerpo entero Cetuximab que logró ser expresado en sistemas procariontes conservando su funcionalidad.

Por otro lado, la secuencia de la región bisagra también fue adaptada de los trabajos de Kim y Klement, teniendo en cuenta resultados previos donde se demuestran el impacto que puede tener la secuencia y el largo de la región bisagra. Es una zona que le brinda libertad de rotación a fragmentos de anticuerpos bivalentes y cuanto más flexible (rica en glicinas) y larga, mayor probabilidad de unión al antígeno (Klement et al., 2015). Se eligió incorporar a la secuencia del minibody la región bisagra LEPKSCDKTHTCPPCGGSSGGGSG de 25 aminoácidos, donde se cuenta con una extensión flexible rica en glicinas a la secuencia de una región bisagra de la inmunoglobulina humana IgG1 para alcanzar una mayor probabilidad de unión al antígeno.

Las proteínas de fusión actúan como potenciadores de solubilidad, y la proteína de interés es clonada en la región C-terminal de la misma. La expresión se da de forma conjunta, y luego de la purificación, la proteína de fusión es extraída a través de un sitio de corte proteolítico incluido en la región N-terminal del minibody. De esta manera, se puede expresar de forma soluble y correctamente plegada la proteína recombinante de interés (Agustín Correa et al., 2014).

Este primer diseño del minibody (minibody-Tn) fue clonado en vectores de expresión para sistemas procariotas con el fin de evaluar la efectividad de su expresión. Para eso, se probaron los dos compartimentos celulares como sitio de expresión (citoplasma y periplasma) y diferentes proteínas de fusión.

La expresión en citoplasma del minibody-Tn fue evaluada tanto sin proteína de fusión, como con 2 proteínas de fusión, probando además 2 cepas de *E. coli*, Rossetta y Shuffle pMJS9. Las proteínas de fusión fueron MBP, TRX y la expresión en citoplasma sin proteína de fusión mostró ser en la fracción insolubles (en la cepa Rossetta), mientras que con las proteínas MBP y TRX se obtuvo al minibody-Tn de forma soluble (en ambas cepas). Esto confirma que expresar la proteína recombinante acompañada de una proteína logró aumentar su solubilidad.

Sin embargo, el minibody-Tn no tuvo un correcto plegamiento, afectando así su estado conformacional. Si bien se utilizó la cepa de *E. coli* Shuffle pMJS9, la cual favorece la formación de puentes disulfuro en el citoplasma, no fue suficiente para que el minibody-Tn adquiriera un estado dimérico. Esto también puede deberse a que el mismo fue expresado con una proteína asociada, la cual podría afectar el plegamiento.

Dado esto, se intentaron técnicas de estabilización a través del agregado de aditivos como ser arginina entre otros y posterior evaluación por cromatografía de exclusión molecular luego del clivado de la proteína de fusión. Los resultados mostraron una conformación agregada del minibody-Tn por lo que no se logró expresar el mismo en el citoplasma de *E. coli* en su estado dimérico, ni estabilizarlo posteriormente mediante el uso de aditivos.

Debido a que en trabajos anteriores la expresión de fragmentos de anticuerpo se da en el periplasma de *E. coli* (Akbari, Mir Mohammad Sadeghi, Jafrian-Dehkordi, Abedi, & Chou, 2014; Chi et al., 2016; Schlegel et al., 2013), se expresó el minibody-Tn en dicho compartimento de la cepa BL21 utilizando la secuencia señal pelB. La misma dirige la proteína recombinante al periplasma de la bacteria, donde luego el péptido señal es clivado por la proteasa TEV.

La expresión en periplasma fue de 72 horas, un tiempo mayor al de la expresión en citoplasma, ya que se indujo la expresión proteica a una temperatura menor, y con menor cantidad de inductor. Esto debido a que, a menor temperatura, más bajo es el metabolismo de la bacteria, así como la utilización de una concentración del inductor menor, de modo de lograr una expresión lenta y evitar saturar la maquinaria de translocación. Estos cambios podrían mejorar el plegamiento de la proteína

recombinante, ya que fue lo que no se logró en la expresión citoplasmática. El inconveniente de la expresión en periplasma es el espacio reducido del compartimento, lo que impacta en la cantidad de proteína que se pueda extraer.

Para la purificación se realizó un shock osmótico para extraer la fracción periplasmática, y luego el protocolo consistió en la misma estrategia seguida previamente mediante el *tag* de histidinas en columnas de imac. El minibody-Tn se expresó de forma soluble, aunque no se logró un correcto plegamiento de la proteína, ya que al analizar la fracción de purificación de IMAC por cromatografía de exclusión molecular, el estado conformacional mostró ser agregado.

Por lo tanto, no se logró obtener el minibody-Tn con un correcto plegamiento en los sistemas de expresión procariota. Se eligió inicialmente este sistema ya que, al ser el minibody un fragmento de anticuerpo, no cuenta con glicosilaciones pos-traduccionales. El estado dímérico se ve favorecido por la formación de puentes disulfuro, por lo que se utilizó la cepa Shuffle pMJS9 y también la expresión en periplasma, el cual es un ambiente oxidante. El plegamiento incorrecto puede deberse a que las isomerasas de *E. coli* no fueron eficientes en generar una conformación adecuada de la proteína.

Para sobrepasar los inconvenientes de plegamiento, se generaron dos variantes del minibody-Tn, el minileucine-zipper y el minibody-cys. El primero consistió en sustituir el dominio CH3 por un cierre de leucinas, y el segundo consistió en generar una mutación puntual para adquirir un puente disulfuro extra en la región bisagra. Ambos fueron evaluados en las mismas cepas y con las mismas proteínas de fusión que el minibody-Tn.

El minileucine-zipper tiene un cierre de leucinas que favorece la dimerización entre las uniones covalentes de las alfa hélices de las leucinas. Trabajos anteriores expresaron scFv-leucinezipper en sistemas procariotas de forma efectiva (Klement et al., 2015; Z. Li et al., 2015). Para este constructo también se modificó la secuencia de la región bisagra siguiendo la estrategia de Klement y colaboradores. Dicha región consistió en 10 aminoácidos, ahora sin la región flexible (PKPSTPPGSS) (Klement et al., 2015). Si se observan las distintas fracciones de la cromatografía de exclusión, se pudo detectar la presencia de la proteína en distintos volúmenes de elución para las cepas y proteínas de fusión evaluadas. Se observó lo mismo para el caso de la expresión en periplasma.

Si bien en trabajos anteriores este diseño con cierre de leucinas favoreció la estabilidad del dímero, para el minibody no se obtuvo el mismo resultado. El estado conformacional pudo verse afectado más que favorecido por la nueva región incorporada. Además, la

funcionalidad de las distintas fracciones evaluadas fue menor que el minibody-Tn en los test de ELISA. En todos los casos la molécula adquirió estados conformacionales con pesos moleculares superiores al peso esperado en su conformación dimérica. Cabe considerar que cada proteína tiene un comportamiento diferente, y quizás los dominios VH y VL del minibody no se adaptan al diseño con el cierre de leucinas.

Para el constructo minileucine-zipper, los rendimientos fueron bajos y la diversidad oligomérica mostraría que no estaría muy bien plegada, por eso no se continuó utilizando dicho formato. Si bien la parte hidrofílica del cierre de leucinas queda expuesto al solvente, los dominios VH y VL de este fragmento son hidrofóbicos, ya que en sus diseños previos (scFv y diabody), se debió de superar la insolubilidad en sus estrategias de expresión y purificación.

Como una segunda estrategia de conferir una mayor estabilidad a la molécula y lograr una expresión en sistemas procariotas, es que se agregó una cisteína para favorecer la formación de un puente disulfuro adicional en la región bisagra. Para este constructo sólo se probó su expresión en la cepa Shuffle pMJS9 de *E. coli* con la proteína de fusión MBP, ya que fue la condición que mostró mejores resultados para el minibody-Tn.

Los resultados fueron que el minibody-cys siguió expresándose de forma soluble, aunque con un estado conformacional agregado. La adición de un puente disulfuro no fue suficiente para una formación correcta del dímero, quizás por lo mencionado previamente. El sistema de plegamiento de proteínas de *E. coli* no se adapta a las necesidades del minibody-Tn y sus variantes.

El primer método de expresión de proteínas recombinantes suele ser *E. coli* dado su bajo costo, tiempos cortos y simplicidad del sistema. Sin embargo, cuando la expresión en dicho sistema genera proteínas insolubles, mal plegadas o disfuncionales, se consideran los sistemas de expresión eucariotas. Los mismos pueden ser células de insectos o de mamíferos, y tienen como ventaja sistemas de plegamiento, secreción y modificaciones pos-traduccionales de proteínas avanzados (Jäger et al., 2013).

Las células de mamífero HEK 293T han sido utilizadas para la producción de anticuerpos tanto en laboratorios de investigación como con fines clínicos. Son células que crecen en suspensión y son capaces de ser transfectadas de manera transitoria, alcanzando altos niveles de expresión proteica. Los vectores con promotor CMV (citomegalo virus human) son los más utilizados con una fuerte actividad transcripcional (Vink et al., 2014).

En este sentido, el minibody-Tn también fue expresado en sistemas eucariotas, en las células de mamífero HEK 293T y en las células de insecto S2 de *Drosophila melanogaster*. Estos sistemas tienen como ventaja la capacidad de contar con modificaciones pos-traduccionales adecuadas para la expresión de proteínas de origen eucariota. En el caso de las células HEK 293T, se llevó a cabo una expresión transitoria, donde no se generan clones estables con el vector de interés, lo que permite acortar los tiempos de producción proteica.

La expresión en HEK 293T fue evaluada en distintos tiempos y en dos relaciones diferentes de ADN (vector de expresión con la secuencia del minibody-Tn): PEI, ya que el PEI (polietilenimina) permite la adhesión del ADN a la superficie de las células al cargar positivamente al mismo. Además, permiten una eficiencia de transfección del 70% aproximadamente en células HEK 293T, así como un mayor rendimiento de proteína recombinante en comparación con otros reactivos comerciales (Jäger et al., 2013). Así, los complejos ADN: PEI son endocitados por las células, y el ADN es liberado en el citoplasma (Longo, Kavran, Kim, & Leahy, 2014).

Las relaciones ADN: PEI que se testearon fueron 1:20 y 1:10 considerando experimentos anteriores del grupo de investigación. El vector de expresión pCMV contaba con una fusión Fc (dominios CH2 y CH3), lo cual, según trabajos anteriores, ayuda a obtener mayores niveles de la proteína expresada y permite la purificación por proteína A (Lo et al., 2002). La proteína recombinante es secretada al medio de cultivo, por lo que se analizaron los sobrenadantes en diferentes tiempos de expresión mediante test de ELISA y para las dos condiciones probadas. No se obtuvo señal que demostrara la actividad del minibody-Tn en los sobrenadantes, ni se logró purificar proteína recombinante mediante columna con proteína A.

La verificación de la secuencia del minibody-Tn clonada en el vector de expresión fue seleccionando colonias positivas para el inserto y verificada por secuenciación. La no detección del minibody-Tn en este sistema de expresión podría deberse a que la transfección transitoria no haya sido exitosa, es decir, que el vector no haya ingresado a las células, o, en otro escenario, que el vector haya ingresado correctamente a las células, y que el minibody luego de ser expresado se haya degradado. Este último caso podría ocurrir ya que el minibody-Tn es expresado y secretado al medio de cultivo y eso lo expone a temperaturas (37°C) que podrían afectar la integridad de la molécula.

Por otro lado, al faltarle varios dominios tipo inmunoglobulina (CH1, CH2 y CL) puede ser menos estable que su contraparte quimérica, correctamente expresada y secretada en células de mamífero.

Las células de insectos también son muy utilizadas en la expresión de proteínas recombinantes que requieran modificaciones pos-traduccionales complejas. Las células S2 de *Drosophila melanogaster* son derivadas de un estadio embriológico tardío, y se pueden generar una línea policlonal estable que luego tienen un proceso de escalado sencillo. Pueden ser transfectadas con vectores con promotores inducibles lo que permite bio-procesos de alto rendimiento (Moraes et al., 2012).

Las células S2 han demostrado ser un sistema de expresión efectivo para proteínas recombinantes, entre ellas anticuerpos, ya que se pueden cultivar a menores temperaturas que las células de mamífero, por ejemplo (26-28°C), sin CO₂ y son cultivos fáciles de escalar. Debido a que crecen en suspensión, alcanzan altas densidades celulares, lo que a su vez permite un mayor rendimiento de producción proteica, en comparación con otros sistemas de expresión eucariota (Iwaki & Castellino, 2008; Moraes et al., 2012).

Algunas proteínas con aplicaciones clínicas ya fueron producidas en las células S2, como son las subunidades truncadas de la proteína de cápside viral DEN2-80E, un fragmento de anticuerpo-Fc anti GA733-2 (antígeno de cáncer colo-rectal humano), la glicoproteína 90K (K. R. Kim, Kim, Cheong, Kim, & Cha, 2013; Moraes et al., 2012; Seok et al., 2010). Las células S2 se presentan como una plataforma de expresión para proteínas con aplicación terapéutica con un alto nivel de producción y menor costo en comparación con otros sistemas de expresión eucariotas, con la ventaja de contar con una maquinaria pos-traducciona compleja (Park et al., 2008; Vatandoost & Bos, 2016).

El minibody-Tn fue clonado en el vector de expresión pDroExt para ser expresado en las células S2 de *Drosophila melanogaster*. Para estas células se generó un conjunto de células poli-clonal con el vector de interés. El vector pDroExt contiene una señal de exportación BiP (señal perteneciente a *D. melanogaster*) para la secreción de la proteína recombinante, por lo que el minibody-Tn fue secretado al medio de cultivo. Además, contiene el promotor de la metalo-tioneina (pMT de *Drosophila*), el cual permite la inducción de la expresión proteica con el agregado de metales divalentes. La expresión fue inducida con cloruro de cadmio, y el minibody-Tn fue detectado a los 3 días de inducción, y hasta el día 10. A éste último tiempo pos-inducción se detectó menor

cantidad de proteína en los sobrenadantes. En las células S2 se logró expresar el minibody-Tn de forma soluble y homogénea.

El minibody-Tn fue expresado en las células S2 con una conformación dimérica y un estado funcional. Esto fue verificado mediante test de ELISA y cromatografía de exclusión molecular, donde la molécula eluyó en un volumen que coincide con el de proteínas con pesos moleculares cercanos a los 85 kDa. Además, se observó un pico único de elución, así como una banda única en el gel de poliacrilamida. Esto indica un método de purificación limpio, donde se extraen las proteínas que no son de interés, y que la molécula adquiere un único estado conformacional. Por otro lado, se confirmó que la formación de puentes disulfuro estabilizan la formación del dímero al realizar un gel de poliacrilamida con agente reductor y sin agente reductor. Viendo que la banda correspondiente al minibody cambiaba de peso molecular al añadirle un agente reductor, se demuestra la formación de puentes disulfuro.

El primer paso de purificación es mediante la columna Streptactin XT ya que el constructo cuenta con un Twin-strep-tag en el amino-terminal del minibody-Tn, y se une con una alta afinidad a la matriz de la columna. En el caso del minibody-Tn, se utilizó un twin-strep-tag, el cual aumenta la eficiencia de purificación con respecto al strepTag II, ya que tiene mayor afinidad en la unión a la matriz de la columna (Ivanov, Bašić, Varjosalo, & Mäkinen, 2014).

Si bien el minibody-Tn cuando es expresado en las células S2 es secretado al medio de cultivo, el mismo está a 28°C, la cual es menor a la temperatura del medio de cultivo de las células HEK 293T. El tiempo pos-inducción que se mantiene el cultivo de S2 hasta la purificación es de 6 días, el cual fue puesto a punto. Hasta ese tiempo, la funcionalidad de la proteína no se vio afectada. Sin embargo, al día 10 pos-inducción, se observó una pérdida de funcionalidad en test de ELISA.

Caracterización funcional *in vitro*

La funcionalidad del minibody-Tn fue evaluada primeramente sobre el antígeno purificado. El mismo se obtuvo de la desialilación de una mucina rica en sialil-Tn, exponiendo así al antígeno Tn. Este antígeno fue utilizado para los test de ELISA y para ensayos de resonancia plasmónica de superficie (SPR).

En los test de ELISA, se pudo observar una actividad del minibody-Tn concentración dependiente. Se evaluó un amplio rango de concentraciones, y solo se vio señal

colorimétrica, la cual indica actividad, en las concentraciones más elevadas. De hecho, las unidades de absorbancia no superaron los 0,5 AU (unidades de absorbancia), mientras que, para el anticuerpo entero, se llegó a valores cercanos a 1 AU. Los métodos de revelado son a través de un anticuerpo secundario, anti IgG1 humano policlonal. Dicho anticuerpo se une a los dominios constantes de la IgG.

En este sentido, si consideramos el diseño del minibody, el mismo cuenta solamente con el dominio CH3, mientras que el anticuerpo entero, el Chi-Tn, cuenta con la cadena completa (CH1-CH2-CH3). Esta hace que para el minibody-Tn haya menos sitios de unión disponible para el anticuerpo secundario, el cual a su vez está conjugado a la peroxidasa, y así exhibe menor señal que el anticuerpo entero. Esto no significa directamente que la actividad sea menor. Por lo tanto, realizamos los test de ELISA de forma cualitativa, para evaluar positividad en el reconocimiento del antígeno, sin intenciones de realizar comparaciones cuantitativas con el Chi-Tn.

Con respecto al ensayo SPR, se evaluaron distintas concentraciones del minibody-Tn para observar su comportamiento en la unión con el antígeno. Se comprobó que la disociación completa del minibody se alcanzó en pocos minutos. Tanto el ligando como el analito son multivalentes por lo que resulta muy difícil encontrar un modelo matemático que describa el sistema de forma precisa.

La utilización de un modelo “analito bivalente” es una aproximación útil, aunque no precisa para describir el sistema ya que asume dos sitios de unión por molécula de analito donde el segundo sitio (en nuestro caso idéntico al primero por tratarse de un anticuerpo) interactúa con una afinidad dependiente del primer evento de unión, la flexibilidad de la molécula y de la disponibilidad de ligando. La constante de afinidad obtenida a partir del cociente de las constantes cinéticas del primer sitio (k_{off1}/k_{on1}) arroja un valor de $K_d = 230 \mu\text{M}$, no obstante, el efecto de avididad del minibody interactuando con la asialo-OSM podría contribuir a favorecer la interacción del mismo con el antígeno.

Una segunda etapa fue la caracterización funcional en un contexto celular. Para ello, se realizaron ensayos de caracterización con el anticuerpo Chi-Tn para determinar la positividad de las células para el antígeno. Se seleccionaron 4 líneas celulares, de las cuales dos fueron positivas para el antígeno con el anticuerpo Chi-Tn (MCF-7 y A549), y dos fueron negativas (HCT116 y H838).

Los ensayos en células fueron inmuno fluorescencia indirecta (IF-I) y citometría de flujo. Para ambos casos se utilizó el Chi-Tn como control positivo. En la I-FI, el marcado de las células MCF-7 y A549 con el minibody-Tn y el Chi-Tn fueron similares en intensidad

de fluorescencia y patrón de marcado. Las células HCT116 y H838 fueron negativas para ambos anticuerpos.

En el caso de la citometría de flujo, los resultados fueron concordantes con los resultados de I-FI, indicando una unión específica y un comportamiento comparable entre ambos anticuerpos. Si bien se detectó una baja marcación en las células H838 y HCT116 por parte de los dos anticuerpos (Chi-Tn y Minibody-Tn), esto se puede deber por la diferencia de sensibilidad entre las técnicas.

El minibody-Tn mostró actividad específica, tanto con el antígeno purificado como en un contexto celular. A su vez, el patrón de marcado se asemeja al del anticuerpo entero Chi-Tn, lo que indica que la miniaturización del mismo no afectó su capacidad de reconocimiento por el antígeno específico.

Si consideramos un contexto tisular, tanto el minibody-Tn como el Chi-Tn mostraron actividad en tejidos tumorales provenientes de tumores generados con la línea celular A549. Estos resultados son concordantes con los ensayos celulares de I-FI y citometría de flujo llevados a cabo con la misma línea celular. Si bien las células son las mismas, es relevante analizar la actividad de los anticuerpos en contextos que se aproximen a la conformación de un tumor.

En los ensayos de IHQ, se observó una marcación diferencial entre el minibody-Tn y el Chi-Tn. Este último presentó una localización mayoritariamente nuclear, mientras que el minibody-Tn presentó una localización citoplasmática. Estos resultados llamaron la atención, aunque en ensayos previos en nuestro grupo de investigación ya se habían encontrado indicios de presencia del antígeno Tn en núcleos de células tumorales. En este sentido, se abre una oportunidad para continuar explorando la localización del antígeno y su implicancia en procesos tumorigénicos.

Si bien ambos anticuerpos reconocen el mismo antígeno, el formato y/o conformación tridimensional podrían estar jugando un rol en la identificación de grupos de Tn diferenciales. Esto también ya se observó en ensayos previos del grupo de laboratorio de citometría de flujo, donde el 83D4 (IgM) presentó una marca diferencial en ensayos de citometría de flujo para células Tn+. En dicho caso se detectaban células con una altísima intensidad de fluorescencia, que no fueron detectadas con los anticuerpos derivados Chi-Tn y minibody-Tn.

En este sentido, si bien se había confirmado la positividad de la línea celular A549 para el antígeno Tn, reconocido por el anticuerpo Chi-Tn y Minibody-Tn, fue la primera vez

que se realizó este ensayo en nuestro grupo de investigación. Los resultados en definitiva confirman la actividad de los anticuerpos para el antígeno Tn, a partir de una batería de ensayos *in vitro*, desde el antígeno purificado, pasando por contextos celulares e histológicos.

Caracterización funcional *in vivo*

Una vez confirmada la reactividad del Minibody-Tn en ensayos *in vitro*, se procedió a experimentos *in vivo*. La imagenología molecular se presenta como una forma de detección no invasiva de blancos moleculares, donde los trazadores usados son moléculas radio-marcadas, que son detectadas utilizando cámaras o *scanners*. El PET surge como una técnica de alta sensibilidad y resolución, además de que puede ser utilizada en la modalidad inmuno-PET, donde la molécula radio-marcada es un anticuerpo o derivado del mismo (Wu, 2014). Las tomografías por PET pueden alcanzar una sensibilidad de 10 veces más que en SPECT, por lo que es una técnica que cada vez toma más protagonismo, incluyendo el inmuno-PET (Boswell, C. & Brechbiel, 2007; Warram et al., 2014; Li, et al., 2017).

Para realizar inmuno-PET, el radio marcado debe de coincidir con el período de desintegración del anticuerpo que se pretende marcar. Es decir, para radio marcar un anticuerpo entero IgG, ^{64}Cu (vida media de 12 horas), o ^{89}Zr (vida media de 78,4 horas) son las opciones más razonables. Para el caso de fragmento de anticuerpos, como el minibody, se pueden considerar los mismos radio-marcadores u otros con menor vida media, considerando que los minibodies cuentan con un peso molecular de aproximadamente la mitad del anticuerpo entero. Algunos radio-marcadores podrían ser el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (vida media de 6 horas), o el ^{86}Y (vida media de 14,7 horas) (Boswell, C. & Brechbiel, 2007).

Para analizar la funcionalidad *in vivo* del minibody-Tn y su potencial aplicación en imagenología molecular es que se realizaron ensayos de inmuno-PET en modelos nude de cáncer de pulmón. Los tumores fueron generados con la línea celular A549, previamente analizada en los ensayos *in vitro*. El radio marcador elegido fue el ^{89}Zr , el cual fue utilizado para marcar tanto el minibody-Tn como el Chi-Tn. Trabajos anteriores mostraron buenos resultados en imagenología por inmuno-PET con fragmentos de anticuerpos (minibody y diabody) marcados con ^{89}Zr (K. Li et al., 2014; Pandit-Taskar et al., 2016).

Los resultados obtenidos del inmuno-PET indican que el Chi-Tn presentó una alta captación por parte del tumor lográndose imágenes de alto contraste a las 63 horas. En el caso del minibody-Tn, las imágenes fueron de bajo contraste, con menor captación por parte del tumor, en comparación con el Chi-Tn. Además, se observó una alta captación del minibody-Tn los riñones a los tiempos analizados (18 horas post-inyección).

Dado que el equipo que se utilizó para la toma de imágenes no cuenta con la configuración de corrección de decaimiento para el ^{89}Zr , no se puede determinar los valores de captación estándares, por lo que, para compensar, se determinó la relación tumor/ músculo. Determinado esto, se vio que para ambos anticuerpos la relación tumor/ músculo fue de más de dos veces para los tiempos analizados, lo que implica una buena relación entre la captación por parte del tumor y del tejido muscular circundante. Sin embargo, no se observó un aumento de dicha relación durante el tiempo analizado, como fue reportado en trabajos anteriores (Bailly et al., 2019).

La determinación cuantitativa fue llevada a cabo mediante la escisión de órganos en el tiempo final del experimento (65 horas) para el ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn. Los resultados mostraron que la relación tumor/ músculo fue mayor que cinco veces, indicando un buen contraste. Además, la relación tumor/ sangre fue menor que 1 (Tabla 6), aunque dicho resultado no afectó la calidad de las imágenes, manteniendo un alto contraste y alta captación por el tumor en comparación con tejidos adyacentes. La alta captación por parte de los riñones e hígado a las 18 horas para el ^{89}Zr -DFO-Minibody-Tn alteraron la calidad de las imágenes.

Si bien la vida media teórica de un minibody en circulación es de entre 6-11 horas (Olafsen & Wu, 2010), trabajos previos muestran que se obtienen imágenes con mejor contraste a las 21-24 horas post-inyección (Lepin et al., 2010; Pandit-Taskar et al., 2016; Rochefort et al., 2014).

Por último, los análisis de auto-radiografía mostraron una captación central al tumor por parte del ^{89}Zr -DFO-Chi-Tn, mientras que para el ^{89}Zr -DFO-Minibody-Tn la captación fue principalmente periférica al tumor. Dado que el Minibody-Tn es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de ~85kda, se esperaría que la captación por parte del tumor sea mayor para el Minibody-Tn en comparación con el anticuerpo entero Chi-Tn.

En conclusión, los estudios imagenológicos demostraron que el ^{89}Zr -DFO-Minibody-Tn reconoce las lesiones tumorales en el modelo estudiado. Sin embargo, se podría pensar

en modificar los tiempos de toma de imágenes para lograr un mejor contraste y mayor nivel de captación por parte del tumor, además de considerar otros radio-marcadores, como por ejemplo el ^{64}Cu , el cual se adapta mejor a los tiempos de circulación del minibody (Wu et al., 2000).

Conclusiones finales

En este trabajo se logró el diseño del primer minibody anti-Tn con aplicaciones en imagenología molecular del cáncer. Dicha molécula fue funcional tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando especificidad por el antígeno Tn en todos los contextos analizados.

En este sentido surgen varios caminos donde el minibody-Tn puede tomar protagonismo: como herramienta de investigación para continuar estudiando y buscar comprender el rol del antígeno Tn en procesos tumorigénicos; como una molécula para imagenología molecular del cáncer por inmuno-PET, en carcinomas Tn+; y para aplicaciones inmuno-terapéuticas donde el minibody-Tn podría adquirir un rol de direccionar drogas o nanocarriers a tumores Tn+.

En este proyecto se generó una herramienta biotecnológica que podrá ser explotada en diversos horizontes, y aportar a la biología tumoral y biomedicina tanto en diagnóstico como en la terapia.

Bibliografía

- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 144(November 2017), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>
- Akbari, V., Mir Mohammad Sadeghi, H., Jafriani-Dehkordi, A., Abedi, D., & Chou, C. P. (2014). Functional expression of a single-chain antibody fragment against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(6), 947–956. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1437-0>
- Astray, R. M., Suárez-patiño, S. F., & Calil Jorge, S. A. (2010). *Expression of Viral Envelope Glycoprotein in Drosophila melanogaster S2 Cells*. 601, 103–118. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2>
- Ayyar, B. V., Arora, S., & Shankar, S. (2017). Optimizing antibody expression: The nuts and bolts. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.01.009>
- Babino, A., Pritsch, O., Oppezzo, P., Du Pasquier, R., Roseto, A., Osinaga, E., & Alzari, P. (1997). Molecular cloning of a monoclonal anti-tumor Antibody Specific for the Tn Antigen and Expression of an Active Single-Chain Fv Fragment. *Hibridoma*, 16(4), 317–324. <https://doi.org/10.1089/hyb.1997.16.317>
- Bailly, C., Gouard, S., Guérard, F., Chalopin, B., Carlier, T., Faivre-Chauvet, A., Chérel, M. (2019). What is the best radionuclide for immuno-PET of multiple myeloma? A comparison study between ⁸⁹Zr- and ⁶⁴Cu-labeled anti-CD138 in a preclinical syngeneic model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102564>
- Baral, T. N., & Arbabi-Ghahroudi, M. (2012). Expression of Single Domain Antibodies in Bacterial Systems. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 911, pp. 257–275). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6>
- Bard, F., & Chia, J. (2016). Cracking the Glycome Encoder: Signaling, Trafficking, and Glycosylation. *Trends in Cell Biology*, 26(5), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.004>
- Beuzelin-Yvraut, M., Bourguignat, A., Phillips, E., Roseto, A., & Osinaga, E. (1995). Immunohistological analysis of the Tn associated antigen 83D4 in serous effusions from patients with cancer: Comparison with Tn soluble glycoprotein. *Journal of Clinical Pathology*, 48(5), 433–437. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.5.433>
- Bio-Rad. (2016). Protein A Antibody Purification Handbook.

- Boswell, C., A., & Brechbiel, M. W. (2007). *Development of Radioimmunotherapeutic and Diagnostic Antibodies: An Inside-Out View*. 34(7), 757–778.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.08.003>. Predictive
- Bray, F., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2018). *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). *Review Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle*. (step 3), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chi, W., Kim, H., Yoo, H., Kim, Y. P., & Hong, S. (2016). *Periplasmic Expression, Purification, and Characterization of an Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibody Fragment in Escherichia coli*. 330, 321–330.
<https://doi.org/10.1007/s12257-015-0817-2>
- Chugh, S., Gnanapragassam, V. S., Jain, M., Rachagani, S., Ponnusamy, M. P., & Batra, S. K. (2015). Pathobiological implications of mucin glycans in cancer: Sweet poison and novel targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1856(2), 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.003>
- Correa, A., & Oppezzo, P. (2011). Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in E. coli: Advantages of high-throughput screening. *Biotechnology Journal*, 6(6), 715–730. <https://doi.org/10.1002/biot.201100025>
- Correa, A., & Oppezzo, P. (2015). Overcoming the solubility problem in E. coli: available approaches for recombinant protein production. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1258, pp. 283–291). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5>
- Correa, A., Ortega, C., Obal, G., Alzari, P., Vincentelli, R., & Oppezzo, P. (2014). Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Frontiers in Microbiology*, 5(February), 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00067>
- Crivianu-Gaita, V., & Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 32–45.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>
- Ecker, D. M., Jones, D. S., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 38(February 2015), 1525–1537.
<https://doi.org/10.1172/JCI1103931>
- Emens, L. A., Ascierto, P. A., Darcy, P. K., Demaria, S., Eggermont, A. M. M., Redmond, W. L., Marincola, F. M. (2017). Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *European Journal of Cancer*, 81, 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.035>
- Freire, T., & Osinaga, E. (2003). Immunological and biomedical relevance of the Tn

- antigen. *Immunology*, 22(1), 27–38.
- Freise, A. C., & Wu, A. M. (2015). In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Molecular Immunology*, 67(2), 142–152.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.001>
- Fu, C., Zhao, H., Wang, Y., Cai, H., Xiao, Y., Zeng, Y., & Chen, H. (2016). Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *Hla*, 88(6), 275–286.
<https://doi.org/10.1111/tan.12900>
- Gao, Y., Huang, X., Zhu, Y., & Lv, Z. (2018). A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 39(4), 351–364.
<https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1515775>
- Gebauer, M., & Skerra, A. (2009). *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.627>
- Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2019). Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1–30.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>
- Han, Y., Guo, W., Su, B., Guo, Y., Wang, J., Chu, B., & Yang, G. (2017). High-level expression of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* using an HE-maltotriose-binding protein fusion tag. *Protein Expression and Purification*.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.013>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hee, B., Dong, M., Nam, H., & Hwan, Y. (2011). *Coexpression of molecular chaperones to enhance functional expression of anti-BNP scFv in the cytoplasm of Escherichia coli for the detection of B-type natriuretic peptide*. 1391–1398.
<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0590-5>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126–1136.
<https://doi.org/10.1038/nbt1142>
- Hollingsworth, M. a, & Swanson, B. J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*, 4(1), 45–60.
<https://doi.org/10.1038/nrc1251>
- Hu, S. Z., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L. E., Wong, J. Y. C., Wu, A. M. (1996). Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Research*, 56(13), 3055–3061.
- Ivanov, K. I., Bašić, M., Varjosalo, M., & Mäkinen, K. (2014). One-step Purification of

- Twin-Strep-tagged Proteins and Their Complexes on Strep-Tactin Resin Cross-linked With Bis(sulfosuccinimidyl) Suberate (BS3). *Journal of Visualized Experiments*, (86). <https://doi.org/10.3791/51536>
- Iwaki, T., & Castellino, F. J. (2008). A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection in *Drosophila* Schneider S2 cells expressing heterologous proteins. *Cytotechnology*, 57(1), 45–49. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9129-0>
- Jäger, V., Büsow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A., & Schirrmann, T. (2013). *High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells*.
- Ju, T., Otto, V. I., & Cummings, R. D. (2011). The Tn antigena-structural simplicity and biological complexity. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(8), 1770–1791. <https://doi.org/10.1002/anie.201002313>
- Kanthala, S., Mill, C. P., Riese, D. J., Jaiswal, M., & Jois, S. (2016). Expression and purification of HER2 extracellular domain proteins in Schneider2 insect cells. *Protein Expression and Purification*, 125, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.001>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kim, K. R., Kim, Y. K., Cheong, H., Kim, J. Y. H., & Cha, H. J. (2013). Expression and N-glycan analysis of human 90K glycoprotein in *Drosophila* S2 cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(3), 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.020>
- Kim, Y. P., Park, D., Kim, J. J., Choi, W. J., Lee, S. H., Lee, S. Y., Kang, H. C. (2014). Effective Therapeutic Approach for Head and Neck Cancer by an Engineered Minibody Targeting the EGFR Receptor. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113442>
- Klement, M., Liu, C., Loo, B. L. W., Choo, A. B.-H., Ow, D. S.-W., & Lee, D.-Y. (2015). Effect of linker flexibility and length on the functionality of a cytotoxic engineered antibody fragment. *Journal of Biotechnology*, 199, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.008>
- Knowles, S. M., Tavaré, R., Zettlitz, K. A., Rochefort, M. M., Salazar, F. B., Jiang, Z. K., Wu, A. M. (2014). Applications of immunoPET: using ¹²⁴I-anti-PSCA A11 minibody for imaging disease progression and response to therapy in mouse xenograft models of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 20, 6367–6378.

- <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1452>
- Lauc, G., Pezer, M., Rudan, I., & Campbell, H. (2016). Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(8), 1574–1582. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.016>
- Lepin, E. J., Leyton, J. V., Zhou, Y., Olafsen, T., Salazar, F. B., McCabe, K. E., Wu, A. M. (2010). An affinity matured minibody for PET imaging of prostate stem cell antigen (PSCA)-expressing tumors. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(8), 1529–1538. <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1433-1>
- Leyton, J. V., Olafsen, T., Lepin, E. J., Hahm, S., Bauer, K. B., Reiter, R. E., & Wu, A. M. (2008). Humanized radioiodinated minibody for imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Clinical Cancer Research*, 14(22), 7488–7496. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5093>
- Li, K., Tavaré, R., Zettlitz, K. a, Mumenthaler, S. M., Mallick, P., Zhou, Y., Wu, A. M. (2014). Anti-MET ImmunoPET for Non-Small Cell Lung Cancer Using Novel Fully Human Antibody Fragments. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(11), 2607–2617. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0363>
- Li, Y.-M., Yang, D., & Li, X.-N. (2017). Molecular Imaging in Oncology: Challenges and Opportunities in the Twenty-First Century. *Personalized Pathway-Activated Systems Imaging in Oncology: Principal and Instrumentation*, 1–243. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3349-0>
- Li, Z., Cheng, Y., Xi, H., Gu, T., Yuan, R., Chen, X., Wu, Y. (2015). A novel variable antibody fragment dimerized by leucine zippers with enhanced neutralizing potency against rabies virus G protein compared to its corresponding single-chain variable antibody fragment. *Molecular Immunology*, 68(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.027>
- Lo, K. M., Sudo, Y., Chen, J., Li, Y., Lan, Y., Kong, S. M., Gillies, S. D. (2002). High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Engineering Design and Selection*, 11(6), 495–500. <https://doi.org/10.1093/protein/11.6.495>
- Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M., & Leahy, D. J. (2014). *Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI)*. 227–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5>.Transient
- Ma, H., & O’Kennedy, R. O. (2017). Recombinant antibody fragment production. *Methods*, 116, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.008>
- Mckenzie, E. A., & Abbott, W. M. (2018). Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods*, (January), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.05.013>

- Moradi-kalbolandi, S., & Davani, D. (2016). *Soluble Expression and Characterization of a New scFv Directed to Human CD123*. 1390–1406.
<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1954-y>
- Moraes, Â. M., Jorge, S. A. C., Astray, R. M., Suazo, C. A. T., Calderón Riquelme, C. E., Augusto, E. F. P., Pereira, C. A. (2012a). *Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 613–628.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.009>
- Moraes, Â. M., Jorge, S. A. C., Astray, R. M., Suazo, C. A. T., Calderón Riquelme, C. E., Augusto, E. F. P., Pereira, C. A. (2012b). *Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 613–628.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.009>
- Munkley, J., & Elliott, D. J. (2016). Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget*, 7(23), 35478–35489. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8155>
- Nielsen, J., Baeshen, N. a, Baeshen, M., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(4), 141. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Nishino, M., Hatabu, H., & Hodi, F. S. (2018). Imaging of Cancer Immunotherapy: Current Approaches and Future Directions. *Radiology*, (Fig 1), 181349.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2018181349>
- O’Kennedy, R., Fitzgerald, S., & Murphy, C. (2017). Don’t blame it all on antibodies – The need for exhaustive characterisation, appropriate handling, and addressing the issues that affect specificity. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 89, 53–59.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.01.009>
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
- Olafsen, T., Betting, D., Kenanova, V. E., Salazar, F. B., Clarke, P., Said, J., Wu, A. M. (2009). Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(9), 1500–1508.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060426>
- Olafsen, T., Tan, G. J., Cheung, C.-W., Yazaki, P. J., Park, J. M., Shively, J. E., Wu, A. M. (2004). Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)₂ antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 17(4), 315–323. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh040>
- Olafsen, T., & Wu, A. M. (2010). Antibody Vectors for Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*, 40(3), 167–181. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.12.005>

- Olafsen, T., & Wu, M. A. (2011). *Novel Antibody Vectors for Imaging*. 40(3), 167–181. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.12.005>. Novel
- Oppezzo, P., Osinaga, E., Tello, D., Bay, S., Cantacuzene, D., Irigoín, F., Pritsch, O. (2000). Production and functional characterization of two mouse/human chimeric antibodies with specificity for the tumor-associated Tn-antigen. *Hybridoma*, 19(3), 229–239. <https://doi.org/10.1089/02724570050109620>
- Ortega, C., Prieto, D., Abreu, C., Oppezzo, P., & Correa, A. (2018). Multi-compartment and multi-host vector suite for recombinant protein expression and purification. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01384>
- Osinaga, E., Pancino, G., Beuzelin, M., Babino, A., Rodriguez, D., Robello, C., Roseyo, A. (1992). Detection of a soluble antigen defined by monoclonal antibody 83D4 in serous effusions associated with breast carcinoma. *Cancer*, 69(7), 1745–1749. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920401\)69:7<1745::AID-CNCR2820690716>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920401)69:7<1745::AID-CNCR2820690716>3.0.CO;2-H)
- Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, Cantacuzene D, Nakada Hand Alzari P (2000): Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Lett*. 469:24-8
- Pancino, G., Osinaga, E., Voraucher, W., Kakaouche, A., Mistro, D., Charpin, C., & Roseto, A. (1990). Production of a monoclonal antibody as immunohistochemical marker on paraffin embedded tissues using a new immunization method. *Hybridoma*, 9(4), 389–395. <https://doi.org/10.1089/hyb.1990.9.389>
- Pandit-Taskar, N., O'Donoghue, J. A., Ruan, S., Lyashchenko, S. K., Carrasquillo, J. A., Heller, G., Morris, M. J. (2016). First-in-human imaging with 89Zr-Df-IAB2M Anti-PSMA minibody in patients with metastatic prostate cancer: Pharmacokinetics, biodistribution, dosimetry, and lesion uptake. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(12), 1858–1864. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.176206>
- Park, J. H., Hwang, I. S., Kim, K. II, Lee, J. M., Park, Y. M., Park, C. H., & Chung, I. S. (2008). Functional expression of recombinant human ribonuclease/angiogenesis inhibitor in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Cytotechnology*, 57(1), 93–99. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9126-3>
- Reddy, S., & Robinson, M. K. (2010). Immuno-Positron Emission Tomography in Cancer Models. *Seminars in Nuclear Medicine*, 40(3), 182–189. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.12.004>
- Registro Nacional del Cáncer. (2018). *Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer*. 1–61.
- Rocheffort, M. M., Girgis, M. D., Knowles, S. M., Ankeny, J. S., Salazar, F., Wu, A. M.,

- & Tomlinson, J. S. (2014). A Mutated Anti-CA19-9 scFv-Fc for Positron Emission Tomography of Human Pancreatic Cancer Xenografts. *Molecular Imaging and Biology*, 16(5), 721–729. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0733-4>
- Romer, T., Leonhardt, H., & Rothbauer, U. (2011). Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 882–887. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.007>
- Rusch, T., Bayry, J., Werner, J., Shevchenko, I., & Bazhin, A. V. (2018). Immunotherapy as an Option for Cancer Treatment. *Arch Immunol. Ther. Exp.*, 69, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0491-5>
- Sanmamed, M. F., & Chen, L. (2018). A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization. *Cell*, 175(2), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.035>
- Schlegel, S., Rujas, E., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., Luirink, J., & de Gier, J.-W. (2013). Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-24>
- Schmidt, T. G. M., Batz, L., Bonet, L., Carl, U., Holzapfel, G., Kiem, K., Stanar, K. (2013). Development of the Twin-Strep-tag and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expression and Purification*, 92(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.021>
- Schvartzman, C. (Instituto P. de M. (2015). *Construcción, expresión y caracterización de Diabodies anti antígeno Tn*. Instituto Pasteur de Montevideo.
- Seok, Y. J., Kim, K. II, Yoo, K. H., Hwang-Bo, J., Lee, H. H., Shon, D. H., ... Chung, I. S. (2010). Expression and immunogenicity of a recombinant chimeric protein of human colorectal cancer antigen GA733-2 and an Fc antibody fragment in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5), 1435–1445. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8909-0>
- Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2018). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*, 18(3), 153–167. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>
- Sheikhbahaei, S., Mena, E., Pattanayak, P., Taghipour, M., Solnes, L. B., & Subramaniam, R. M. (2017). Molecular Imaging and Precision Medicine: PET/Computed Tomography and Therapy Response Assessment in Oncology. *PET Clinics*, 12(1), 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2016.08.002>
- Souho, T., Lamboni, L., Xiao, L., & Yang, G. (2018). Cancer hallmarks and malignancy features: Gateway for improved targeted drug delivery. *Biotechnology Advances*, 36(7), 1928–1945. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.001>

- Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., & Herwig, C. (2014). Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.002>
- Springer, G. F. (1984). *T and Tn, General Carcinoma Autoantigens Author (s): Georg F. Springer*. 224(4654), 1198–1206.
- Stowell, S. R., Ju, T., & Cummings, R. D. (2015). Protein Glycosylation in Cancer. *Annual Review Pathology*, 44(12), 3516–3521. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.002813>.Oxidative
- Strohl, W. R. (2018). Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein and Cell*, 9(1), 86–120. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0457-8>
- Tavaré, R., McCracken, M. N., Zettlitz, K. A., Knowles, S. M., Salazar, F. B., Olafsen, T., ... Wu, A. M. (2014). Engineered antibody fragments for immuno-PET imaging of endogenous CD8+ T cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3), 1108–1113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316922111>
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., & Peleg, Y. (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology*, 172(1), 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.016>
- Vatandoost, J., & Bos, M. H. A. (2016). Efficient expression of functional human coagulation factor IX in stably-transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells; comparison with the mammalian CHO system. *Biotechnology Letters*, 38(10), 1691–1698. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2156-6>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., ... Kwon, B. S. (2015). Seminars in Cancer Biology Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Vink, T., Oudshoorn-Dickmann, M., Roza, M., Reitsma, J. J., & de Jong, R. N. (2014). A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods*, 65(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.018>
- Vosjan MJ, Perk LR, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, van Dongen GA. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc*. 2010; 5:739-43. doi: 10.1038/nprot.2010.13
- Warram, J. M., De Boer, E., Sorace, A. G., Chung, T. K., Kim, H., Pleijhuis, R. G., Rosenthal, E. L. (2014). Antibody-based imaging strategies for cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2–3), 809–822. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9505-5>

- Wu, A. M. (2014). Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 14(3), 191–197.
<https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31817b07ae>
- Wu, A. M., Yazaki, P. J., Tsai, S. W., Nguyen, K., Anderson, A. L., McCarthy, D. W., Gambhir, S. S. (2000). High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8495–8500. <https://doi.org/10.1073/pnas.150228297>
- Yamashita, A; Nango, E; Ahikawa, Y. (2017). A large-scale expression strategy for multimeric extracellular protein complexes using *Drosophila* S2 cells and its application to the recombinant expression of heterodimeric ligand-binding of taste receptor. *Protein Science*. <https://doi.org/10.1111/peps.12055>.This
- Zarei, N., & Vaziri, B. (2014). *High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in Pichia pastoris*. 10023–10039. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6071-2>

