

EXPRESIÓN DE LA PORCIÓN SOLUBLE DEL RECEPTOR NEONATAL HUMANO PARA LA FRACCIÓN INMUNOGLOBULÍNICA Fc γ , EMPLEANDO CÉLULAS DE MAMÍFERO

Tolopka Juan Ignacio, Oggero Eberhardt Marcos R., Attallah Carolina V.

Laboratorio de Cultivos Celulares, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: expresión en células de mamífero, porción soluble del receptor neonatal, vida media de anticuerpos terapéuticos

INTRODUCCIÓN

El receptor neonatal para el Fc (FcRn) es una proteína heterodimérica constituida por una cadena transmembrana (cadena α) similar a la molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I), unida en forma no covalente a la microglobulina β_2 (β_2m). La cadena α está constituida por tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), una región transmembrana y un dominio citoplasmático pequeño (Simister y col., 1989; Burmeister y col., 1994).

Aunque el patrón de expresión del FcRn difiere entre especies, generalmente se localiza en células de la barrera hematoencefálica, del epitelio de la vía aérea superior, de riñón, del endotelio vascular y en células presentadoras de antígenos profesionales, así como en otras células de origen hematopoyético (Roopenian y col., 2007). El FcRn se encuentra localizado principalmente en endosomas y tiene la capacidad de unir albúmina sérica (SA) e inmunoglobulina G (IgG) mediante distintos sitios de interacción (Raghavan y col., 1993). Tras ser endocitadas en forma pasiva, la IgG y SA pueden unirse al FcRn en el endosoma tardío, a pH 6,5 o menor. El receptor y su ligando son transportados hacia la membrana plasmática mediante la vía de reciclado de endosomas, donde el incremento de pH, cercano a 7, provoca la liberación del ligando hacia el medio extracelular, rescatándolo así de la degradación lisosomal (Roopenian y col., 2007). Mediante este mecanismo se logra prolongar la vida media de la IgG y de la SA en circulación.

En los últimos años se ha considerado la posibilidad de modular la actividad del FcRn humano (hFcRn) con la finalidad de aumentar las propiedades farmacocinéticas de anticuerpos terapéuticos, proteínas de fusión a Fc y drogas conjugadas a SA. La determinación de la constante de afinidad del hFcRn por sus ligandos permite predecir la vida media plasmática de tales moléculas, por lo que se han desarrollado estudios pre-clínicos basados en esta interacción (Seijsing y col., 2013).

Desde hace unos años, nuestro laboratorio se ha orientado a la obtención de anticuerpos con potencial uso terapéutico, para su empleo en enfermedades relacionadas con un aumento excesivo de la producción endógena de IFN- α . Específicamente, se ha generado una quimera constituida por un fragmento de simple cadena scFv murino anti-IFN- α 2b fusionado a la región Fc de la IgG₁ humana. Y, por otro lado, se ha humanizado el correspondiente fragmento scFv, fusionándolo posteriormente a la mencionada región Fc γ ₁. De este modo, se han generado

Proyecto: CAI+D 2016 (PI: 50420150100006LI): "Generación de nuevos bioterapéuticos antagonistas del interferón- α 2 humano: aplicación de ingeniería de anticuerpos y evaluación de inmunogenicidad"

Director del proyecto: Marcos R. Oggero Eberhardt

Director del becario/tesista: Carolina V. Attallah

moléculas con capacidad de neutralizar al IFN- α 2b y con potencialidad de unir al hFcRn, sobre las cuales se proyecta realizar mutaciones sitio-dirigidas con la finalidad de aumentar su afinidad por este receptor. Debido a la importancia de establecer esta plataforma para nuestro grupo de trabajo, la expresión del hFcRn en forma soluble, obtenido mediante la tecnología del ADN recombinante (rhFcRn), constituye una valiosa herramienta para predecir la vida media plasmática de los anticuerpos terapéuticos en estudio.

OBJETIVOS

Expresar la región soluble del receptor neonatal humano para la porción Fc γ (rhFcRn) en su forma heterodimérica, empleando células de mamífero, a fin de contar con una herramienta para predecir la vida media de anticuerpos terapéuticos.

METODOLOGÍA

Clonado de la región codificante para los dominios extracelulares de la cadena α (α_{sol}) y de la β 2m

A partir de plásmidos enviados a sintetizar oportunamente, se obtuvieron las secuencias de las subunidades α_{sol} y β 2m. La cadena α_{sol} fue digerida con las enzimas XhoI/XbaI y clonada en el vector pCI-neo, que confiere resistencia a neomicina. La β 2m fue digerida con las enzimas XhoI/SalI e incorporada al vector pLVmSA CA5E6, en fase con el marco de lectura de la secuencia señal de la SA modificada (Attallah y col., 2017). Este vector confiere resistencia a puromicina y posee la secuencia codificante para una etiqueta de 6 Histidinas (His6) que se empleó para la detección del fragmento. En este último caso fue necesario chequear la orientación del fragmento β 2m en el vector pLVmSA CA5E6 mediante PCR, empleando un oligonucleótido que hibrida en el vector y otro complementario a la secuencia de interés. El fragmento α_{sol} posee la secuencia señal propia de la subunidad α del hFcRn.

Obtención de líneas estables CHO-K1 y HEK293 por cotransfección con las moléculas de interés y evaluación de la productividad mediante western blot

Se transfectaron células CHO-K1 y HEK293 con las construcciones α_{sol}/β 2m, mediante cotransfección, empleando Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) en la proporción 1:1 y 2:1 de ADN y agente transfectante. Posteriormente, se inició una presión selectiva con cantidades crecientes de antibiótico, empleándose puromicina y neomicina, con el fin de seleccionar aquellas células que hayan incorporado el mayor número de copias de los genes de interés. Las líneas fueron presionadas hasta una concentración de antibiótico compatible con la viabilidad de las mismas. Debido a que la albúmina es un ligando natural del FcRn y podría interferir en su detección, se evaluó la producción de β 2m y α_{sol} mediante SDS-PAGE (**Figura 1.A, Figura 2.A**) seguido de western blot (WB) (**Figura 1.B, Figura 2.B**) en medio libre de suero. Para dichos ensayos se disminuyó gradualmente la concentración de suero fetal bovino en el medio de cultivo hasta lograr esta condición. Por otro lado, fue necesario concentrar los sobrenadantes 8,5 veces, utilizando una membrana de cut-off 10 kDa (PALL), tal como fue descrito por Feng y col. (2011). Para la detección de la β 2m se emplearon anticuerpos anti-His6 y para la detección de la α_{sol} anticuerpos anti-hFcRn α , ambos producidos en conejo. Se reveló el ensayo mediante un método quimioluminiscente, empleando

anticuerpos anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados a HRP (del inglés, *horseradishperoxidase*).

RESULTADOS

Se logró detectar la subunidad $\beta 2m$ mediante WB (**Figura 1.B**) en el sobrenadante concentrado de la línea celular CHO-K1 $\alpha_{sol}/\beta 2m$, generada con la proporción 1:1 de

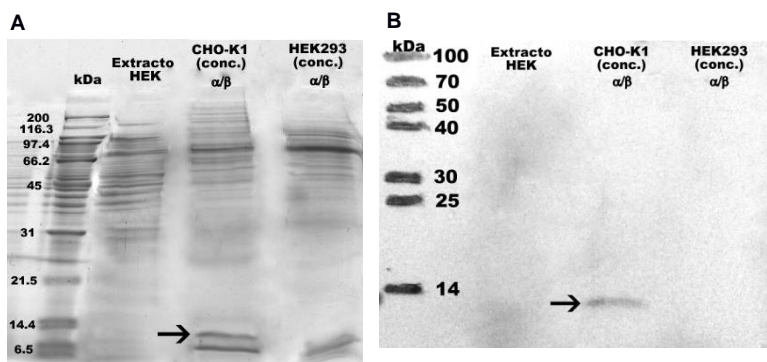


Figura 1: SDS-PAGE (A) y WB (B) para la evaluación de la $\beta 2m$. Las flechas indican el tamaño molecular que se corresponde con la $\beta 2m$:13,5 kDa.

ADN y agente transfectante. No se logró detectar la subunidad α_{sol} . Por otro lado, no se ha logrado observar la expresión de la $\beta 2m$ en la línea HEK293 $\alpha_{sol}/\beta 2m$. A fin de evaluar la acumulación de dicha proteína en la vía secretoria, se preparó un extracto celular mediante ciclos de congelación y descongelación, y se evaluó mediante WB. No se evidenció la $\beta 2m$ en el interior de las células (**Figura 1.B**).

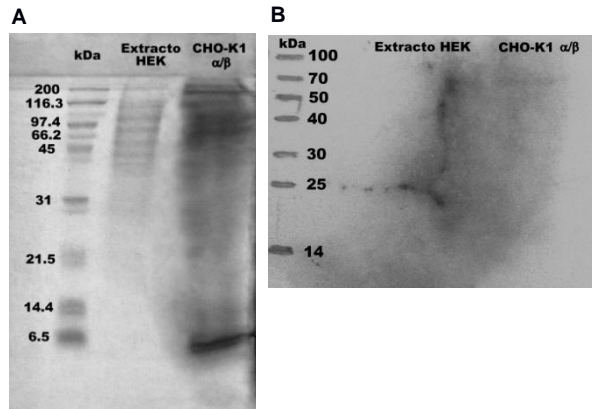


Figura 2: SDS-PAGE (A) y WB (B) para la evaluación de α_{sol} .

CONCLUSIONES

Hasta el momento, no se logró obtener el hFcRn como heterodímero debido a la falta de expresión de la α_{sol} . Existe evidencia de que la sobreexpresión de la $\beta 2m$ dificulta la asociación de ambas subunidades para obtener un FcRn funcional y, en el mismo sentido, está reportada la dificultad en la estequiometría de la expresión de dos moléculas de diferente tamaño. Actualmente, se está trabajando en mejorar la productividad del receptor. Se emplearán sólo células humanas debido a uno de los objetivos del grupo de trabajo, que consiste en la determinación de la constante de afinidad por el rhFcRn de los anticuerpos en estudio (lo expuesto hasta aquí sirve como evaluación de las construcciones generadas).

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Attallah, C., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., Oggero, M.,** 2017. A Highly Efficient Modified Human Serum Albumin Signal Peptide to Secrete Proteins in Cells Derived from Different Mammalian Species. *Protein Expression and Purification*, 132: 27–33.
- Borrok, M. J., Wu, Y., Beyaz, N., Yu, X. Q., Oganessian, V., Dall'Acqua, W. F., & Tsui, P.,** 2015. PH-dependent binding engineering reveals an FcRn affinity threshold that governs IgG recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 4282–4290.
- Burmeister, W.P.; Huber, A.H.; Bjorkman, P.J.,**1994. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*. 372: 379–383.
- Chaudhury, C.; Brooks.C.L.; Carter.D.C.; Robinson.J.M.; Anderson, C.L.,** 2006. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry*. 45: 4983-4990.
- Feng, Y., Gong, R., & Dimitrov, D. S.,** 2011. Design, expression and characterization of a soluble single-chain functional human neonatal Fc receptor. *Protein Expression and Purification*, 79(1), 66–71.
- Gastinel, L. N., Simister, N. E., & Bjorkman, P. J.,**1992. Expression and crystallization of a soluble and functional form of an Fc receptor related to class I histocompatibility molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 638–642.
- Hinton, P. R., Johlfs, M. G., Xiong, J. M., Hanestad, K., Ong, K. C., Bullock, C., Tsurushita, N.,** 2004. Engineered Human IgG Antibodies with Longer Serum Half-lives in Primates. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6213–6216.
- Magistrelli, G., Malinge, P., Anceriz, N., Desmurs, M., Venet, S., Calloud, S., Fischer, N.,** 2012. Robust recombinant FcRn production in mammalian cells enabling oriented immobilization for IgG binding studies. *Journal of Immunological Methods*, 375(1–2), 20–29.
- Raghavan, M., Wang, Y., & Bjorkman, P. J.,**1995. Effects of receptor dimerization on the interaction between the class I major histocompatibility complex-related Fc receptor and IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (November), 11200–11204.
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S.,** 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, (August).
- Schoch, A., Kettenberger, H., Mundigl, O., Winter, G., Engert, J., Heinrich, J., & Emrich, T.,** 2015. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(19), 5997–6002.
- Seijsing, J.; Lindborg, M.; Löfblom, J.; Uhlén, M.; Gräslund, T.,** 2013. Robust expression of the human neonatal Fc receptor in a truncated soluble form and as a full-length membrane-bound protein in fusion with eGFP. *Plos One*. 8 (11): 1–12.
- Simister, N.E.; Mostov, K.E.,**1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*. 337: 184–187.
- Vaughn, D. E., & Bjorkman, P. J.,** 1998. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure (London, England : 1993)*, 6, 63–73.