

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
RESUMEN	IX
SUMMARY	XII
INTRODUCCIÓN	1
1. Interferón alfa	1
1.1. Breve reseña histórica	1
1.2. Nomenclatura y clasificación de los interferones.....	2
1.3. Genes e inductores de la síntesis de IFNs tipo I	3
1.4. Mecanismos de acción	4
1.5. Actividades biológicas asociadas al IFN de tipo I.....	5
1.5.1. Actividad antiviral	5
1.5.2. Actividad antiproliferativa	6
1.5.3. Actividad inmunomoduladora.....	7
1.6. Interferón- α	8
1.6.1. Subtipos de IFN- α	8
1.6.2. Estructura del IFN- α 2	10
1.7. Usos clínicos del IFN- α	12
Tratamiento de enfermedades malignas	13
Tratamiento de enfermedades virales	14
1.8. Efectos nocivos del IFN- α endógeno	14
2. Preparación de un panel de mAbs	16
3. Estructura de los anticuerpos	19
4. Ingeniería de anticuerpos	21
5. Clonado de genes de anticuerpo	21
6. Fragmentos recombinantes de anticuerpo	22
7. Tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos	25
8. Anticuerpos terapéuticos	27
OBJETIVOS Y PLAN DE TESIS	32
1. Obtención y caracterización de mAbs anti-rhIFN- α 2b	32
2. Obtención y caracterización de anticuerpos recombinantes anti-rhIFN- α 2b.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Reactivos y soluciones.....	33

2.	Interferones.....	33
3.	Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales	33
4.	Medios de cultivo	34
4.1.	Medios de cultivo para células de mamífero	34
4.1.1.	Medios de cultivo para hibridomas	35
4.1.2.	Medios de cultivo para células WISH y MDBK.....	36
4.2.	Medios de cultivo para bacterias	36
5.	Mantenimiento de los cultivos de células de mamífero.....	37
6.	Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales.....	38
7.	Criopreservación de células	39
7.1.	Células de mamífero	39
7.2.	Cepas bacterianas	39
8.	Revitalización de líneas celulares	40
8.1.	Células de mamífero	40
8.2.	Cepas bacterianas	40
9.	Preparación de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN-α2b.....	40
	A- Inmunización de ratones	40
	B- Preparación de una capa de células alimentadoras (<i>feeder layer</i>).....	41
	C- Preparación de células para la fusión	41
	D- Fusión celular	42
	E- Selección de hibridomas	42
	F- Monitoreo de anticuerpos específicos anti-rhIFN- α 2b en sobrenadantes de cultivo de hibridomas	43
	G- Clonado de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b	43
10.	Producción y purificación de mAbs anti-rhIFN-α2b	44
10.1.	Producción <i>in vivo</i> de mAbs anti-rhIFN- α 2b	44
10.2.	Purificación de mAbs por cromatografía de afinidad a proteína A	45
11.	Caracterización inmunoquímica del panel de mAbs anti-rhIFN-α2b	46
11.1.	Determinación de la constante de afinidad de los mAbs.....	46
11.2.	Mapeo de los epitopes del rhIFN- α 2b reconocidos por cada mAb.....	52
11.2.1.	Conjugación de los mAbs con biotina	52
11.2.2.	Mapeo de los epitopes del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA de competición	54
12.	Detección y cuantificación del rhIFN-α2b.....	55
12.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y <i>Western-Blot</i>	55
12.2.	Detección del rhIFN- α 2b mediante técnica de <i>Dot-Blot</i>	56
12.3.	Cuantificación del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA <i>sandwich</i> heterogéneo	57
13.	Evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad biológica <i>in vitro</i> del rhIFN-α2b por acción del panel de mAbs.....	59
13.1.	Valoración de la actividad biológica anti-viral <i>in vitro</i> del rhIFN- α 2b	59

13.2.	Neutralización de la actividad biológica anti-viral <i>in vitro</i> del rhIFN- α 2b y del rhIFN- β en presencia de los mAbs	61
14.	Técnicas generales de biología molecular	62
14.1.	Electroforesis en geles de agarosa.....	62
14.2.	Digestiones enzimáticas	63
14.3.	Ligaciones de ADN	63
14.4.	Preparación de bacterias competentes	63
14.5.	Transformación bacteriana	64
14.6.	Extracción plasmídica	65
15.	Obtención de fragmentos scFv a partir de hibridomas productores de mAbs	66
15.1.	Extracción de ARN total.....	66
15.2.	Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes	67
15.3.	Purificación de ARNm a partir de ARN total.....	67
16.	Clonado de los fragmentos scFv en el vector pCANTAB 5E.....	68
16.1.	Síntesis de la primera cadena de ADNc.....	68
16.2.	Amplificación del ADNc: PCR primaria.....	68
16.3.	Ensamblado de las cadenas V_H y V_L : reacción de <i>fill-in</i> y PCR secundaria.....	69
16.4.	Digestión con las enzimas de restricción <i>Sfi</i> I y <i>Not</i> I.....	71
16.5.	Ligación de los fragmentos scFv con el vector pCANTAB 5E y transformación de células TG-1 competentes	72
17.	Selección de fagos portadores de anticuerpos recombinantes que reconocen al rhIFN-α2b.....	72
17.1.	Rescate de la biblioteca de fagos recombinantes	73
17.2.	Precipitación y concentración de los fagos recombinantes.....	73
17.3.	Titulación de los fagos recombinantes	74
17.4.	<i>Panning</i> de los fagos recombinantes empleando antígeno inmovilizado en fase sólida.....	75
17.5.	Infección de células de <i>E. coli</i> TG-1 con la biblioteca de fagos recombinantes seleccionados	75
17.6.	<i>Screening</i> de fragmentos scFv solubles específicos anti-rhIFN- α 2b	76
18.	Preparación de fagos recombinantes a partir de clones productores de fragmentos scFv específicos anti-IFN-α2b	76
19.	Infección de células de <i>E.coli</i> HB2151 y producción de anticuerpos recombinantes solubles.....	77
20.	Purificación de fragmentos scFv solubles mediante cromatografía de afinidad al mAb anti-E tag.....	79
21.	Caracterización de los fragmentos scFv recombinantes	80
21.1.	Determinación de la constante de afinidad.....	80

21.2.	Neutralización de la actividad biológica anti-viral <i>in vitro</i> de diferentes tipos de hIFN- α en presencia de los fragmentos scFv recombinantes	81
22.	Incremento de la afinidad del fragmento scFv CA5E6 mediante mutagénesis al azar	81
23.	Neutralización de la actividad biológica <i>in vivo</i> del rhIFN-α2b por acción del mAb CA5E6	83
	ANEXO A: TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS	86
A.1.	Determinación de la presencia de anticuerpos específicos anti-rhIFN-α2b en el sobrenadante de cultivo de hibridomas o plasma de ratones inmunizados por técnica de ELISA específico indirecto.....	86
A.2.	Determinación del título de mAbs anti-rhIFN-α2b por técnica de ELISA específico indirecto.....	87
A.3.	Determinación de las variedades isotópicas de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas murinas por técnica de ELISA específico indirecto	88
A.4.	Cuantificación de inmunoglobulinas monoclonales por técnica de ELISA <i>sandwich</i>.....	89
A.5.	Medición de la eficiencia de acoplamiento de biotina a los mAbs mediante técnica de ELISA específico indirecto	90
A.6.	Determinación de la presencia de fragmentos scFv solubles específicos anti-IFN-α2b por técnica de ELISA específico indirecto.....	91
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
1.	Preparación de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN-α2b	92
1.1	Evaluación del título de anticuerpos policlonales anti-rhIFN- α 2b en plasma de ratones inmunizados.....	92
1.2	Ensayos de fusión y clonado celular para la obtención de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b	93
2.	Producción y purificación de mAbs anti-rhIFN-α2b.....	96
2.1.	Producción <i>in vivo</i> de mAbs anti-rhIFN- α 2b.....	96
2.2	Purificación de mAbs por cromatografía de afinidad a proteína A	98
3.	Caracterización inmunoquímica del panel de mAbs anti-rhIFN-α2b.....	101
3.1.	Identificación del rhIFN- α 2b desnaturalizado mediante ensayos de <i>Western-Blot</i>	101
3.2.	Determinación de la constante de afinidad de los mAbs.....	101
3.3.	Mapeo de los epítopes del rhIFN- α 2b	105
4.	Selección de mAbs adecuados para desarrollar métodos inmunoquímicos útiles para la detección y cuantificación de rhIFN-α2b	111
4.1.	Detección de rhIFN- α 2b mediante técnica de <i>Dot-Blot</i>	111

4.2.	ELISA <i>sandwich</i> heterogéneo para la cuantificación de rhIFN- α 2b.....	113
5.	Neutralización de la actividad biológica antiviral <i>in vitro</i> del rhIFN-α2b en presencia de los mAbs.....	116
6.	Obtención de fragmentos scFv a partir de hibridomas productores de mAbs	120
6.1.	Extracción del ARN total a partir de hibridomas en cultivo.....	120
6.2.	Obtención del ADN codificante para las cadenas V _H y V _L	122
6.3.	Síntesis de los fragmentos de ADN de cadena única scFv.....	125
6.4.	Clonado de los genes de scFv en el vector pCANTAB 5E.....	127
6.5.	Selección y amplificación de los fragmentos recombinantes mediante técnica de <i>phage-display</i>	129
6.6.	Obtención de fragmentos scFv solubles.....	132
7.	Producción y purificación de los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2	136
8.	Determinación de la constante de afinidad de los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2	138
9.	Neutralización de la actividad biológica antiviral <i>in vitro</i> de diferentes subtipos de hIFN-α en presencia de los fragmentos recombinantes CA5E6 y CB27H2.....	141
10.	Maduración de la afinidad del scFv CA5E6	144
10.1.	Mutagénesis del scFv CA5E6 mediante <i>error-prone</i> PCR	146
10.2.	Selección y amplificación de los fragmentos mutantes mediante técnica de <i>phage-display</i>	149
10.3.	Caracterización del panel de fragmentos scFv mutantes.....	152
11.	Neutralización de la actividad biológica antiproliferativa <i>in vivo</i> del rhIFN-α2b por acción del mAb CA5E6.....	157
	CONCLUSIONES	164
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

% (P/V)	g/100 ml
% (V/V)	ml/100 ml
A	absorbancia
<i>a</i>	concentración antígeno libre
<i>a₀</i>	concentración antígeno total
Ac	anticuerpo
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag	antígeno
ANOVA	análisis de la varianza
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ARN	ácido ribonucleico
BSA	albúmina sérica bovina
C_{Ac}	concentración de anticuerpolibre
C_{Ag}	concentración de antígeno libre
C_{AgAc}	concentración del complejo antígeno-anticuerpo
CDK-2	<i>Cyclin-Dependent Kinasa-2</i>
CDR	regiones determinantes de la complementaridad
Cél.	células
C_H	dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina
C_L	dominio constante de la cadena liviana de inmunoglobulina
CML	<i>Cronic Myelogenous Leukemia</i>
CTL	linfocito T citotóxico
Dil.	dilución
D-MEN	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
D.S.	desviación estándar
EDTA	ácido etilendiamínico tetra acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	extracto periplásmico
ET	extracto total
f	raíz de la función de unión
Fig.	figura
FR o Fw	<i>framework</i>
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
mAb	anticuerpo monoclonal
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMC	medio mínimo de crecimiento
H	cadena pesada inmunoglobulina
HAMA	<i>human-antimouse antibodies</i>
HAT	hipoxantina, aminopterina y timidina
HAV	virus de hepatitis A
HBV	virus de hepatitis B
HCL	<i>Hairy Cell Leukemia</i>
HCV	virus de hepatitis C
HGPRT	Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferasa
HIV	virus de inmunodeficiencia humana
HT	hipoxantina y timidina

i	concentración de anticuerpo libre
i₀	concentración total de anticuerpo
ICAM-1	moléculas de adhesión intercelular 1
IDDM	diabetes tipo I o insulina dependiente
IFN	Interferón
IFNAR-1	componente 1 del receptor de Interferón tipo I
IFNAR-2	componente 2 del receptor de Interferón tipo I
Ig	inmunoglobulina
IL	Interleuquina
i.p.	intraperitoneal
ISGF-3	<i>Interferon-Stimulated Gene Factor-3</i>
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
JAK 1	<i>Janus kinase 1</i>
K_A	constante de afinidad
K_D	constante de disociación
kDa	kilodaltons
L	cadena liviana de la inmunoglobulina
LCM	Coriomeningitis Linfocitaria
LCV	Leucemia de células vellosas
M	moles/litro
mAb	anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMP-9	<i>matriz metalloproteinase-9</i>
min	minutos
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
NK	<i>Natural Killer</i>
ON	<i>overnight</i>
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	solución salina de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDC	células plasmacitoides predentríticas
pd(N)₆	hexanucleótidos de secuencia al azar
P.E.	pérdida de expresión
PEG	polietilenglicol
PKR	<i>Protein Kinasa RNA-dependent</i>
PM	masa molecular
PMS	metasulfato de fenazina
rhIFN	interferón humano recombinante
RIA	<i>Radio Immune Assay</i>
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm.	revoluciones por minuto
scFv	fragmento variable de cadena única
SDS	dodecilsulfato de sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SFB	suero fetal bovino
SN	sobrenadante
SOE	<i>splicing by overlap extension</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBS	solución salina de tris
TK	Timidina Kinasa
TMP	Timidina Monofosfato
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
Tyk	<i>Tyrosine kinase</i>

ufc	unidades formadoras de colonias
ufp	unidades formadoras de placas
UI	unidades internacionales de actividad biológica
V	viabilidad
VC	volúmenes de columna
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V_H	dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina
V_L	dominio variable de la cadena liviana de inmunoglobulina
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
X_M	concentración de células no viables
X_T	concentración de células totales
X_V	concentración de células viables
β-ME	β-mercaptoetanol
λ	longitud de onda
v	función de unión

RESUMEN

A pesar de que el IFN- α presenta actividades antiviral y antiproliferativa, y por lo tanto está indicado para el tratamiento de ciertas infecciones virales y de tumores, su expresión endógena aumentada se asocia a numerosas desórdenes inflamatorios y enfermedades autoinmunes donde la citoquina puede ser un factor en el inicio o en el mantenimiento de la patología. En la actualidad, varios mAbs se comercializan para numerosas indicaciones y muchos se encuentran en etapas de ensayos clínicos, representando el IFN- α un potencial candidato para este tipo de terapias basadas en anticuerpos.

En el presente trabajo se obtuvo un panel de 11 mAbs (CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB13A7, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3 y CB33B3) que demostraron capacidad de reconocimiento específico de rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida. De igual manera, todos los mAbs exhibieron capacidad para reconocer a la citoquina en su estado nativo, observándose un rango de afinidades que osciló entre $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $1,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

En una etapa posterior, se estudió la especificidad de los epitopes reconocidos por cada mAb, estableciendo una ubicación relativa de los mismos en la molécula del rhIFN- α 2b mediante ensayos de competición entre pares de mAbs. De esta manera, fue posible clasificar a los anticuerpos según su capacidad para reconocer 4 áreas de la citoquina relativamente diferentes entre sí (I, II, III y IV) identificándose, para un área en particular, variaciones en el comportamiento de los mAbs que la mapearon.

Con el objeto de seleccionar mAbs apropiados para desarrollar metodologías inmunoquímicas útiles para la detección y cuantificación del rhIFN- α 2b se realizaron ensayos de *Western-Blot*, *Dot-Blot* y *ELISA sandwich*. En general, los mAbs que mapearon las regiones I y II de la molécula, y particularmente el mAb CB27H2, demostraron utilidad para llevar a cabo cualquiera de los métodos inmunoquímicos planetados.

En ensayos de neutralización de la actividad biológica *in vitro* del rhIFN- α 2b los mAbs CA1A3 y CB27H2 mostraron la mayor acción neutralizante. Los mAbs CB15D7, CA2G7, CA5E6 y CB29D3 neutralizaron en diferente medida la actividad antiviral de la citoquina, observándose en general un mayor grado de neutralización cuando la afinidad de los mAbs fue mayor.

Teniendo en cuenta la habilidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* del IFN- α 2b, la capacidad para mapear diferentes áreas moleculares de la citoquina y el valor de sus constantes de afinidad, los mAbs CA1A3, CA5E6, CB15D7 y CB27H2 fueron seleccionados para la preparación de fragmentos recombinantes scFv. Los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2 fueron producidos en forma soluble en el espacio periplásmico de la bacteria *E. coli* HB2151 y purificados mediante cromatografía de afinidad.

Se llevaron a cabo ensayos para medir la constante de afinidad de cada fragmento. En el caso del scFv CA5E6 no se observó una disminución significativa de la afinidad con respecto al mAb completo ($1,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Por otro lado, el fragmento CB27H2 presentó una disminución notable en su afinidad comparándolo con su correspondiente mAb ($0,37 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $11,00 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Adicionalmente, el fragmento CA5E6 demostró capacidad para neutralizar, en grado diverso, la actividad biológica antiviral de un grupo heterogéneo de hIFN- α s, incluidas las especies comprendidas en los denominados IFN leucocitario y linfoblástico.

Se planteó la posibilidad de mejorar la afinidad del scFv CA5E6. Para ello, a partir de su secuencia nucleotídica se generó una biblioteca de scFvs mutados que posteriormente se analizó mediante una variante de la técnica de *phage-display*. Con esta metodología se obtuvo un panel de 11 scFv solubles con un número de mutaciones que varió entre 1 y 4 sustituciones aminoacídicas. La mayoría de los fragmentos mutados exhibieron constantes de afinidad que no demostraron diferencias significativas con el anticuerpo original (valores entre $1,0 \cdot 10^8$ y $1,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Por otro lado, el scFv EP18 y el EP33 mostraron un incremento en su constante de afinidad ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $3,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; respectivamente). Adicionalmente, se estudió la capacidad neutralizante de la actividad biológica anti-viral *in vitro* del hIFN- α por parte de ambos fragmentos. El scFv EP18 demostró una capacidad neutralizante levemente superior al fragmento CA5E6 "wild type" (0,20 nM y 0,40 nM, respectivamente), mientras que fue necesaria una mayor concentración del scFv EP33 (1,00 nM) para neutralizar la misma masa de rhIFN- α 2b.

En conclusión, se obtuvo un fragmento recombinante a partir de un mAb (CA5E6) seleccionado por sus características de unión con el rhIFN- α 2b que fue capaz de inhibir la acción antiviral de un conjunto heterogéneo de hIFN- α s, optimizándose su afinidad hasta el

punto, en una primera instancia, de incrementar el valor de la correspondiente al mAb completo original ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del scFv EP18 frente a $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del mAb CA5E6).

Por otro lado, se evaluó la actividad neutralizante *in vivo* de la actividad antitumoral por parte del mAb CA5E6 parental utilizando células PC-3 tumorales humanas implantadas en ratones *nude* atímicos. En este ensayo se observó que los grupos de ratones correspondientes a los tratamientos con rhIFN- α 2b y con esta citoquina en presencia del mAb CA5E6 exhibieron una diferencia significativa ($p = 0,011$) entre los pesos promedios de los tumores correspondientes a los dos tratamientos (0,39 g y 0,92 g, respectivamente). Asimismo, no se observó diferencia significativa ($p = 0,3$) entre el grupo control (sin rhIFN- α 2b) y el grupo de animales tratados con el mAb CA5E6, confirmando el bloqueo de la actividad biológica del IFN.

En síntesis, es posible concluir que el mAb CA5E6 fue capaz de neutralizar la acción antiproliferativa de la citoquina en un sistema *in vivo*, proyectando el potencial terapéutico de esta inmunoglobulina.

SUMMARY

Despite IFN- α presents antiviral and antiproliferative activities, and thus being indicated for certain viral infections and tumour treatment, its increased endogenous expression is associated with inflammatory disorders and autoimmune illnesses, in which cytokine can be a factor either in the beginning or in the maintenance of the pathology. Nowadays, various mAbs are commercialized for numerous indications and many of them are in clinic test stage, being IFN- α a potential candidate for these type of antibody-based therapies.

In this work, a panel of 11 mAbs was obtained (CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3 and CB33B3), showing capacity for specific recognition of rhIFN- α 2b, immobilized in solid phase. In the same way, all mAbs exhibited capacity to recognise the cytokine in its native state, observing an affinity range between $1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $1.4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

In a later stage, the specificity of epitopes recognised for each mAb was studied, establishing their relative position in the rhIFN- α 2b molecule through competition tests between mAbs pairs. In this way, it was possible to classify the antibodies according to their capacity to recognise 4 areas of the cytokine relatively different between themselves (I, II, III and IV). It was identified variations, for a particular area, in the behaviour of the mAbs that mapped it.

With the aim of selecting the appropriate mAbs to develop immunochemical methodologies useful for the detection and quantification of rhIFN- α 2b, Western-Blot, Dot-Blot and ELISA sandwich tests were done. In general, the mAbs that mapped the molecule's regions I and II, and particularly the CB27H2 mAb, showed utility to perform the immunochemical methods mentioned.

In neutralization tests of rhIFN- α 2b *in vitro* biological activity, the CA1A3 and CB27H2 mAbs presented the highest neutralizing action. The CB15D7, CA2G7, CA5E6 and CB29D3 mAbs neutralized differently the cytokine's antiviral activity, and it was observed a higher degree of neutralization when the mAbs affinity was higher.

According to the neutralizing ability of rhIFN- α 2b *in vitro* biological activity, the capacity to map the cytokine's different molecular areas and its affinity constant value, the CA1A3, CA5E6, CB15D7 and CB27H2 mAbs were selected to prepare scFv recombinant fragments. The CA5E6 and CB27H2 scFv fragments were produced in soluble form in the *E. coli* HB2151 bacteria periplasmatic space and purified through affinity chromatography.

Tests to measure the affinity constant of each fragment were carried out. In the case of CA5E6 scFv, it was not observed a significant diminution of the affinity, as regards the complete mAb ($1.50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $2.20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectively). The CB27H2 fragment presented a notable diminution in its affinity compared with its corresponding mAb ($0.37 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $11.00 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectively). In addition, the CA5E6 mAb fragment showed capacity to neutralised, in diverse degree, the antiviral biological activity of an heterogeneous group of hIFN- α s, including the species present in leucocitary and linfoblastic IFN.

The possibility to improve the CA5E6 scFv affinity was considered. Consequently, a library of mutated scFvs was generated from its nucleotidic sequence, which was later analysed using a variant of the phage-display technique. With this methodology, a panel of 11 soluble scFv was obtained, with a number of mutations which oscillated between 1 and 4 aminoacidic substitutions. Most of the mutated fragments exhibited affinity constants that did not present significant differences, in comparison to the original antibody (values between $1.0 \cdot 10^8$ and $1.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). On the other hand, the EP18 and EP33 scFv had an increase in its affinity constant ($3.50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $3.20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectively). Additionally, the neutralizing capacity of the rhIFN- α *in vitro* biological activity in both fragments was studied. The EP18 scFv presented a slightly superior neutralizing capacity to wild type CA5E6 fragment (0.20 nM and 0.40 nM, respectively), whereas a higher concentration of EP33 scFv (1.00 nM) was necessary to neutralise the same rhIFN- α 2b mass.

In conclusion, a recombinant fragment was obtained from a mAb (CA5E6) selected from its interaction characteristics with the rhIFN- α 2b capable to inhibit the antiviral action of an heterogeneous group of hIFN- α s, optimizing its affinity up to the point to, in a first instance, increase the value of the corresponding to the original complete mAb ($3.50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ of the EP18 scFv in contrast with $2.20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ of the CA5E6 mAb).

Besides, the *in vivo* neutralizing activity of the parental CA5E6 mAb antitumoral activity was evaluated, using humane tumoral PC-3 cells implanted in atomic nude mice. It was observed that the groups of mice corresponding to the treatment with rhIFN- α 2b and with this cytokine in presence of the CA5E6 mAb, exhibited a significant difference in the average weight of both treatments (0.39 g and 0.92 g, respectively). Additionally, the control group (rhIFN- α 2b) and the group of animals treated with the CA5E6 mAb did not show a significant difference ($p=0.3$), confirming the blockage of the IFN biological activity.

To summarize, it is possible to conclude that the CA5E6 mAb was capable of neutralizing the cytokine's antiproliferative action in an *in vivo* system, projecting the therapeutical potential of this immunoglobulin.

INTRODUCCIÓN

1. Interferón alfa

1.1. Breve reseña histórica

En 1957 los virólogos Alick Isaacs y Jean Lindemann, en un experimento considerado clásico, descubrieron que un factor proteico presente en el sobrenadante de cultivos de tejido embrionario de pollo, incubado con el virus influenza inactivado, demostraba la capacidad de proteger a los tejidos sanos de la infección del virus activo. Debido a que la sustancia interfería con la acción del virus, la denominaron interferón (IFN) (Pestka, 1982; Gresser, 1984; Meager, 1998). Estudios posteriores demostraron que el IFN también podía ser producido por células humanas y era activo contra un amplio espectro de virus, hecho que despertó un considerable interés médico y científico.

Debido a que el interferón es producido naturalmente en bajas concentraciones, tanto su caracterización molecular como la evaluación de sus propiedades clínicas sólo pudieron efectuarse transcurridos más de 20 años desde su descubrimiento. El advenimiento de los métodos de producción en gran escala y el simultáneo desarrollo de procedimientos eficientes de purificación en la década del '70 (Knight, 1976), permitieron obtener IFN en cantidad y calidad suficientes para su caracterización y uso clínico.

Posteriormente, se descubrió que el IFN no era una proteína única sino que probablemente existían diferentes tipos moleculares. La caracterización completa del IFN no se logró hasta finales de la década del '70 con el surgimiento de la tecnología del ADN recombinante.

De esta manera, el IFN fue la primera citoquina clonada, completamente secuenciada, producida en forma recombinante y purificada hasta homogeneidad. Finalmente, luego de una prolongada y problemática historia de ensayos clínicos fallidos, el IFN fue la primera de estas proteínas en alcanzar la etapa de comercialización para su aplicación clínica, señalando el comienzo histórico de la industria biotecnológica farmacéutica.

1.2. Nomenclatura y clasificación de los interferones

Los interferones fueron clasificados originalmente de acuerdo con los tipos celulares que los producían: IFN leucocitario, fibroblástico e inmune. En base a la creciente evidencia de la existencia de distintas formas moleculares de IFN, un comité internacional de nomenclatura introdujo el sistema del alfabeto griego para identificar a los distintos tipos de IFNs conocidos. De esta manera, el IFN leucocitario se designó como IFN- α , el IFN fibroblástico se denominó IFN- β y el IFN inmune se convirtió en el IFN- γ .

Nuevas complicaciones surgieron cuando se reveló que el IFN leucocitario consistía en una mezcla de varias proteínas estrechamente relacionadas (subtipos) codificadas por distintos genes cromosomales (Nagata y col., 1980). Por lo tanto, se propusieron dos sistemas de nomenclatura, uno alfabético y otro numérico, para referirse a los distintos subtipos de IFN- α sin una apropiada correspondencia entre ambos (Meager, 1998). Sin embargo, el sistema numérico es el que prevalece en la actualidad. A diferencia de lo que ocurre con el IFN- α , el IFN- β y el IFN- γ son especies representadas por una sola proteína.

Por otro lado, existe una clasificación paralela de los interferones inicialmente basada en la capacidad de preservación de su actividad antiviral frente a la acidificación a pH 2. De esta manera, se denominó IFN tipo I a aquellos interferones estables en condiciones ácidas e IFN tipo II a los ácido-lábiles. Los IFNs- α/β han sido agrupados como IFNs tipo I, no sólo por la estabilidad a pH 2, sino también debido a la extensa homología en sus secuencias aminoacídicas y a la observación de que todos ellos se unen a un receptor común de la superficie celular. Recientemente se aislaron nuevos miembros de esta familia de IFNs, el IFN- ω humano, con propiedades biológicas similares a los IFNs- α/β , el IFN trofoblástico (IFN- τ), producido en embriones de rumiantes (Donnelly, 1994) y el IFN- δ , el más pequeño de todos los IFNs que sólo ha sido encontrado en trofoblastos de cerdo (Lefevre y col., 1998).

El único IFN de tipo II que se conoce es el IFN- γ , el cual en vez de ser inducido directamente por una infección viral, es sintetizado por linfocitos T activados y células NK (*natural killer*) en respuesta al reconocimiento de células infectadas. A diferencia de los anteriores, el IFN- γ es lábil en condiciones ácidas y actúa a través de un receptor diferente (Petska y col., 1983; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Bekisz y col., 2004).

1.3. Genes e inductores de la síntesis de IFNs tipo I

Los genes de los IFNs tipo I humanos se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 9. Hay por lo menos 14 genes no alélicos funcionales de IFN- α , uno de IFN- β y uno de IFN- ω . Adicionalmente a estos genes funcionales, por lo menos 5 pseudogenes se encontraron en esta región (Donnelly, 1994; Meager, 1998). Se ha determinado que los diferentes genes de IFN- α presentan un alto grado de homología. Sin embargo, todos ellos demuestran menor homología con el gen de IFN- β . No obstante, todos los genes de los IFNs de tipo I comparten la característica de no poseer intrones (Capon y col., 1985), lo que sugiere un muy antiguo origen a partir de un gen ancestral común. Hipotéticamente, los genes de IFN- α e IFN- β se habrían desdoblado hace unos 500 millones de años, mientras que la diversificación de su estructura habría tenido lugar más recientemente (Weissmann y Weber, 1986).

Todos los genes de IFN son normalmente silentes y se expresan transitoriamente tras la inducción de una variedad de estímulos exógenos. Los IFNs son sintetizados a partir de sus respectivos ARN mensajeros y son secretados para actuar, vía receptores específicos de la superficie celular, sobre otras células. Su producción dura pocas horas luego de la inducción debido principalmente a la inestabilidad del ARN mensajero y a la rápida inactivación de la transcripción de los genes.

Un amplio rango de inductores, incluyendo virus, bacterias, micoplasmas, endotoxinas, ARN doble cadena y algunas citoquinas como el factor estimulante de colonias 1, la interleuquina-1 (IL-1), IL-2 y el factor de necrosis tumoral, han demostrado ser eficientes en la activación de la transcripción de los genes de interferón tipo I (Donnelly, 1994; Meager, 1998). Estos inductores tienen, en general, el potencial de promover la expresión de todos los genes de IFNs del tipo I; sin embargo, se supone que combinaciones de células e inductores selectivamente específicos establecen el tipo y número de genes de IFN que se expresan. Así, el IFN- α (como una mezcla de subtipos) y el IFN- ω pueden ser producidos simultáneamente luego de una infección viral de linfocitos vírgenes o monocitos/macrófagos (Adolf, 1990). Adicionalmente, la proporción de subtipos de IFN- α puede variar dependiendo del tipo de virus utilizado como inductor (Finter, 1991), sugiriendo que los genes de IFN- α pueden ser expresados diferencialmente. Por otro lado, los fibroblastos diploides humanos estimulados por virus producen principalmente IFN- β y sólo cantidades pequeñas de IFN- α .

1.4. Mecanismos de acción

Los interferones ejercen sus acciones en las células blanco interactuando con receptores específicos presentes en la superficie celular. Como consecuencia de esta unión de alta afinidad, se produce una señal que es transmitida por el receptor a través de la membrana celular hacia el citoplasma y el núcleo.

Estos receptores se encuentran en bajo número (100-5.000 moléculas por célula) en la mayoría de las células humanas independientemente de su origen, incluso sobre células que responden escasamente al interferón. Experimentos de unión competitiva permitieron concluir que los IFN- α , IFN- β e IFN- ω interactúan con un mismo receptor (Uzé y col., 1994; Meager, 1998; Lewerenz y col., 1998; Piehler y col., 2000), mientras que el IFN- γ se une a un receptor diferente. Todos los IFNs tipo I compiten por un sitio común de unión sobre las células humanas. Sin embargo, los subtipos individuales de IFN- α muestran distintos niveles de actividad sobre las células, lo que estaría relacionado con su capacidad de unión a la superficie celular (Meager, 1998).

El receptor de los IFNs tipo I está formado por 2 proteínas con dominios de transmembrana denominadas IFNAR-1 e IFNAR-2. Estos dos componentes se asocian luego de la unión de una molécula de IFN tipo I, iniciándose la transducción de señales a través de la membrana plasmática (Foster y Finter, 1998). Sin embargo, no se descarta el requerimiento de otros componentes de la superficie celular para que los receptores sean completamente funcionales e, incluso, que haya receptores de IFN alternativos (Meager, 1998).

Ambas proteínas del receptor se encuentran codificadas por genes ubicados en el cromosoma 21. La subunidad IFNAR-1 es una proteína altamente glicosilada, con una masa molecular aparente de 135 kDa, mientras que la subunidad IFNAR-2 también se encuentra glicosilada y existe como una variante larga (115 kDa) o corta (55 kDa) como resultado de un *splicing* alternativo del ARNm. Sin embargo, sólo la asociación de IFNAR-1 con la variante larga de IFNAR-2 (IFNAR-2c) puede iniciar el camino de transducción de señales (Lu y col., 1998; Roisman y col., 2001; Kunzi y Pitha, 2003). Se ha demostrado que la subunidad IFNAR-2c es la responsable de la interacción con el ligando, probablemente reclutando en forma subsecuente a la subunidad IFNAR-1, la cual se requiere para la

formación de un receptor de alta afinidad (Russel-Harde y col., 1995; Chuntharapai y col., 1999).

Una vez que el IFN se une a su receptor, se induce la activación de tirosinas quinasas no-receptoras [Tyk2 (*Tyrosine Kinase-2*) y JAK 1 (*Janus Kinase-1*)], asociadas a su dominio citoplasmático, que fosforilan residuos tirosina de las proteínas denominadas STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*; Foster y Finter, 1998). El complejo STAT, que interacciona con el receptor, está formado por las proteínas STAT-1a, STAT-1b y STAT-2. Tanto la STAT-1a como la STAT-1b pueden asociarse con la STAT-2 luego de su fosforilación. Las proteínas STAT formando trímeros son translocadas al núcleo y se combinan con una proteína de unión al ADN, p48 (de 48 kDa, también denominada IRF-9), para formar un factor de transcripción denominado ISGF-3 (*IFN-Stimulated Gene Factor-3*; Meager, 1998). Dicho factor de transcripción se une a una secuencia de ADN denominada ISRE (*IFN-Stimulated Response Element*), presente en la región promotora de los genes inducibles por IFN, generando su transcripción a ARN mensajero para la síntesis de las proteínas mediante las cuales los IFN de tipo I ejercen finalmente sus actividades biológicas.

1.5. Actividades biológicas asociadas al IFN de tipo I

Los IFNs poseen actividad biológica pleiotrópica debido a su capacidad para inducir una gran variedad de efectos sobre sus células diana, los cuales son llevados a cabo por la acción de proteínas sintetizadas en las células una vez que los IFNs han interactuado con su receptor, tal como se describiera anteriormente. Sus principales funciones biológicas incluyen actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora (Pestka, 1982; Donnelly, 1994; Meager, 1998; Foster y Finter, 1998; Meager, 2001).

1.5.1. Actividad antiviral

Los IFNs de tipo I poseen un importante rol en la resistencia del huésped a la infección viral, ya que ocupan la primera línea de defensa previa a la activación de los mecanismos inmunes. En contraste con la alta especificidad del sistema inmune, los IFNs ofrecen protección contra un amplio espectro de virus, ya sea virus a ARN simple hebra (positiva y negativa) y doble hebra y virus a ADN, así como también contra otros microorganismos de replicación intracelular (Krim, 1980)

A pesar de la existencia de un gran número de virus que presentan diferentes estrategias de replicación, muchos de ellos pueden ser eliminados mediante un conjunto de proteínas antivirales inducidas por IFN. Un ejemplo extensamente caracterizado es la familia de enzimas colectivamente conocidas como “2'-5'A sintetasa”, que en presencia de ARN doble cadena (intermediario frecuente de la síntesis de ARN viral) cataliza la formación de un oligonucleótido inusual que, seguidamente, activa a una endonucleasa latente denominada RNasa L (Sen y Lengyel, 1992). Una vez activada, la enzima RNasa L degrada el ARN mensajero viral (y celular) inhibiendo de esta manera la síntesis de proteínas virales. Los virus ARN pequeños, de replicación citoplasmática, son los mayoritariamente inhibidos por la activación de la 2'-5'A sintetasa (Sen y Lengyel, 1992). Otro importante factor antiviral inducido por IFN es una proteína quinasa dependiente de ARN doble cadena, conocida como PKR, que en su forma activa fosforila el factor de iniciación eIF2, involucrado en la translocación polirribosomal del ARN mensajero durante la síntesis proteica. El eIF2 fosforilado es inactivo y, de este modo, la síntesis proteica viral es inhibida. Esta inhibición ha sido asociada con la pérdida de la capacidad replicativa de los reovirus y los rhabdovirus, tales como el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV).

La 2'-5'A sintetasa y la PKR constituyen mecanismos antivirales muy generales que potencialmente podrían afectar a un amplio rango de virus. Sin embargo, el IFN puede inducir ciertas proteínas que son capaces de inhibir específicamente a una clase determinada de virus. Por ejemplo, las proteínas de resistencia a Myxovirus (Mx) inducidas por IFN bloquean la replicación del virus Influenza sin afectar la replicación de otros virus. Por otro lado, cabe la posibilidad de que existan otros mecanismos y proteínas antivirales, debido a la potencialidad del IFN de actuar a nivel de diferentes etapas en la secuencia de la replicación viral, incluyendo la penetración, desnudamiento y ensamblaje de la progenie viral, así como de afectar la transcripción y la traducción del ácido nucleico (Sen y Lengyel, 1992).

1.5.2. Actividad antiproliferativa

Los IFNs pueden inhibir el crecimiento de células normales y tumorales. Sin embargo, la sensibilidad celular a los efectos antiproliferativos es extremadamente dependiente de la estirpe celular.

La actividad de las enzimas 2'-5'A sintetasa y PKR afectan también el crecimiento y la proliferación celular. En presencia de IFN, las enzimas se encuentran activas reduciendo la síntesis proteica en general, pero debido a que la síntesis de proteínas virales, en particular, es anormalmente rápida, el efecto inhibitorio sobre la replicación viral es más dramático que sobre el lento y complejo crecimiento celular.

Estudios recientes han sugerido que la PKR actúa normalmente como un "supresor tumoral". Por esto, uno de los mecanismos por los cuales el IFN inhibe la proliferación celular podría manifestarse a través de su capacidad para inducir la expresión/activación de la PKR. Se ha demostrado también que el IFN- α inhibe la quinasa CDK-2 (proteína involucrada en el ciclo celular), hecho que podría contribuir a la actividad antiproliferativa (Zhang y Kumar, 1994).

El sistema 2'-5'A sintetasa-RNasa L y una variedad de otros mecanismos inducidos por IFN, incluyendo supresión de oncogenes, reducción de metabolitos esenciales e incremento de la rigidez celular, estarían involucrados en el desarrollo de la actividad antiproliferativa y antitumoral (Meager, 1998).

Además de las líneas celulares tumorales, los IFN- α/β tienen actividad antiproliferativa sobre las células precursoras hematopoyéticas, por ejemplo, de la estirpe mieloide. Adicionalmente, estos interferones demuestran una potente actividad inhibidora de la angiogénesis.

1.5.3. Actividad inmunomoduladora

Los IFNs son importantes moduladores del sistema inmune tanto sobre la inmunidad innata como sobre la adquirida.

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) es potenciada por los IFNs de tipo I, posiblemente a través del aumento de la expresión de receptores para el Fc de las IgG (Meager, 1998).

Los interferones pueden incrementar la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), que resultan cruciales para el reconocimiento de antígenos extraños por medio de los linfocitos T

citotóxicos (CTL, *Cytotoxic T Lymphocytes*, CD8⁺). El reconocimiento de células infectadas con virus por los CTL depende de la presentación de los antígenos virales asociados a las moléculas clase I del MHC en la membrana celular. Otro tipo de leucocitos, conocidos como células citocidas naturales (NK, *Natural Killer*), también son activados por el IFN para combatir una gran variedad de células infectadas o células tumorales independientemente de la expresión del MHC (Meager, 1998).

1.6. Interferón- α

1.6.1. Subtipos de IFN- α

Como se mencionó anteriormente, el IFN- α humano no está representado por una única molécula, sino que consiste en una familia de 14 proteínas estructuralmente relacionadas, las cuales se distinguen empleando una nomenclatura numérica: IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 8, IFN- α 10, IFN- α 13, IFN- α 14, IFN- α 16, IFN- α 17, IFN- α 21 e IFN- α 22 (Bekisz y col., 2004). Numerosos trabajos se han centrado en la identificación y caracterización de dichos subtipos mediante su producción empleando fuentes naturales. Por ejemplo, se han aislado 9 clases de IFN- α producidas por linfocitos de sangre periférica humana luego de su inducción con virus Sendai (Nyman y col., 1998a), mientras que se pudieron identificar 5 variantes de IFN- α en células Namalwa infectadas con el mismo virus (Allen y Fantes, 1980).

Todos los subtipos de IFN- α son proteínas de secreción, por lo que son sintetizadas como precursores que poseen un péptido señal de 23 aminoácidos en su extremo N-terminal. El péptido de secreción es clivado para dar lugar a las proteínas maduras, que contienen 166 aminoácidos, con excepción del IFN- α 2, cuya longitud se reduce a 165 aminoácidos por carecer del residuo ácido aspártico en la posición 44.

Las diferentes especies de IFN- α comparten entre un 75 y un 99% de homología en su secuencia aminoacídica, con 79 residuos conservados de un total de 166 aminoácidos. Las proteínas IFN- α 1 e IFN- α 13 son idénticas y difieren sólo en un aminoácido de su péptido señal. Los pares α 4/ α 7, α 4/ α 17, α 5/ α 22 y α 8/ α 10 presentan un alto grado de homología, con sólo 7 a 9 residuos diferentes. El IFN- α 2 posee tres variantes alélicas, IFN- α 2a, 2b y 2c, las cuales difieren en 1 o 2 aminoácidos. De esta manera, mientras que el IFN- α 2a presenta lisina en la posición 23, el IFN- α 2b y el IFN- α 2c presentan arginina. Además, el IFN- α 2c

posee una arginina adicional en lugar de histidina en la posición 34 (Kontsek, 1994; Bekisz y col., 2004).

La masa molecular aparente promedio de los subtipos de IFN- α producidos en forma recombinante en bacterias, calculada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), es de aproximadamente 19 kDa. Sin embargo, la masa molecular del IFN- α derivado de leucocitos humanos inducidos por el virus Sendai varía entre 17,5 y 23,3 kDa, demostrando la existencia de modificaciones post-traduccionales en por lo menos uno de los subtipos (Rubinstein y col., 1979; Goeddel y col., 1980; Petska y col., 1983; Zoon y col., 1992; Kontsek, 1994).

La heterogeneidad de los subtipos de IFN- α también queda demostrada por el amplio rango de punto isoeléctrico observado, el cual oscila entre pH 4,5 y 6,9 (Kontsek, 1994).

La mayoría de las especies de IFN- α no contiene sitios consenso para N-glicosilación, con excepción del IFN- α 14, que posee dos de los mencionados sitios, uno en la Asn2 y otro en la Asn72, de los cuales sólo el segundo se encuentra ocupado (Nyman y col., 1998a; Nyman y col., 1998b). Por otro lado, el único subtipo en donde se ha demostrado fehacientemente la existencia de O-glicosilación es el IFN- α 2, que contiene el disacárido galactosil-N-acetilgalactosamina unido a la Thr106. El análisis de la estructura de los carbohidratos de IFN- α 2 de leucocitos humanos mediante espectrometría de masas indicó que dicho núcleo glicosídico se encuentra unido a uno o dos residuos de ácido N-acetilneuramínico en una proporción de moléculas, mientras un disacárido (probablemente N-acetilactosamina) está presente en el resto de la población proteica. El IFN- α 2 producido en células CHO también demostró estar O-glicosilado en la misma posición, siendo mayoritaria la población de moléculas que contienen dos residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos al mismo núcleo. Debido a que sólo las tres variantes alélicas de este subtipo contienen una Thr en la posición 106, es posible que el mismo represente el único IFN- α O-glicosilado (Adolf y col., 1991; Sugiyama y col., 1993; Nyman y col., 1998b). El rol de los oligosacáridos en el IFN- α 14 y en el IFN- α 2 no se encuentra claramente establecido. La presencia de carbohidratos no es esencial para su actividad biológica, pero la glicosilación podría tener efectos sobre la farmacocinética, inmunogenicidad y estabilidad de las proteínas.

Se desconoce el significado biológico de la existencia de tal multitud de especies de IFN- α , aunque se piensa que las mismas podrían poseer patrones cuantitativamente diferentes de actividad biológica antiviral, inhibidora del crecimiento y estimuladora de células NK.

1.6.2. Estructura del IFN- α 2

Los primeros modelos tridimensionales de los IFNs de tipo I humanos fueron predichos en 1982 teniendo en cuenta sus secuencias aminoacídicas. Más recientemente, la estructura terciaria del IFN- α 2b cristalizado fue revelada mediante cristalografía de rayos X (Radhakrishnan y col., 1996), mientras que la correspondiente al IFN- α 2a en solución fue analizada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) (Klaus y col., 1997).

Estos estudios demostraron que el IFN- α 2 posee una estructura globular consistente en cinco hélices α designadas con las letras A (Ser11-Met21), B y B' (Thr52-Ser68 y Lys70-Ala75), C (Glu78-Ile100), D (Leu110-Glu132) y E (Pro137-Leu157), lo que permite clasificar a esta proteína dentro del grupo de las citoquinas α -helicoidales. Las hélices se encuentran conectadas por un segmento sobresaliente de gran longitud (lazo AB) y tres segmentos cortos (lazos BC, CD y DE). Cada hélice es aproximadamente recta, con excepción de la hélice B que contiene una curvatura pronunciada de 70° cuyo centro es la Thr69. La hélice α más corta es la A, con 11 aminoácidos, mientras que las hélices restantes contienen en promedio 20 aminoácidos cada una. La topología de la molécula se asemeja al motivo clásico de cuatro hélices (A, B, C y E) empaquetadas, con adición de la hélice D que se une al núcleo mediante una interacción hidrofóbica entre la Thr120 y la Thr121 con la Thr138 de la hélice E (Fig. 1). El núcleo de la estructura helicoidal (definido como aquellos residuos que poseen menos de un 15% de accesibilidad al solvente) se compone básicamente de residuos hidrofóbicos, con excepción de algunos residuos polares ocultos que forman varios puentes de hidrógeno que unen las hélices A, C, D y E. La considerable homología entre el IFN- α 2 y el resto de la familia sugiere que todos los otros miembros presentarían esencialmente la misma estructura.

El nivel de organización estructural más alto de la molécula de IFN- α 2 se encuentra en concordancia con el rol de los puentes disulfuro en la estabilización de su conformación

activa. Los cuatro residuos de cisteína conservados en casi todos los interferones de tipo I (1, 29, 99 y 139) forman dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys1-Cys98 y Cys29-Cys138 para el IFN- α 2, teniendo en cuenta la ausencia del residuo Asp44). Se ha demostrado que el enlace Cys1-Cys98 carece de un rol funcional o estructural. Sin embargo, la integridad del enlace Cys29-Cys138 es crítica para la actividad biológica del IFN- α 2 (Kontsek, 1994; Vilcek y Sen, 1996).

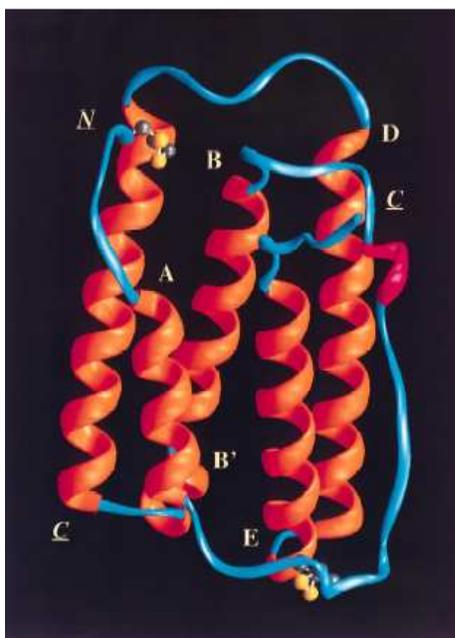


Fig. 1: Estructura del hIFN- α 2.

Representación gráfica en forma de cintas de la estructura tridimensional del hIFN- α 2a. Las hélices α (coloreadas en anaranjado) se designan con las letras A-E en la cercanía de su extremo N-terminal. Los extremos de la proteína se indican con las letras N y C. Los dos puentes disulfuro se muestran mediante una representación de esferas y bastones; los átomos de azufre se encuentran coloreados en amarillo y los átomos de carbono en gris. La figura fue preparada empleando el programa Ribbons 2.0 (Klaus y col., 1997).

A partir de la homología en la secuencia de aminoácidos del IFN- α y el IFN- β , puede deducirse que el plegamiento tridimensional de ambos es muy similar. La comparación de sus estructuras terciarias permite superponer 116 átomos de C α con una desviación de 1,5 Å. Las posiciones que difieren en más de 2 Å incluyen los residuos 6-9 del extremo N-terminal, 22-33 y 40-51 del lazo AB, 69-76 de la curvatura en la hélice B y 154-159 del extremo C-terminal. En la Fig. 2 se muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos del hIFN- α 2b y el hIFN- β basada en la estructura tridimensional de ambos (Radhakrishnan y col., 1996).

IFN- α 2b	. . .CDLPQTH	SLGSRRTLML	LAQMRRISLF	SCLKDRHDFG	FPQEEF.GNQ	FQKAETIPVL
IFN- β	MSYNLLGFLO	RSSNFQCQKL	LWQLNGRLEY	.CLKDRMNF	IPEEIKQLQQ	FQKEDAALTI
	1	11	21	30	40	50
IFN- α 2b	HEMIQQIFNL	FSTKDSSAAW	DETLLEDKIFYT	ELYQQLNLDLE	ACVIQGVGV	ETPLMKEDSI
IFN- β	YEMLQNIFAI	FRQDSSSTGW	NETIVENLLA	NVYHQINHLK	TVLEEKLEKE	DFTRGKLMSS
	60	70	80	90	100	110
IFN- α 2b	LAVRKYFQRI	TLYLKEKKYS	PCAWEVVRAE	IMRSFSLSTN	LQESLSRKE	
IFN- β	LHLKRYYGRI	LHYLKAKEYS	HCAWTIVRVE	ILRNFYFINR	LTGYLRN. . .	
	120	130	140	150	160	166

Fig. 2: Alineación de las secuencias aminoacídicas del IFN- α 2b e IFN- β humanos basada en su estructura tridimensional.

Las secuencias se numeran de acuerdo con la secuencia del IFN- β . En rojo se señala la Thr106 donde se produce la O-glicosilación del IFN- α 2b. En verde se señala la Asn80 responsable de la N-glicosilación del IFN- β (adaptado de Radhakrishnan y col., 1996).

1.7. Usos clínicos del IFN- α

La potente actividad antiviral del IFN- α en conjunción con su potencial acción antitumoral impulsaron la producción a gran escala de este interferón, con el fin de emplearlo como agente terapéutico en el curso de enfermedades virales y malignas. Actualmente, para uso terapéutico se emplea IFN- α humano recombinante (rhIFN- α) producido en bacterias (*E. coli*) o su forma modificada por la adición de polietilenglicol (PEG-rhIFN- α). Las formulaciones farmacéuticas del rhIFN- α 2a (Roferon-a[®], Hoffmann La Roche, Inc.) y de rhIFN- α 2b (Intron-a[®], Schering Plough) fueron las primeras aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de leucemias vellosas (LCV) en EE.UU., en 1986. Ambas proteínas son producidas en *E. coli* y si bien carecen de modificaciones post-traduccionales (O-glicosilación en la Thr 106), conservan intacta la actividad biológica del IFN- α 2a natural. Actualmente, estos IFNs y sus variantes modificadas (PEG-Intron[®], Schering Plough y Pegasys, Hoffmann La Roche, Inc.) se encuentran aprobadas en diferentes países para los usos clínicos mencionados.

En determinados casos, su utilización origina la aparición de efectos colaterales indeseados, como síntomas semejantes al resfrío, fiebre, pérdida del apetito, pérdida de peso y algunos efectos psicológicos como depresión o ansiedad. Parte de estos síntomas pueden explicarse considerando las elevadas dosis de citoquina que es necesario aplicar durante los tratamientos dada su rápida inactivación y eliminación de los fluidos y tejidos biológicos. Así, empleando la vía endovenosa, el tiempo de vida media en plasma del rhIFN- α 2 es aproximadamente 4 h, alcanzando valores indetectables antes de las 18 h

desde su administración. El catabolismo de la citoquina es fundamentalmente renal mediante filtración glomerular y reabsorción tubular, en la que se produce degradación proteolítica (Bino y col., 1982; Sotoca Momblona, 1999). Otras rutas de eliminación minoritarias incluyen inactivación por proteasas séricas y endocitosis mediada por receptor (Peleg-Shulman y col., 2004)

Tratamiento de enfermedades malignas

Como agente antitumoral, el IFN- α 2 se emplea en enfermedades hematológicas malignas y ciertos tumores sólidos. El cáncer que presenta mayor respuesta al tratamiento con IFN- α es una forma muy rara de leucemia de células B, conocida como leucemia de células vellosas (LCV), reportándose una respuesta mayor al 80% (Gutterman, 1994). En los pacientes con LCV, las “células vellosas” invaden el bazo y la médula ósea. Se ha confirmado que la terapia continua con IFN- α desarrollada durante varios meses permite erradicar dicho infiltrado celular. El IFN- β y el IFN- γ son menos efectivos contra esta patología. No todos los pacientes se benefician mediante el tratamiento con IFN- α debido al desarrollo en muchos casos de anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica, particularmente cuando se utiliza rhIFN- α 2 producido en bacterias. La terapia con IFN- α también ha demostrado disminuir lentamente la progresión de la leucemia mieloide crónica (LMC, Gutterman, 1994).

Otros ejemplos de enfermedades malignas (linfomas de células T cutáneos, carcinoma de células renales, tumores epiteliales escamosos de cuello y cabeza de útero, mieloma múltiple y melanoma maligno) han demostrado en mayor o menor medida susceptibilidad a la terapia con IFN- α , aunque generalmente con un menor porcentaje de pacientes respondedores con respecto al tratamiento de la LCV y la LMC.

La neovascularización de los tumores primarios es un paso crucial para su desarrollo y, por lo tanto, la actividad inhibitoria de la angiogénesis por acción del IFN- α podría tener valor terapéutico en ciertos procesos malignos tempranos. El sarcoma de Kaposi, frecuentemente encontrado en los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), se ha considerado como un tumor angiogénico o una enfermedad angioproliferativa, lo que explicaría el hecho de que el tratamiento con IFN- α produce la regresión de lesiones en más del 40% de los pacientes (Groopman y Scadden, 1989).

Tratamiento de enfermedades virales

Actualmente, la aplicación más exitosa del IFN- α para el tratamiento de enfermedades virales se centra en la terapéutica de la hepatitis crónica activa, causada tanto por el virus de hepatitis B (HBV) como por el virus de hepatitis C (HCV) (Gutterman, 1994). Más del 40% de los pacientes con hepatitis B crónica activa respondieron a la terapia con IFN- α luego del tratamiento durante 6 meses, desapareciendo los marcadores de infección viral y produciéndose posteriormente la seroconversión y la cura. En la infección con HCV, algunos serotipos virales son más sensibles al tratamiento con IFN- α que otros, pudiendo ser necesario un tratamiento prolongado (mayor a 6 meses) para prevenir recaídas (Gutterman, 1994). Tanto el IFN- α como el IFN- β han demostrado capacidad para inhibir la replicación *in vitro* del virus de inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1; Hartshorn y col., 1987). Sin embargo, existen escasas evidencias que demuestren que la terapia con IFN- α tenga algún efecto favorable a largo plazo en individuos con HIV-1 asintomático o pacientes con SIDA (Lane y col., 1990), excepto quizás por la limitada regresión de las lesiones ocasionadas por el sarcoma de Kaposi (Groopman y Scadden, 1989).

1.8. Efectos nocivos del IFN- α endógeno

A pesar de las propiedades terapéuticas de esta citoquina, la liberación excesiva de IFN- α endógeno como consecuencia de una infección viral aguda constituye un mecanismo muy perjudicial para el huésped. Este fenómeno fue descrito en investigaciones llevadas a cabo con ratones infectados por el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM). En este modelo, cuando se administró a los animales infectados anticuerpos anti-IFN- α/β demostró supresión de los síntomas de la enfermedad y disminución de la mortalidad (Gresser, 1984). Por otra parte, ha sido señalado que muchos de los síntomas generales denominados “tipo gripe” de una infección viral aguda imitan los efectos adversos observados en pacientes tratados con preparaciones farmacéuticas de IFN recombinante: fiebre, convulsiones, mialgia, fatiga, pérdida de peso y efectos inmunosupresores en médula ósea que se traducen en anemia, leucopenia y/o plaquetopenia. Adicionalmente, se han observado casos clínicos de coagulopatías y esporádicos daños renales. Estos datos sugieren que el IFN inducido durante el proceso de infección viral, probablemente en conjunción con otros factores incluyendo citoquinas endógenas, es el responsable de parte de la sintomatología que presentan las enfermedades desarrolladas.

Estudios realizados en pacientes sintomáticos con serología positiva para el HIV, correlacionaron directamente los niveles detectables de IFN- α con la progresión y severidad de la enfermedad (DeStefano y col., 1982; Kramer y col., 1992). El avance de esta patología está determinado por la progresiva disminución de los linfocitos T CD4⁺, no sólo por la lisis de las células infectadas producida por el virus, sino también por el estado de anergia y apoptosis inducido en las células T no infectadas, lo que provoca una disminución significativa de la respuesta inmune celular. El fenómeno de anergia está asociado con la desregulación de varias citoquinas, incluyendo la sobreexpresión de IFN- α en etapas tempranas de la infección del HIV. Por otro lado, la proteína Tat (transactivador de HIV-1) que es producida por las células infectadas y secretada al medio extracelular durante la infección aguda, actuaría como una toxina viral para las células sanas, induciendo su apoptosis. Este efecto inmunosupresivo estaría mediado, en parte, por el IFN- α dado que la proteína Tat aumenta marcadamente la síntesis de esta citoquina, generando un incremento local de su concentración en tejidos linfoides infectados con el HIV-1 (Zagury y col., 1998).

Se ha señalado que la sobreinfección de portadores crónicos del HBV o HCV con el virus de hepatitis A (HAV) se asocia con enfermedad hepática de mucho mayor severidad con respecto a la infección provocada por el virus HAV en ausencia de los anteriores (Locarnini, 2000), proponiéndose que la mayor agresividad de la enfermedad es el resultado de la inducción de IFN- α durante la etapa aguda de la misma. Los virus hepatotrópicos generalmente no son citopáticos, sino que el daño producido en el hígado se asocia a la respuesta inmune exacerbada del huésped. En este caso, la patogénesis estaría mediada por IFN- α , entre otras citoquinas, que estimularía linfocitos T citotóxicos, los cuales actuarían sobre las células hepáticas infectadas.

Otro caso comentado en la literatura es la fiebre hemorrágica argentina causada por el virus Junín, donde la presencia de elevados niveles de IFN- α (hasta 16.000 U.ml⁻¹) se correlaciona con la severidad de los síntomas y el pronóstico desfavorable de la enfermedad (De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1988; Levis y col., 1984).

Los efectos adversos de la liberación de IFN- α endógeno no sólo se han detectado en los procesos infecciosos agudos de origen viral, sino también durante el curso de numerosas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico. En pacientes que manifiestan esta patología, se han detectado niveles elevados de IFN- α inducido por la acción de complejos inmunes sobre células mononucleadas de sangre periférica (Batteux y

col.,1999). Específicamente, durante la endocitosis de complejos inmunes, luego de interactuar con los receptores Fc γ RII, la internalización de ácidos nucleicos o proteínas unidas a autoanticuerpos podría desencadenar la producción de IFN- α , que sería el causante de los síntomas de la mencionada enfermedad autoinmune.

Varias citoquinas, incluyendo el IFN- α y el IFN- γ , se han visto implicadas en la patogénesis de la diabetes tipo I o insulina dependiente (IDDM, por sus siglas en inglés) en modelos animales y humanos. Se ha reportado la sobreexpresión del ARNm y la presencia de IFN- α inmunorreactivo en células β de pacientes con IDDM (Foulis y col., 1987; Huang y col., 1995). Aparentemente, la expresión local de IFN- α por parte de células pancreáticas en respuesta a estímulos diabetogénicos, principalmente infecciones virales, podría desencadenar el proceso insulínico. En consistencia con esta hipótesis, se ha documentado la inducción de moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) por parte del IFN- α en células endoteliales de los islotes pancreáticos, la que podrían contribuir a la infiltración y estimulación de leucocitos durante la insulinitis (Chakrabarti y col., 1996)

Recientemente, se ha demostrado la incidencia del IFN- α en el desarrollo de la psoriasis (Nestle y col., 2005). Las células plasmacitoides predendríticas (PDCs, por sus siglas en inglés) infiltrarían la piel de pacientes afectados con psoriasis y se activarían para producir IFN- α en las etapas tempranas de la enfermedad. A través de esta expresión se produciría la activación y expansión de células T autoinmunes en la piel sana, provocando el desarrollo de la psoriasis. Si bien no se ha demostrado su relevancia funcional, las PDCs también han sido encontradas en tejidos inflamados en el curso de otras enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea.

2. Preparación de un panel de mAbs

La obtención de anticuerpos homogéneos con capacidad para interactuar específicamente con un determinado epítipo y con características reproducibles debido a la producción a partir de líneas celulares continuas, se hizo posible a partir del trabajo publicado en el año 1975 por Köhler y Milstein. Estos autores introdujeron la tecnología para inmortalizar clones de células secretoras de inmunoglobulinas (linfocitos B) por medio de la fusión con células de mieloma. Los anticuerpos producidos mediante esta estrategia recibieron el nombre de anticuerpos monoclonales (mAbs). Debido a la exclusiva capacidad

de interacción monoespecífica, reproducibilidad y posibilidad de producción continua de grandes cantidades de mAbs, éstos han complementado y en algunos aspectos sustituido las preparaciones de anticuerpos policlonales en la investigación, la terapéutica, el diagnóstico y los procesos industriales.

La técnica desarrollada para la preparación de mAbs implica la obtención de una célula denominada hibridoma. Los hibridomas son células somáticas inmortales que reúnen las propiedades de las células parentales que le dan origen. Estas células son, por un lado, los linfocitos B, que se obtienen a partir de ratones inmunizados con un dado antígeno y producen un anticuerpo específico para un determinante antigénico en particular y, por otro lado, las células de mieloma que le confieren a la célula híbrida la capacidad de reproducirse indefinidamente en cultivo (inmortalidad). La fusión de ambos tipos celulares genera la línea híbrida secretora de mAbs que reúne la información genética de ambos tipos celulares: el mieloma provee los genes que le confieren su inmortalidad y el linfocito B provee los genes que codifican para la expresión de la inmunoglobulina monoclonal.

La preparación de esta clase de anticuerpos mediante la metodología de immortalización de linfocitos B murinos, presenta tres aspectos fundamentales que deben tenerse en cuenta para desarrollar con éxito el proceso denominado hibridización:

1. Emplear las células parentales adecuadas.
2. Definir las condiciones apropiadas del proceso de fusión celular.
3. Elegir el sistema apropiado para la selección de células híbridas con respecto a las células no fusionadas.

Como células parentales se utilizan células de mieloma defectivas en la enzima HGPRT (Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferasa) involucrada en la vía de salvataje de purinas, y células esplénicas que expresan la enzima HGPRT pero se caracterizan por no crecer *in vitro* bajo condiciones de cultivo celular.

El proceso de fusión celular se realiza utilizando polietilenglicol (PEG) como fusógeno. Su empleo fue demostrado por primera vez por Pentocorvo (1975) y es aún el agente de elección para la hibridación de células de mamífero. El PEG genera la fusión de las membranas plasmáticas de las células adyacentes dando lugar a una célula híbrida que contiene dos o más núcleos. Esta célula heterocariota retiene el material genético hasta que

las membranas nucleares se disuelven para iniciar la división mitótica. Durante la mitosis y posteriores generaciones de divisiones celulares, los cromosomas individuales son segregados a las células hijas. Debido a la existencia de un número anormal de cromosomas, la segregación de los mismos no siempre genera grupos cromosómicos idénticos en las células de la progenie y algunos de ellos se pierden durante el proceso. Si los cromosomas que se pierden codifican alguna de las secuencias necesarias para la expresión de las inmunoglobulinas monoclonales, la producción de las mismas se detendrá y resultará un híbrido no secretor o un híbrido inestable que continuará eliminando su material genético. Finalmente, esto conducirá a inestabilidad de la línea celular y muerte.

El método de selección de hibridomas consiste en enriquecer un medio de cultivo celular con hipoxantina y timidina, agregando aminopterina como inhibidor de la síntesis *de novo* de purinas. En estas condiciones sólo sobreviven aquellas células que expresen la enzima HGPRT. Dicha enzima utiliza guanina o hipoxantina para sintetizar purinas, permitiendo la reutilización de las bases nitrogenadas (vía de salvataje), debido a que la síntesis *de novo* se encuentra bloqueada por la aminopterina. La adición de timidina permite a la célula sintetizar TMP (timidina monofosfato) vía timidina kinasa (TK) (Goldbaum y Fossati, 1996). Debido a que las células de mieloma utilizadas se caracterizan por ser defectivas en la enzima HGPRT (línea celular NS0), y a que las células esplénicas son incapaces de crecer *in vitro* bajo condiciones de cultivo celular, sólo los hibridomas podrán crecer en este medio de selección, al haber incorporado en su genoma la información necesaria para la expresión de dicha enzima.

En la actualidad, la utilización de mAbs incluye diversas aplicaciones (Merten, 1990). Entre ellas se pueden mencionar ejemplos tan diferentes como la generación de reactivos de diagnóstico para técnicas inmunoquímicas como ELISA, RIA, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, estudios inmunoquímicos, estructurales y funcionales sobre proteínas, el uso inmunoterapéutico para tratamiento de patologías como cáncer y rechazo de injertos. Por otro lado, su empleo como reactivo para la purificación de biomoléculas ha sido uno de sus mayores éxitos. La cromatografía de afinidad basada en el uso de mAbs es ampliamente utilizada como principal e incluso único paso de purificación de proteínas. En resumen, la tecnología de producción de mAbs ha significado un notable avance en áreas de desarrollo e investigación biomédica, bioquímica y biotecnológica.

3. Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos son el modelo arquetípico de proteínas multidominio. La molécula de inmunoglobulina se ensambla a partir de dos cadenas proteicas presentes en dos copias idénticas: la cadena liviana (aprox. 25 kDa) y la cadena pesada (aprox. 50 kDa) (Edelman y col., 1969). Por un lado, cada cadena liviana se asocia a la mitad N-terminal de cada cadena pesada para formar los dominios Fab de la molécula, mientras que de la unión de los extremos C-terminales de las cadenas pesadas se genera el dominio Fc (Fig. 3). Las cadenas pesadas y livianas se encuentran covalentemente unidas mediante puentes disulfuro, cuyo número y posición varía dependiendo de la clase y subclase de anticuerpo. De esta manera, la molécula resultante adopta la clásica estructura en forma de letra Y, con los sitios de unión al antígeno localizados en los extremos de cada región Fab. Esta conformación resultó finalmente demostrada con la primera estructura cristalográfica de rayos X de un anticuerpo monoclonal completo publicada en la década pasada (Harris y col., 1997).

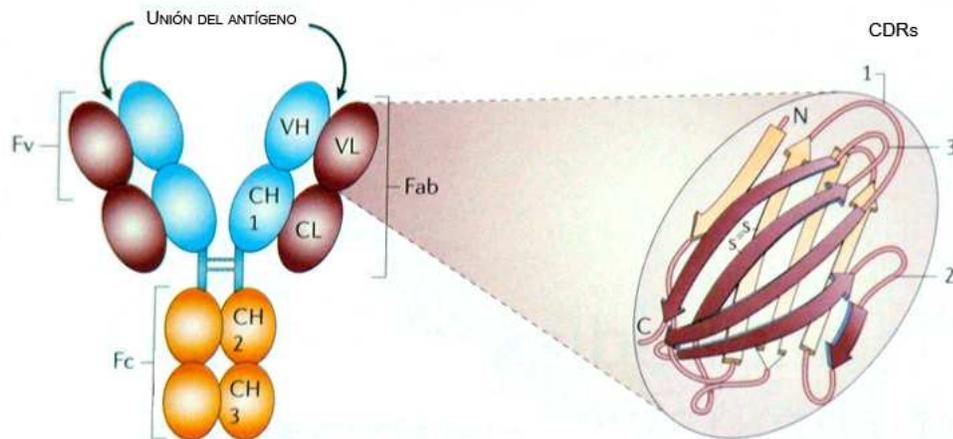


Fig. 3: Estructura modular de las inmunoglobulinas

En esta figura se esquematiza la estructura de una IgG típica. Esta proteína está constituida por dos cadenas pesadas (H) y dos cadena livianas (L). Las cadenas livianas están conformadas por un dominio constante (C_L) y un dominio variable (V_L) mientras que las cadenas pesadas se componen de tres dominios constantes (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}) y un dominio variable (V_H). Los dominios variables de ambas cadenas constituyen el sitio de unión al antígeno (Fv). Dentro de cada dominio variable existen tres *loops* denominados CDRs que proporcionan una mayor diversidad de secuencias y definen la especificidad del anticuerpo. La porción Fc, normalmente glicosilada, contiene los sitios de interacción con las moléculas efectoras y con una variedad de receptores Fc (adaptado de Brekke y Sandlie, 2006).

Las cadenas livianas pueden a su vez ser de dos tipos, κ ó λ (isotipo de cadena liviana) mientras que las pesadas pueden diferenciarse en cinco isotipos (μ , γ , α , δ , ϵ)

determinando la clase de inmunoglobulina del anticuerpo (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE). Asimismo, dependiendo de la especie animal, dentro de algunas clases encontramos múltiples subclases y variaciones alélicas.

Los anticuerpos son reactivos altamente específicos que proveen la clave de defensa contra patógenos, toxinas y otros agentes. Asimismo, los anticuerpos presentan dominios que son efectores de funciones, algunas de las cuales se ejercen directamente y otras sólo tienen lugar luego de la unión antígeno-anticuerpo. Entre estas propiedades figuran activación del sistema complemento, fijación a mastocitos, linfocitos B, macrófagos, atravesar membranas biológicamente activas, regulación de su ciclo catabólico, entre otras (Margni, 1996).

Las funciones efectoras y de unión al antígeno del anticuerpo pueden individualizarse mediante el uso de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, mediante la digestión con la enzima papaína se generan tres fragmentos individuales: dos Fabs idénticos con capacidad de unir al antígeno y un fragmento Fc que media las funciones efectoras y estabiliza toda la molécula del anticuerpo completo. Los fragmentos Fab comprenden los dominios variable (V_L) y constante (C_L) de la cadena liviana y los dominios variable (V_H) y constante 1 (C_{H1}) de la cadena pesada (Fig. 3). Los dominios C_L y C_{H1} se asocian para formar la región constante con una secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional altamente conservada. Los dominios V_L y V_H , por su parte, dan lugar a la región variable constituyente del sitio de unión al antígeno. Esta región variable muestra, sin embargo, un alto grado de conservación de secuencia y estructura en los segmentos de láminas β que conforman los dominios denominados *frameworks* (FR). El sitio de unión al antígeno propiamente dicho (F_v , representado por las regiones V_H y V_L) está constituido por seis *loops* (tres en cada cadena) denominados regiones determinantes de la complementaridad (CDRs, por sus siglas en inglés), o simplemente regiones hipervariables. Estas regiones, estabilizadas por los segmentos *frameworks*, forman la superficie molecular del anticuerpo que efectivamente contacta al epítopo del antígeno. De esta manera, por la variación de la cantidad y composición de aminoácidos en los CDRs se generan diversas estructuras que dan lugar a las diferentes especificidades.

4. Ingeniería de anticuerpos

El desarrollo de la ingeniería de anticuerpos fue impulsado por tres avances tecnológicos fundamentales. El primer paso esencial consistió en el desarrollo de métodos de clonado y manipulación de fragmentos de genes de anticuerpos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la aplicación de esta técnica para la creación de grandes repertorios de genes de anticuerpo (Griffiths y col., 1994; Hoogenboom, 1997). En segundo lugar, la producción de fragmentos de anticuerpo funcionales en forma soluble en la bacteria *E. coli* (Skerra y Plückthun, 1988; Plückthun y col., 1996) posibilitó la expresión rápida y reproducible de estas proteínas, lo que constituye una etapa crítica para su ingeniería. Por último, el surgimiento de las tecnologías basadas en la presentación de polipéptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos (*phage display*) posibilitó la selección de los anticuerpos recombinantes de manera rápida y eficiente (McCafferty y col., 1990; Rader y Barbas, 1997; Hoogenboom y col., 1998).

Actualmente se ha logrado reproducir *in vitro* los procesos claves del sistema inmune humoral (Griffiths y Duncan, 1998; Hoogenboom y col., 1998). De esta manera, es factible la producción de anticuerpos de alta afinidad sin recurrir a la tecnología convencional basada en hibridomas monoclonales y, en algunos casos, evitando la inmunización de animales de laboratorio.

Mediante ingeniería de proteínas la estructura del anticuerpo ha sido modificada para generar variantes con menor inmunogenicidad, mayor afinidad (Barbas y Burton, 1996; Low y col., 1996; Schier y col., 1996c), y estabilidad mejorada (Glockshuber y col., 1990). Por otro lado, los sistemas de expresión disponibles permiten la producción a gran escala en forma reproducible y económica (Plückthun y col., 1996).

5. Clonado de genes de anticuerpo

El clonado y la secuenciación de genes de anticuerpo constituyen la base fundamental de su ingeniería. En la actualidad, diversas técnicas de PCR son utilizadas para el clonado tanto de genes de mAbs individuales como de repertorios genéticos completos de animales (inmunizados o no), incluido el humano. Por otra parte, la utilización de esta tecnología permite retener e inmortalizar mAbs únicos, lo que puede resultar crucial para el rescate de aquellas líneas celulares de hibridomas que resulten inestables.

La amplificación de genes específicos mediante la técnica de PCR implica el uso de oligonucleótidos (*primers*) 5' y 3' complementarios a los extremos respectivos del gen. El diseño de primers para el extremo 3' de los genes de anticuerpos es directo, ya que se puede basar en las regiones constantes murinas que han sido secuenciadas en su totalidad (Kabat y col., 1991). Por otro lado, la gran variabilidad en la secuencia nucleotídica presente en el extremo 5' de los genes V complica su amplificación. Inicialmente, la secuencia aminoacídica N-terminal de anticuerpos purificados a partir de hibridomas fue utilizada para deducir las familias de genes V_H y V_L . De esta manera, las secuencias relativamente conservadas de las regiones 5' de los *frameworks* fueron utilizadas para diseñar *primers* parcialmente degenerados (Larrick y col., 1989). Paralelamente, una estrategia de aplicación más generalizada fue desarrollada por Orlandi y col. (1989). Las secuencias nucleotídicas de los genes murinos V_H y V_L provenientes de la base de datos de Kabat fueron alineadas y la frecuencia de los nucleótidos mayoritarios fue graficada para cada posición. Así, las secuencias consenso en las regiones 5' y 3' fueron identificadas para diseñar los oligonucleótidos adecuados. A partir de ese momento, numerosos grupos de investigación han diseñado y evaluado distintos conjuntos de *primers* para amplificar los genes V tanto murinos (Orum y col., 1993) como humanos (Campbell y col., 1992). Actualmente, los segmentos V_H y V_K de la línea germinal humana han sido completamente secuenciados (Tomlinson y col., 1995), y están publicados en varias bases de datos disponibles *on-line*, de manera que el diseño de los *primers* para su amplificación se ha simplificado.

Finalmente, los *primers* específicos para anticuerpos pueden ser utilizados para amplificar repertorios de ADN genómico o ARN total extraídos de bazo de ratón o de linfocitos periféricos (Gram y col., 1992), o a partir de linfocitos humanos (Sheets y col., 1998).

6. Fragmentos recombinantes de anticuerpo

Existe un gran rango de aplicaciones de los anticuerpos para las cuales las funciones mediadas por la región Fc no son requeridas o, incluso, son indeseadas. Para remover el dominio Fc y sus funciones asociadas, las inmunoglobulinas han sido sometidas a procedimientos que permiten obtener por separado sus dominios constituyentes. Inicialmente, se recurrió a tratamiento proteolítico y más tarde la ingeniería genética permitió el desarrollo de diversos tipos de fragmentos: monovalentes [Fab, Fv, fragmentos de cadena

única (scFv), dominios V_H y V_L], bivalentes (Fab'₂, diabodies, minibodies) y fragmentos multivalentes (Fig. 4) (Holliger y Hudson, 2005).

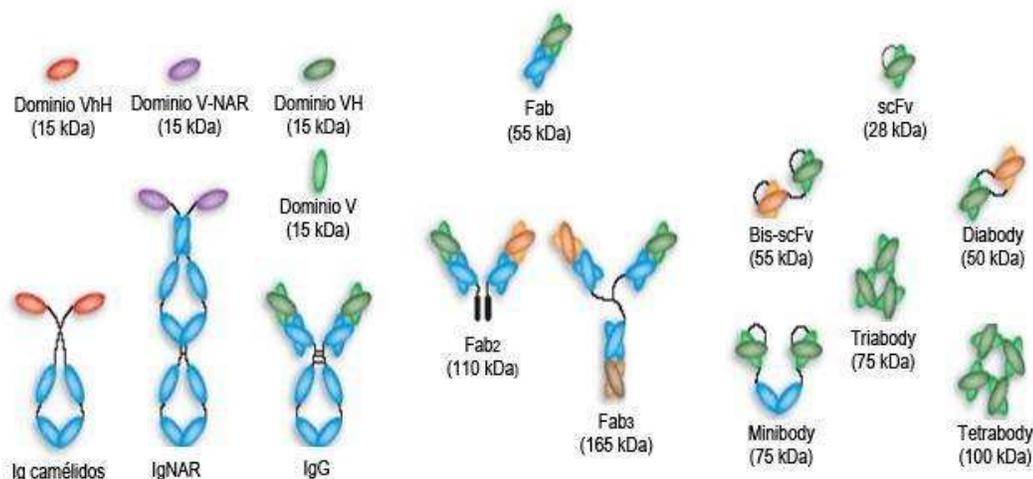


Fig. 4: Estructura de los fragmentos de anticuerpo

Representación esquemática de los distintos formatos de fragmento de anticuerpo. Se muestra la molécula intacta de IgG humana junto a las inmunoglobulinas de camélidos (VhH-Ig) y tiburón (Ig-NAR), que no poseen cadenas livianas. Los diferentes fragmentos de anticuerpos se detallan indicando su masa molecular aparente. El formato más utilizado es el denominado scFv formado por la unión covalente de las regiones variables V_H y V_L mediante un péptido *linker* (Holliger y Hudson, 2005).

Los fragmentos Fv tienen un tamaño pequeño que les confiere ciertas ventajas en relación a la mayor penetrabilidad en tejidos y tumores y mayor velocidad de eliminación del organismo. Sin embargo, estos fragmentos son poco estables, sus dos unidades constituyentes, los dominios V_H y V_L , se disocian con facilidad, y su afinidad por el antígeno suele ser muy inferior en relación al mAb parental. Para resolver estas dificultades se han desarrollado diversas estrategias entre las que la obtención de fragmentos denominados scFv sobresale por su amplia difusión. En este caso, los dominios V_H y V_L se vinculan mediante un péptido *linker* y son expresados como una única proteína (Huston y col., 1988). El *linker* más frecuentemente utilizado posee la secuencia aminoacídica $(Gly_4Ser)_3$ que le confiere la flexibilidad necesaria para orientar correctamente ambos dominios. Ambas orientaciones, V_H -*linker*- V_L y V_L -*linker*- V_H , se han utilizado con éxito, incluso para el mismo mAb original (Knappik y col., 1993). De todas maneras, la estabilidad termodinámica del fragmento scFv no es afectada de manera significativa por la presencia del péptido *linker*, sino que sigue dependiendo fundamentalmente de la energía de la interacción del par V_H - V_L . Por lo tanto, la expresión exitosa de grandes cantidades de estos fragmentos de anticuerpo

en un sistema bacteriano se vincula principalmente a las propiedades de plegamiento (*folding*) de los dominios, que resulta el factor limitante en el rendimiento global del proceso.

La bacteria gram negativa *Escherichia coli* es el organismo mejor caracterizado en relación a su genética y fisiología. Los procesos para su fermentación y modificación genética mediante tecnología de ADN recombinante están extensamente desarrollados. Consecuentemente, se han alcanzado elevados niveles de expresión de proteínas recombinantes, constituyendo hasta un 30% de las proteínas bacterianas en sistemas optimizados. De esta manera, múltiples formatos de fragmentos de anticuerpo se han producido exitosamente en dicho microorganismo: fragmentos Fab (Better y col., 1988), fragmentos V_H individuales (Ward y col., 1989) y Fv (Skerra y Plückthun, 1988), fragmentos Fv de cadena única (scFv) (Glockshuber y col., 1990; Skerra y col., 1991), y dímeros F(ab')₂ (Carter y col., 1992).

En este sistema de expresión, para que el plegamiento de la proteína se produzca correctamente con la formación debida de los enlaces disulfuro, los dominios individuales (o unidos mediante el *linker*) del anticuerpo deben ser transportados al ambiente oxidativo del periplasma bacteriano (Better y col., 1988; Skerra y Plückthun, 1988). Este direccionamiento al espacio periplásmico se efectúa mediante la fusión de secuencias que codifican para péptidos bacterianos de señalización (Carter y col., 1992; Pack y col., 1993). Eventualmente, los fragmentos de anticuerpo pueden liberarse en el medio de cultivo como consecuencia del "goteo" a través de la membrana externa de algunas cepas durante inducciones prolongadas (Hoogenboom y col., 1991).

La sobreproducción de fragmentos recombinantes en forma soluble en el espacio periplásmico suele afectar drásticamente la viabilidad de la célula huésped. Adicionalmente, los niveles de expresión alcanzados no son suficientes en vistas de un proceso a escala industrial. Por consiguiente, en estos casos la estrategia para la obtención de fragmentos de anticuerpo consiste en la renaturalización de las proteínas derivadas de cuerpos de inclusión, formados tanto en el citoplasma como en el periplasma (Huston y col., 1995). Sin embargo, en algunos casos la masa obtenida no compensa las dificultades inherentes al proceso necesario para lograr un anticuerpo funcional que retenga la afinidad, y aún la capacidad de reconocimiento del antígeno, originales.

7. Tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos

La generación de nuevas drogas involucra la búsqueda de elementos entre un gran número de componentes (bibliotecas) utilizando técnicas de selección *in vitro* bien definidas. Una de las tecnologías más difundidas está basada en la utilización de fagos filamentosos que desarrollan su ciclo de infección en *E. coli*. En esta metodología, el ADN correspondiente a las millones de variantes de ciertos ligandos (péptidos, proteínas y fragmentos derivados, etc.) se inserta dentro del genoma del fago unido al gen que codifica una proteína de su cubierta. La expresión e incorporación del producto de fusión en la cubierta del virus maduro resulta en su presentación en la superficie del fago, manteniendo su información genética en el interior de la partícula viral. Esta conexión entre el genotipo y el fenotipo del ligando permite el enriquecimiento selectivo de los fagos específicos utilizando la molécula blanco inmovilizada en fase sólida o en solución. De esta manera, los fagos que presenten un ligando relevante serán retenidos, mientras que los fagos no adheridos serán removidos en lavados subsecuentes. El fago unido puede recuperarse para infectar nuevamente las bacterias y realizar un nuevo ciclo de selección o, eventualmente, analizar sus propiedades de unión.

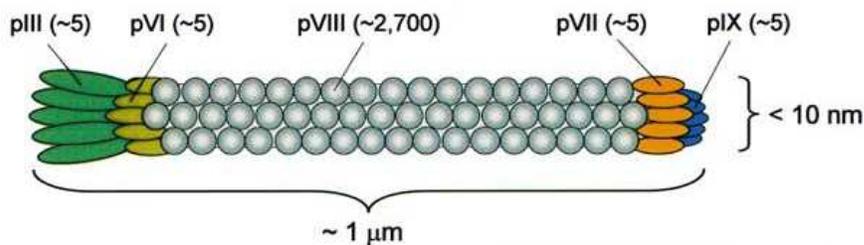


Fig. 5: Representación esquemática del fago M13

El fago M13 es uno de los vehículos más utilizados en las estrategias de phage display. Las proteínas de cubierta pIII se utilizan para presentar hasta un máximo de 5 proteínas, mientras que si se fusionan a la proteína pVIII es posible presentar miles de proteínas. Se indica entre paréntesis el número de copias de cada proteína constituyente de la partícula viral.

El fago filamentoso más frecuentemente utilizado es el bacteriófago M13, con capacidad de infectar las cepas de *E. coli* que contengan el plásmido conjugativo F (Fig. 5). Las partículas del fago se adhieren al extremo del pilus F y su genoma circular simple cadena se introduce en el citoplasma. El genoma se replica, utilizando proteínas tanto del fago como del huésped, y se empaqueta formando una partícula en forma de bastón que es secretada al medio extracelular sin producir la lisis de la bacteria infectada. Todas las proteínas del virión son transportadas al espacio periplásmico antes del ensamblado y la

extrusión. Para la presentación de secuencias peptídicas se han utilizado varias proteínas de la cubierta del fago, incluidas la pVIII y la pVI, pero en la actualidad el empleo de la pIII es el más difundido. Esta proteína presenta de 3 a 5 copias en el extremo de la partícula viral y está involucrada en el proceso de infección de la bacteria.

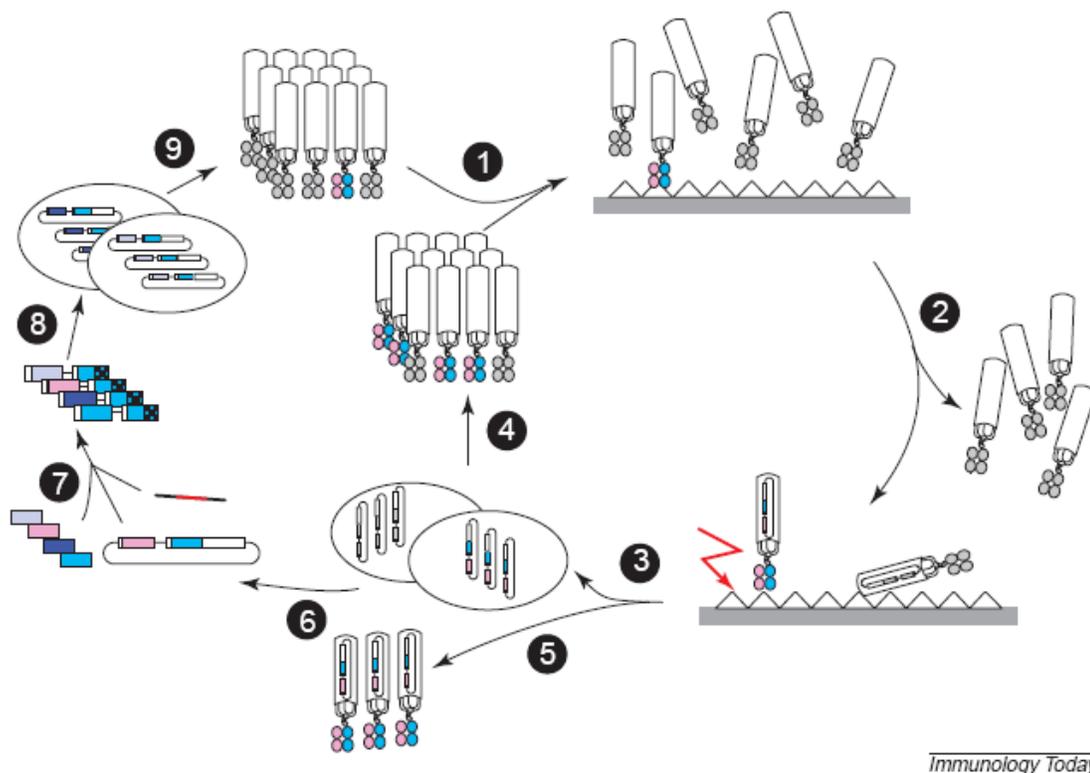


Fig. 6: Procesos de enriquecimiento selectivo de fagos: *biopanning*

Un repertorio del orden de 10^6 sitios de unión se incubó con el antígeno (1), en este caso inmovilizado en fase sólida. Se realizaron varios lavados para remover los fagos irrelevantes (2). Seguidamente, los fagos que permanecen unidos se separan del antígeno por *shock* de pH o directamente se agregan a bacterias para que sean infectadas por los mismos (3). Los fagos seleccionados se amplifican cultivando las bacterias infectadas (4) para generar un nuevo repertorio enriquecido en sitios de unión para el antígeno. Este ciclo puede repetirse varias veces para finalmente caracterizar la población resultante como anticuerpos monoclonales (5). Eventualmente, es posible aislar los genes de la población seleccionada y generar una mayor diversidad y una maduración de la afinidad de los anticuerpos, mediante técnicas como mutagénesis al azar (6 y 7). Este nuevo repertorio genético se utiliza para obtener una segunda población de fagos (9) que se someten a ciclos de selección adicionales (1-4) (adaptado de Hoogenboom y Chames., 2000).

En 1990 McCafferty y col. publicaron la primera experiencia de presentación de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos, uniendo un scFv anti-lisozima al extremo amino-terminal de la proteína pIII (Fig. 5). Posteriormente, se demostró que los fragmentos heterodiméricos Fab también podían presentarse como proteínas de fusión a pIII uniendo la cadena pesada (o la cadena liviana) a la proteína de cubierta y secretando la otra cadena al

espacio periplásmico, donde finalmente ambas cadenas se asociaban (Hoogenboom y col., 1991). En todos los casos, los fagos presentadores de anticuerpos que unían al antígeno podían ser separados de los fagos inespecíficos mediante un proceso de enriquecimiento selectivo que se denominó *biopanning* (Fig. 6).

Inicialmente se utilizaron vectores que incluían toda la información genética necesaria para el desarrollo del ciclo del fago. En la actualidad, los vectores denominados “fagémidos” son la elección. Estos vectores son plásmidos pequeños que contienen el gen III (franqueado por sitios de clonado apropiados) y una señal de empaquetamiento del fago (Hoogenboom y col., 1991). El ADN del fagémido que codifica, por ejemplo, la proteína de fusión anticuerpo-pIII es empaquetado utilizando un fago adicional (fago *helper*), usualmente el M13K07 o el VCS-M13, que provee las proteínas estructurales necesarias para tal fin. El genoma del fago *helper* posee una mutación en su origen de replicación y se replica con menor eficiencia, garantizando que la mayoría de los viriones contengan el fagémido. Los fagémidos poseen una mayor eficiencia de transformación y pueden utilizarse para la secreción directa del anticuerpo no fusionado, sin la necesidad de etapas de subclonado adicionales.

Si bien la extrusión de las partículas virales se produce de manera no lítica, la expresión de la proteína de fusión anticuerpo-pIII y su acumulación en el espacio periplásmico termina afectando la viabilidad celular. Por esto, en la mayoría de los sistemas de presentación que utilizan fagémidos la expresión está regulada por el promotor *lacZ*. Cuando se desea producir la partícula viral se elimina el represor catabólico (por lo general glucosa) del medio de cultivo, mientras que se lo mantiene en las etapas de crecimiento y propagación de los cultivos. Debido a que el genoma del fago *helper* codifica la proteína pIII nativa, cerca del 90% de las partículas recuperadas no presentan en su superficie el anticuerpo fusionado. Por lo tanto, la inmensa mayoría de los fagos presentadores de anticuerpos en su superficie serán monovalentes, permitiendo la selección de anticuerpos de alta afinidad al minimizar los efectos de avidéz.

8. Anticuerpos terapéuticos

En 1895 dos científicos franceses ensayaron una estrategia radical para el tratamiento del cáncer. Alternativamente a la cirugía, Richet y Héricourt administraron un antisuero policlonal derivado de perros a pacientes con cáncer avanzado. Muy pocos

pacientes registraron mejorías, la mayoría sufrieron graves problemas relacionados con la inmunogenicidad. Careciendo de especificidad, y sin un mínimo de pureza, la formulación no fue capaz de curar a ninguno de los individuos tratados. Poco tiempo después, Emil Behring publicó un trabajo donde demostraba que la terapia pasiva con sueros policlonales obtenidos mediante la inmunización de animales con la toxina diftérica era capaz de proteger de dosis consideradas letales para el organismo de dicha toxina. En perspectiva, estos estudios con sueros policlonales preparados individualmente para cada paciente resultan imprácticos y hasta rudimentarios en la actualidad. De todos modos, estas experiencias marcaron el comienzo histórico de la terapéutica basada en los anticuerpos (Hale, 2006). Además, las conclusiones formuladas por aquellos precursores resultaron realistas, siendo aún válidas:

- La terapia con anticuerpos puede aliviar los síntomas e incluso producir una remisión significativa de ciertas enfermedades.
- Es improbable la posibilidad de curar enfermedades avanzadas.
- En combinación con otros tratamientos radicales, por ejemplo cirugía, puede resultar una terapia adyuvante efectiva para eliminar ciertas metástasis, posiblemente produciendo la cura completa.

Los estudios en esta dirección prosiguieron esporádicamente durante más de medio siglo sin lograr ningún avance significativo y acumulando conclusiones pesimistas. Con el mentado descubrimiento de los anticuerpos monoclonales llevado a cabo por Köhler y Milstein en 1975 y, particularmente, por el hecho de que estos autores permitieron la difusión de la nueva tecnología sin restricciones legales, la terapia basada en anticuerpos adquirió nuevamente relevancia práctica. Así, en los comienzos de la década del 80, un número considerable de anticuerpos monoclonales entraron en fase de pruebas clínicas, en su mayoría indicados para el tratamiento de tumores hematológicos. Sin embargo, las preparaciones de anticuerpos utilizadas en este período eran todavía poco confiables. Por ejemplo, los anticuerpos derivaban de ascitis murinas, eran parcialmente purificados mediante precipitación salina. De todos modos, debido a su potencia y especificidad los anticuerpos monoclonales eran administrados en dosis muy inferiores en relación a los sueros policlonales y eran mucho mejor tolerados, con una menor intensidad en los efectos adversos. Aún así, los resultados clínicos demostraban ser muy modestos.

En 1982, un nuevo estudio afirmó la potencialidad de los anticuerpos como agentes terapéuticos. Philip Karr, un paciente con linfoma de células B, demostró remisión clínica completa de su afección en respuesta al tratamiento breve con un mAb murino anti-idiotipo (Miller y col., 1982). Las moléculas de inmunoglobulinas presentes en la superficie de células B tumorales constituyen uno de los pocos antígenos tumorales realmente específicos, pero su utilización como base de una terapia con anticuerpos implicaría la generación de un mAb diferente para cada paciente. De todos modos, este acontecimiento puntual se transformó en un modelo válido para entender el mecanismo de la terapia con anticuerpos.

Finalizando la década de 1980, sólo un anticuerpo monoclonal de origen murino, denominado OKT3 (genéricamente, muromonab), había sido aprobado en por la FDA para uso clínico en el tratamiento del rechazo de trasplante de riñón (1986). Para ese tiempo ya se había observado que los mAbs murinos resultaban altamente inmunogénicos en pacientes humanos, hecho que se traducía en una eliminación rápida del organismo, restándoles eficacia, y en el riesgo comprobado de desencadenar efectos adversos indeseados (Schroff y col., 1985). Esta respuesta generalizada se designó con el acrónimo HAMA (por *human-antimouse antibodies*) y suscitó que los sucesivos tratamientos resultaran inefectivos y aún peligrosos.

Paralelamente a las innovaciones efectuadas en la producción de mAbs a partir de cultivos de hibridomas, otros descubrimientos cruciales se venían produciendo en el marco de la naciente tecnología del ADN recombinante. Se comenzaba a dilucidar con cierto grado de detalle el mecanismo por el cual se organizaban y expresaban en las células B los genes de las inmunoglobulinas, y se entendía cómo se rearreglaban y mutaban previamente dichos genes en las líneas germinales. Inevitablemente, las técnicas de producción de mAbs y la tecnología de ADN recombinante fueron conjugadas para intentar resolver los problemas generados en la aplicación de los anticuerpos murinos como terapéutica en humanos. Así, se desarrollaron los primeros anticuerpos “quiméricos”, donde la región Fc de los anticuerpos murinos, hipotéticamente más inmunogénica y efectivamente deficitarias para desencadenar las funciones efectoras en humanos, fueron reemplazadas por las correspondientes cadenas de anticuerpos humanos, manteniendo la especificidad del sitio de unión al antígeno en las regiones variables murinas (Morrison y col., 1984). Transcurida una década desde su desarrollo, el primer anticuerpo quimérico terapéutico, ReoPro

(genéricamente abciximab), era aprobado por la FDA para la prevención de la coagulación sanguínea durante ciertas intervenciones cardíacas.

Debido a la hipótesis que sugería una relación lineal entre la proporción de aminoácidos de origen murino en un mAb y su inmunogenicidad, el siguiente paso lógico fue intentar conservar la mínima secuencia murina capaz de mantener el sitio de unión al antígeno funcional y situarla en el contexto de las secuencias conservadas de origen humano. El grupo liderado por Greg Winter, haciendo uso de su experiencia en mutagénesis sitio-dirigida de enzimas, finalmente logró transferir las regiones hipervariables (CDRs) de un mAb murino hacia un mAb humano, combinándolas con los *frameworks* de las regiones variables de este último (Riechmann y col., 1988). De esta manera entraron en escena los denominados anticuerpos humanizados. En un principio, estos anticuerpos no eran capaces de mantener la afinidad del anticuerpo murino original, debido a que, como se pudo comprobar luego en las estructuras deducidas por cristalografía de rayos X, ciertos aminoácidos de los *frameworks* murinos estaban implicados directamente en la unión al antígeno (o bien indirectamente estabilizando dicha interacción), y por lo tanto debían conservarse. Finalmente, la ingeniería de anticuerpos evolucionó generando soluciones tecnológicas que posibilitaron la obtención de anticuerpos humanizados con la afinidad (y otras características) adecuadas para entrar en las fases de ensayos clínicos. En 1998, seis nuevos mAbs eran lanzados al mercado en Estados Unidos, en su totalidad con una secuencia humana mayor al 70%. En la actualidad existen 21 anticuerpos monoclonales aprobados para uso clínico, y se estima que más de 350 drogas basadas en anticuerpos se encuentran en las distintas fases de estudios clínicos (Reichert y col., 2005).

Los anticuerpos que actualmente se comercializan fueron desarrollados mediante tecnologías que implicaban la utilización de mAbs murinos. Sin embargo, la ingeniería molecular ha progresado de tal modo que los anticuerpos terapéuticos pueden obtenerse sin la necesidad de inmunizar animales como punto de partida. El advenimiento de este tipo de anticuerpos, totalmente humanos y potencialmente dirigidos a cualquier tipo de antígeno (incluidos los no inmunógenicos y los tóxicos), fue posible merced al desarrollo de dos nuevos enfoques tecnológicos. El primero involucra el uso de ratones transgénicos comprometidos con respecto a la generación de anticuerpos. En este caso, la estrategia general consiste en introducir en los animales inmunocomprometidos (generalmente con las regiones J_H y J_K de los genes de anticuerpo delecionadas) parte del repertorio de genes de anticuerpos humano, utilizando para ello cromosomas artificiales de levadura (YACs, por sus

siglas en inglés) o, directamente, fragmentos de cromosoma humano direccionados mediante recombinación homóloga (Lonberg, 2005). Luego, los ratones pueden ser inmunizados con el antígeno de interés para generar anticuerpos totalmente humanos mediante la tecnología de cultivos de hibridomas tradicional. La segunda técnica desarrollada, que realmente permite evitar la inmunización de animales, se basa en la presentación de grandes repertorios (bibliotecas) de dominios V_H y V_L de anticuerpos humanos en la superficie de fagos (*phage-display*), y en la selección y amplificación de los fagos específicos mediante procesos de *panning* contra el antígeno de interés. En un principio, los dominios variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo se clonaron a partir de una extensa población de linfocitos B periféricos humanos (Marks y col., 1991). Sin embargo, el conjunto de proteínas que reconocen antígenos efectivamente representado en la superficie de los fagos estaba limitado al repertorio de genes V presentes en la biblioteca original. Para generar una mayor diversidad, se comenzó a sustituir regiones de los genes V por fragmentos de secuencia aleatoria generados sintéticamente (generalmente en las regiones CDR1 y CDR2, manteniendo la región CDR3 intacta) dando lugar a bibliotecas “semi-sintéticas”. Finalmente, con la información derivada de la secuenciación completa de los genes de anticuerpos de líneas germinales, se desarrollaron bibliotecas combinatorias de anticuerpos con secuencia completamente sintética (Knappik y col., 2000).

Debe tomarse en consideración que el problema de la inmunogenicidad no desaparece totalmente con la disminución del componente murino en un anticuerpo. El sistema inmune humano puede producir anticuerpos potencialmente contra cualquier proteína terapéutica. De hecho, los prospectos de todos los mAbs aprobados por la FDA reportan que al menos algunos pacientes desarrollaron anticuerpos detectables contra los productos. En este sentido, es difícil precisar *a priori* si la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos, humanizados e incluso totalmente humanos, difiere considerablemente. Efectivamente, no existe ninguna evidencia proveniente de ensayos clínicos controlados que avale diferencias de inmunogenicidad entre anticuerpos obtenidos por diversas ingenierías, y es poco probable que tales ensayos se lleven a cabo alguna vez debido a su dificultad práctica inherente.

OBJETIVOS Y PLAN DE TESIS

1. Obtención y caracterización de mAbs anti-rhIFN- α 2b

- a- Preparación de un panel de mAbs anti-rhIFN- α 2b.
- b- Caracterización inmunoquímica del panel de mAbs anti-rhIFN- α 2b.
- c- Desarrollo de ensayos inmunoquímicos para identificación y cuantificación del rhIFN- α 2b.
- d- Evaluación de la capacidad de los mAbs para inhibir la actividad biológica anti-viral *in vitro* del rhIFN- α 2b.

Este primer objetivo constituye un componente tecnológico de gran utilidad durante el desarrollo y producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico. La obtención y caracterización de un panel de mAbs anti-rhIFN- α es un instrumento fundamental para el diseño de procedimientos inmunoquímicos destinados a la evaluación cuali- y cuantitativa de la citoquina durante las distintas etapas de su proceso productivo.

2. Obtención y caracterización de anticuerpos recombinantes anti-rhIFN- α 2b

- a- Preparación de fragmentos scFv a partir de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2.
- b- Caracterización de los fragmentos scFv obtenidos y evaluación de su capacidad para inhibir la actividad biológica anti-viral *in vitro* de diferentes subtipos de IFN- α .
- c- Obtención de fragmentos scFv con elevada capacidad de unión a la citoquina.
- d- Evaluación de la capacidad de inhibición de la actividad biológica antitumoral de la citoquina.

Los efectos nocivos y síntomas generados por la liberación incrementada de IFN- α durante el transcurso de diferentes patologías humanas podrían suprimirse con la utilización de anticuerpos monoclonales neutralizantes de dicha citoquina. Dada la inmunogenicidad registrada en humanos por parte de las inmunoglobulinas murinas, su utilidad en el tratamiento de enfermedades crónicas es limitada. Consecuentemente, En este segundo objetivo se plantea el desarrollo de anticuerpos recombinantes anti-rhIFN- α 2 para su utilización terapéutica en los casos en que la producción endógena de dicha citoquina comprometa la salud humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y soluciones

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultra pura obtenida por ósmosis inversa (conductividad 18,2 M Ω) y filtración (0,22 μ m), empleando un equipo Milli Q^{UF} (Millipore, Francia). Todos los reactivos cuya procedencia no se indica fueron de un grado de pureza analítica.

2. Interferones

El IFN- α 2b humano recombinante (rhIFN- α 2b) producido en bacterias fue provisto por Protech Pharma S.A. (Santa Fe, Argentina) mientras que el IFN- β humano recombinante (rhIFN- β) producido en bacterias fue adquirido a Schering-Plough S.A. (Buenos Aires, Argentina).

Los estándares internacionales de los distintos tipos de hIFN- α fueron adquiridos en el *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC; Hertfordshire, Reino Unido): rhIFN- α 2a (NIBSC 95/650), rhIFN- α 2b (NIBSC 95/566), hIFN- α leucocitario (NIBSC 94/784) y hIFN- α linfoblástico (NIBSC 95/568).

3. Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales

Durante el desarrollo del presente trabajo se emplearon las siguientes líneas celulares de mamífero:

- WISH (ATCC CCL-25; Hayflick, 1961): cedida gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (Buenos Aires, Argentina). Es una línea derivada de tejido amniótico humano, susceptible a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

- MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) (ATCC CCL-22; Madin y Darby, 1958): obtenida de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC; Buenos Aires, Argentina). Son células bovinas derivadas de riñón de un animal adulto normal, susceptibles a la infección con el virus VSV.
- PC-3 (Kaighn y col., 1979; Pan y col., 1999): obtenida de la colección de cultivos del *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ; Braunschweig, Alemania). Es una línea celular humana establecida a partir de un adenocarcinoma de próstata humano, capaz de formar tumores en ratones *nude*.
- NS0 (Galfrè y Milstein, 1981): cedida gentilmente por la Universidad de Buenos Aires. Es una línea celular de mieloma murino (cepa BALB/c), derivado de la línea celular NSI/1.Ag4.1, no secretor de inmunoglobulinas.

La cepa bacteriana *E. coli* DH5 α F'1q fue cedida gentilmente por la Fundación Pablo Cassará (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Se empleó para el aislamiento y la amplificación de diferentes plásmidos. Las cepas bacterianas derivadas de *E. coli* TG-1 y HB2151 fueron adquiridas a la empresa GE Healthcare (Suecia). Estas bacterias se utilizaron durante la etapa de clonado y producción de los fragmentos de anticuerpos recombinantes.

El virus de la estomatitis vesicular (VSV), cepa Indiana (ATCC VR-158), fue cedido gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui".

El bacteriófago KO7 *helper* fue adquirido a la empresa GE Healthcare.

4. Medios de cultivo

4.1. Medios de cultivo para células de mamífero

Para la disolución de todos los componentes de los medios de cultivo se utilizó agua ultra pura depirogenada, obtenida por ósmosis inversa (conductividad 18,2 M Ω). La esterilización de los medios de cultivo y de sus suplementos se realizó por filtración

empleando unidades de filtración estériles provistas de membrana con un tamaño de poro de 0,22 μm (Sartorius, Alemania).

El suero fetal bovino (SFB; Bioser, Argentina) empleado para la suplementación de los medios de cultivo fue previamente descomplementado por incubación en baño de agua a 56 °C durante 30 min.

4.1.1. Medios de cultivo para hibridomas

La preparación de hibridomas se realizó utilizando los siguientes medios de cultivo:

- A- D-MEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*; Gibco, EE.UU.) 13,37 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ suplementado con NaHCO_3 (Gibco) 3,7 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, piruvato de sodio (Gibco) 0,11 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, sulfato de gentamicina (Parafarm, Argentina) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y Tylosina (α -PPLO; Gibco) 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- B- Medio de cultivo A suplementado con SFB 2,5% (v/v).
- C- Medio de cultivo A suplementado con SFB 10% (v/v).
- D- Medio de cultivo A suplementado con SFB 20% (v/v) y suplemento HAT (*Hipoxantina-Aminopterina-Timidina*; Gibco) en una concentración final de hipoxantina 0,1 nM, aminopterina 400 nM y timidina 0,016 nM.
- E- Medio de cultivo A suplementado con SFB 20% (v/v) suplemento HT (*Hipoxantina-Timidina*; Gibco) en una concentración final de hipoxantina 0,1 nM y timidina 0,016 nM.

4.1.2. Medios de cultivo para células WISH y MDBK

Para el cultivo de las líneas celulares WISH y MDBK y el desarrollo de los ensayos de valoración biológica *in vitro* de los diferentes tipos y subtipos de IFN y su neutralización, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- A- Medio de crecimiento: MEM (Minimum Essential Medium, Gibco) suplementado con NaHCO_3 2,2 g.l⁻¹, SFB 10% (v/v), L-glutamina (Gibco) 0,29 g.l⁻¹ y sulfato de gentamicina (Parafarm) 50 µg.ml⁻¹.
- B- Medio de ensayo: ídem medio de crecimiento con SFB 2 % (v/v).
- C- Medio de lavado: ídem medio de crecimiento sin SFB.

La línea tumoral PC-3 se cultivó empleando el medio F consistente en una mezcla de igual volumen de medio RPMI 1640 (Gibco) y medio Ham's F12 (Gibco), suplementado con SFB 10% (v/v).

4.2. Medios de cultivo para bacterias

- A- Medio LB (Luria-Bertani): triptona 10 g.l⁻¹, extracto de levadura 5 g.l⁻¹ y NaCl 10 g.l⁻¹.
- B- Medio LB-agar: medio LB con el agregado de 2% (p/v) de agar.
- C- Medio 2xYT: triptona 17 g.l⁻¹, extracto de levadura 10 g.l⁻¹ y NaCl 5 g.l⁻¹.
- D- Medio 2xYT-G: medio 2xYT con glucosa 20% (p/v).
- E- Medio 2xYT-AG: medio 2xYT con ampicilina 100 µg.ml⁻¹ y glucosa 20% (p/v).
- F- Medio 2xYT-AK: medio 2xYT con ampicilina 100 µg.ml⁻¹ y kanamicina 100 µg.ml⁻¹.
- G- Medio 2xYT-AI: medio 2xYT con ampicilina 100 µg.ml⁻¹ e IPTG (Sigma) 1mM.
- H- Medio SOBAG-agar: triptona 20 g.l⁻¹, extracto de levadura 5 g.l⁻¹, NaCl 0,5 g.l⁻¹, MgCl_2 10 mM, glucosa 0,1% (p/v), ampicilina 100 µg.ml⁻¹ y agar 1,5% (p/v).
- I- Medio SOBAG-N: medio SOBAG-agar con ácido nalidíxico 100 µg.ml⁻¹.
- J- Medio mínimo de crecimiento (MMC): Na_2HPO_4 6 g.l⁻¹, KH_2PO_4 3 g.l⁻¹, NH_4Cl 1 g.l⁻¹, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,203 g.l⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,147 g.l⁻¹, clorhidrato de tiamina 0,337 g.l⁻¹, glucosa 0,1% (p/v) y agar 1,5% (p/v).

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo en autoclave durante 15 min a una presión de 1 atmósfera y una temperatura de 120 °C. Los reactivos glucosa, tiamina e IPTG fueron esterilizados por filtración empleando unidades filtrantes de 0,22 µm de tamaño de poro (Sartorius). El agregado de tales reactivos y de los antibióticos (ampicilina, kanamicina y ácido nalidíxico) se realizó a los medios basales previamente esterilizados. En el caso de los medios agarizados el agregado de los suplementos se realizó sobre dichos medios fundidos una vez que la temperatura alcanzó los 50 °C.

5. Mantenimiento de los cultivos de células de mamífero

Todas las líneas celulares empleadas en este trabajo de tesis fueron cultivadas en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Nuaire, EE.UU.).

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- A- Placas multipozos de poliestireno (Nunclon, EE.UU.) de 96, 24 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2,0 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- B- Cajas de Petri (Nunclon) de 5 y 10 cm de diámetro (4,9 y 19,6 cm² de superficie, respectivamente).
- C- Frascos T (Nunclon) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.

En todos los casos, se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney (1994).

Los cultivos iniciales y los subcultivos siguientes fueron realizados por dilución de alícuotas de suspensiones celulares en el medio de cultivo correspondiente. En el caso de células que crecen en suspensión, como los hibridomas y las células NS0, los subcultivos se efectuaron por simple dilución empleando medio de cultivo fresco. Para realizar el subcultivo de aquellas líneas celulares que proliferan en condiciones de adherencia a una superficie (sustrato), tal como ocurre con las células MDBK y WISH, es necesario liberarlas de dicho sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Para ello, se retiró el sobrenadante de un cultivo en fase de crecimiento exponencial, lavándose la capa celular con una solución de tripsina 0,05% (p/v) (Gibco), Na₄EDTA 0,02% (p/v) (Gibco) en solución salina de fosfatos (PBS: KH₂PO₄ 0,6 g·l⁻¹, Na₂HPO₄ 0,78 g·l⁻¹, NaCl 8,8 g·l⁻¹, pH 8) con la finalidad de

neutralizar factores con actividad anti-tripsina presentes en el SFB. Independientemente del sistema de cultivo empleado, se utilizó una proporción de 20 μ l de dicha solución por cada cm^2 de superficie. Posteriormente, se eliminó la solución de lavado y se agregó la misma proporción de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario hasta lograr el desprendimiento completo de las células adheridas (controlándose por observación directa al microscopio). Finalmente, se adicionó una cantidad conveniente de medio de cultivo, se homogeneizó la suspensión y se tomó una alícuota para efectuar el recuento celular. A partir del mismo, se realizó el subcultivo por simple dilución de la suspensión celular en el volumen apropiado de medio fresco.

6. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales

El recuento se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión del azul de tripán (Griffiths, 1986). El fundamento de la técnica se basa en que las células muertas presentan un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que permite el ingreso del colorante hacia su interior. La suspensión celular se diluyó convenientemente con la solución de azul de tripán 0,4% (p/v) en PBS y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente antes de proceder a la carga de la cámara de recuento.

Mediante el empleo de esta técnica se determinó, por un lado, la concentración de células totales (X_T) y por otro, la concentración de células que aparecen coloreadas (células no viables o muertas, X_M). Finalmente, se calculó la concentración de células viables (X_V) y, a partir de este dato, se determinó la viabilidad porcentual del cultivo (V) como se indica en las siguientes ecuaciones:

$$X_T \text{ o } X_M = \text{N}^\circ \text{ células totales o muertas contadas} \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{4} \cdot (\text{dil.})^{-1} \quad (1)$$

$$X_V = X_T - X_M \quad (2)$$

$$V(\%) = \frac{X_v}{X_T} \times 100 \quad (3)$$

7. Criopreservación de células

7.1. Células de mamífero

La criopreservación es un método de conservación de células que garantiza el mantenimiento de las propiedades metabólicas iniciales de las mismas (Hasegawa, 1996). La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido empleando una técnica de enfriamiento escalonado, desde temperatura ambiente hasta -196 °C. Para la etapa de congelamiento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, en una centrífuga Eppendorf 5403 (rotor 16A4-44; Alemania). Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una solución de SFB y dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) en una relación volumétrica 95:5, empleando un volumen adecuado de modo de obtener una concentración de $1-2 \cdot 10^6$ cél.ml⁻¹. La suspensión celular se distribuyó en criotubos (Nalgene, EE.UU.) a razón de 1 ml por tubo. El congelamiento se realizó gradualmente mediante la siguiente secuencia de temperaturas: 1 h a 4 °C, 1 h a -20 °C y 30 min a -70 °C. Finalmente, los criotubos fueron almacenados en termos con nitrógeno líquido a -196 °C.

7.2. Cepas bacterianas

Para la criopreservación de bacterias, se procedió a cultivar las mismas en los medios apropiados durante 18 h a 37 °C. Posteriormente, a un volumen de 800 µl de cultivo se adicionaron 200 µl de glicerol estéril (Merck, Alemania), homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol. Finalmente, la suspensión celular fue conservada en criotubos a -70 °C (Sambrook y col., 1989).

8. Revitalización de líneas celulares

8.1. Células de mamífero

Para llevar a cabo la descongelación de las líneas o clones celulares de interés, se retiró el criotubo del termo de nitrógeno y se colocó rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Inmediatamente, la suspensión celular se agregó a un tubo estéril que contenía 40 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó para eliminar el DMSO que resulta tóxico para las células en cultivo. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de cultivo.

8.2. Cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas, se obtuvo una pequeña porción de material con un ansa estéril a partir de la superficie del cultivo congelado e inmediatamente se realizó una estría en una placa de medio agarizado. El criotubo se conservó a -70 °C y la placa se incubó a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se tomó una colonia bacteriana aislada y se amplificó el cultivo en el medio líquido correspondiente (Sambrook y col., 1989).

9. Preparación de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b

La metodología para la preparación de hibridomas fue llevada a cabo siguiendo esencialmente la técnica descrita por Galfrè y Milstein (1981).

A- Inmunización de ratones

Cuatro ratones BALB/c hembras de 2 meses de edad fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 50 μ g de rhIFN- α 2b disuelto en 0,2 ml de PBS y emulsionado con igual volumen de adyuvante de Freund completo. El tratamiento se repitió cada 7 días durante 3 semanas empleando, en esta oportunidad, adyuvante de Freund incompleto (Sigma). Transcurrida una semana desde la última inyección, se extrajo sangre para

verificar la presencia de anticuerpos anti-rhIFN- α 2b por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.1). Luego de un período variable de descanso (4, 7 y 9 meses), los animales se reestimularon por vía i.p. con 50 μ g de rhIFN- α 2b disuelto en 0,4 ml de PBS. Tres días después se sacrificaron los animales y las células del bazo se utilizaron para la fusión.

B- Preparación de una capa de células alimentadoras (*feeder layer*)

El desarrollo de hibridomas requiere condiciones óptimas de cultivo celular, es decir, el aporte de nutrientes y factores de crecimiento que permitan a la célula híbrida iniciar su proliferación. Por ello, además de los nutrientes presentes en los medios de cultivo formulados, se empleó SFB en una concentración del 20% (v/v) y una capa de células alimentadoras que se preparó a partir de un bazo de ratón de la cepa BALB/c. La presencia de estas células incrementa las posibilidades de crecimiento de hibridomas cuando se encuentran en muy bajas densidades celulares tal como ocurre en una etapa de fusión y clonado celular. Además, su empleo es esencial para favorecer el desarrollo de aquellos híbridos de fusión que demuestran severas dificultades en el crecimiento.

La preparación del *feeder layer* se realizó de la siguiente manera: un ratón de la cepa BALB/c, anestesiado en atmósfera de éter etílico, se mató por dislocación cervical y en condiciones estériles se extrajo el bazo. Se lavó con medio de cultivo B, se disgregó mediante el empleo de tijeras y pinza de cirugía y se filtró por un tamiz de malla fina de acero número 50 (Sigma). El filtrado se centrifugó, y luego de descartar el sobrenadante, las células de bazo se resuspendieron en medio de cultivo D de selección. Posteriormente, 100 μ l de esta suspensión celular se dispensaron en 10 placas de 96 pozos.

C- Preparación de células para la fusión

Células de bazo:

Se sacrificó el ratón por dislocación cervical y se le extrajo el bazo en condiciones estériles. Se lavó con medio de cultivo B en placa de Petri y luego se disgregó mediante el empleo de tijeras y pinza de cirugía. El producto de disgregación fue filtrado por malla de acero número 50. Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en el mismo medio de cultivo.

Células de mieloma:

Se emplearon células NS0, mieloma no secretor obtenido a partir de la cepa BALB/c (Glafrè y Milstein, 1981), cultivadas en medio de cultivo C. Las células, en fase de crecimiento exponencial, se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo B. La viabilidad, determinada por método de exclusión de azul de tripán, fue mayor a 90%.

D- Fusión celular

Las células de bazo se fusionaron con las células de mieloma en una relación 1/10 (10^7 células de mieloma : 10^8 células de bazo). Asumiendo que un bazo de ratón aporta 10^8 células, se mezclaron ambos tipos celulares en alícuotas necesarias para alcanzar la relación anteriormente mencionada. El agente de fusión empleado fue PEG 3350 (Sigma).

Luego de agregado el PEG preparado al 50% (p/v) en PBS, se adicionaron diferentes volúmenes de medio de cultivo A a distintos intervalos de tiempo de manera de diluir el PEG. Posteriormente, la mezcla celular fue centrifugada y resuspendida en medio de cultivo D. La suspensión celular fue sembrada en 10 placas de 96 pozos.

E- Selección de hibridomas

El método de selección de hibridomas se basó en enriquecer un medio de cultivo celular con hipoxantina y timidina, y en agregar aminopterina como inhibidor de la síntesis *de novo* de purinas. En estas condiciones sólo sobreviven aquellas células que expresen la enzima HGPRT.

Antes de realizar la experiencia de fusión celular, las células de mieloma fueron evaluadas en su capacidad de resistencia frente a aminopterina. Para ello, un cultivo de mieloma en fase de crecimiento exponencial fue subcultivado en frasco T (de 25 cm^2 de superficie) en una concentración de $100.000\text{ cél.ml}^{-1}$ en medio de cultivo D. Las células cultivadas de esta manera demostraron muerte total a los 5 días.

Debido a que las células de mieloma no sobrevivieron luego de 5 días de exposición a aminopterina, se seleccionó el día 7 luego de la fusión celular para iniciar el cambio de medio de cultivo. El mismo se realizó recambiando la mitad del volumen de cada pozo, por

medio de cultivo E sin aminopterina y suplementado con hipoxantina y timidina para favorecer el crecimiento de las células seleccionadas.

F- Monitoreo de anticuerpos específicos anti-rhIFN- α 2b en sobrenadantes de cultivo de hibridomas

Para tal fin se utilizó una técnica de ELISA específico indirecto dadas sus características de sensibilidad y sencillez de ejecución (Anexo A.1). Los ensayos se realizaron sobre aquellos cultivos que alcanzaron aproximadamente un 70% de confluencia luego de 48 a 72 h sin recambio de medio de cultivo. Los clones que demostraron presencia de inmunoglobulinas específicas anti-rhIFN fueron amplificados gradualmente. A partir de las placas de 96 pozos toda la suspensión celular fue subcultivada en placas de 24 pozos luego en placas de 6 pozos y finalmente en frasco T de 25 cm² de superficie. Los cultivos fueron mantenidos mediante repiques sucesivos de manera de obtener material celular apropiado para la criopreservación y el clonado posterior.

G- Clonado de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b

El objetivo principal del clonado es aislar clones que producen mAbs con distinta especificidad y afinidad, seleccionando aquellos híbridos que son estables en su capacidad de producir anticuerpos.

El clonado debe realizarse lo antes posible, dado que múltiples clones compiten en un mismo cultivo por su crecimiento y esto, en conjunto con la segregación de cromosomas, puede desestabilizar la expresión de una dada línea de hibridoma.

El clonado de hibridomas se llevó a cabo por el método de dilución límite (Whitlock y Muller-Sieburg, 1990). Para ello, los hibridomas se resuspendieron en medio de cultivo E preparando suspensiones celulares cuyas concentraciones fueron 0,5 cél.ml⁻¹, 5 cél.ml⁻¹ y 50 cél.ml⁻¹. En dos placas de 96 pozos, divididas cada una en 3 regiones equivalentes, se sembró cada suspensión de hibridomas en un sector diferente. Se dispensaron 200 μ l por pozo de manera que la placa quedó configurada por 3 sectores conteniendo en promedio 0,1 célula por pozo (es decir, 1 célula cada 10 pozos), 1 célula por pozo y 10 células por

pozo, respectivamente. Las líneas celulares fueron clonadas empleando una capa de células alimentadoras para favorecer el crecimiento de los hibridomas.

A partir del momento en que se observó crecimiento de híbridos en los pocillos correspondientes a la siembra de 0,1 y 1 célula por pozo, se determinó el número de clones visualizados por cavidad. Cuando éstos llegaron a una densidad adecuada se investigó la presencia de anticuerpos anti-rhIFN- α 2b por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.1). Los clones que demostraron reacción positiva por ELISA fueron expandidos gradualmente y congelados.

El clonado se consideró efectivo cuando se observó hasta un 33% de crecimiento monoclonal en los pozos donde se sembraron en promedio 0,1 y 1 célula por pozo.

10. Producción y purificación de mAbs anti-rhIFN- α 2b

10.1. Producción *in vivo* de mAbs anti-rhIFN- α 2b

La producción de líquido ascítico se llevó a cabo empleando ratones BALB/c machos de 4 meses de edad para cada hibridoma seleccionado para su amplificación. La secuencia metodológica desarrollada para la obtención de líquido ascítico constó de las siguientes etapas:

- 1- Inoculación i.p. de 0,5 ml de ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico (Pristane[®]; Sigma) que actúa como sustancia irritante para el ratón, quien responde secretando nutrientes y reclutando monocitos y células linfoides en la zona peritoneal (Harlow y Lane, 1988). De esta manera, se genera un ambiente muy favorable para la proliferación de las células tumorales.
- 2- Inoculación i.p. de $2 - 5 \cdot 10^6$ células de hibridoma por animal, 10 días después de la administración de Pristane[®]. Para ello, un cultivo de hibridomas en fase de crecimiento exponencial fue centrifugado y resuspendido en 10 ml de PBS de manera de inocular 0,5 ml de suspensión celular por ratón.

- 3- El líquido ascítico fue recolectado aproximadamente a partir de la primera semana posterior a la inoculación de hibridomas. Los criterios determinantes del inicio de la extracción de ascitis fueron la presencia de un abdomen prominente y la consecuente dificultad locomotriz manifestada por el animal. El líquido se obtuvo por punción de la región i.p. con aguja de 0,9 mm de diámetro, recolectándolo por goteo en un tubo cónico de 50 ml.
- 4- El líquido ascítico fue centrifugado a 1.500 rpm durante 10 min en una centrífuga Eppendorf 5403 y el sobrenadante conservado -20 °C.
- 5- En el fluido ascítico se determinó la concentración de inmunoglobulinas totales por técnica de ELISA *sandwich* (Anexo A.4) y el título de anticuerpos monoclonales anti-rhIFN- α 2b por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.2), identificándose además las variedades isotópicas de las cadenas pesadas de los mAbs por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.3).

10.2. Purificación de mAbs por cromatografía de afinidad a proteína A

La purificación de mAbs mediante cromatografía de afinidad a proteína A, previamente descrita por Ey y col. (1978), fue llevada a cabo empleando una matriz de *rProtein A Sepharose™ Fast Flow* (GE Healthcare). El protocolo general de purificación se describe a continuación:

- 1- ARMADO DE LA COLUMNA: Un volumen de 5 ml de matriz se empaquetó en un soporte plástico (*Econo-Pac Column*, Bio Rad; 1,5 x 2,8 cm).
- 2- EQUILIBRADO: se realizó con solución de Tris/HCl 1 M, NaCl 3 M, pH 9. Se emplearon 5 volúmenes de columna (VC) para esta etapa, verificándose que el pH a la salida de la columna sea igual al de la solución de equilibrado.
- 3- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: el líquido ascítico se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se ajustó a una concentración de NaCl 3 M, pH 9 mediante el agregado de NaCl sólido y solución de Tris-HCl 1 M, pH 9.

Posteriormente la muestra se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm .

- 4- SIEMBRA: Se sembró un volumen de muestra apropiado según la capacidad de la matriz cromatográfica y la concentración de inmunoglobulinas presentes en el fluido ascítico. Se respetó una relación de 2 mg de inmunoglobulina por cada ml de gel.
- 5- LAVADO: las proteínas no retenidas por la matriz se lavaron con solución de Tris/HCl 1 M, NaCl 3 M, pH 9 hasta demostrar la ausencia de proteínas por medida de la absorbancia a $\lambda = 280 \text{ nm}$.
- 6- ELUCIÓN: Las inmunoglobulinas retenidas fueron eluidas mediante descenso de pH. Para ello, se empleó una solución de ácido cítrico/NaOH 0,1 M, pH 3. Se recogieron alícuotas de 1 ml y se neutralizaron inmediatamente agregando 300 μl de solución de Tris/HCl 1 M, pH 9. Las fracciones correspondientes al pico de elución de inmunoglobulinas, monitoreado a $\lambda = 280 \text{ nm}$, fueron mezcladas y el producto obtenido fue dializado contra PBS toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$.

El flujo establecido durante las distintas etapas del proceso cromatográfico fue de 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,28 $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$). Luego de efectuada la diálisis, la concentración de mAbs fue determinada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280 \text{ nm}$. Se asumió que una unidad de absorbancia de una solución de inmunoglobulinas murinas equivale a una concentración de 0,8 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de anticuerpo puro (Harlow y Lane, 1988).

La pureza de los anticuerpos se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con posterior coloración con azul de coomasie (sección 12.1.).

11. Caracterización inmunoquímica del panel de mAbs anti-rhIFN- α 2b

11.1. Determinación de la constante de afinidad de los mAbs

Para la determinación de la constante de disociación del complejo mAb-antígeno se seleccionó el procedimiento desarrollado por Friguet y col. (1985). El mismo se basa en un

ensayo inmunoenzimático en fase sólida que permite su medición una vez que el complejo alcanza el equilibrio.

El método consiste en realizar inicialmente incubaciones en fase líquida de cantidades decrecientes de antígeno con un dado anticuerpo en una concentración constante hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente, la concentración de anticuerpo libre remanente en solución se determina por técnica de ELISA específico indirecto. La aplicación de este método implica asumir que la constante de disociación varía solamente con la composición del antígeno competidor soluble y, consecuentemente, no es afectada por los cambios estructurales que el antígeno pueda demostrar durante su insolubilización en una fase sólida ni por las variaciones en la densidad alcanzada por el mismo durante su distribución en dicha fase, tal como describiera Seligman (1994), al estudiar la influencia de adsorción antigénica en fase sólida sobre el cálculo de la constante de disociación.

Teniendo en cuenta el equilibrio:



puede definirse la constante de disociación de la siguiente manera,

$$K_D = \frac{C_{Ag} \cdot C_{Ac}}{C_{AgAc}} \quad (5)$$

Esta ecuación permite calcular la constante de disociación (K_D) de dicha interacción conociendo las concentraciones del complejo antígeno-anticuerpo (C_{AgAc}), del antígeno libre (C_{Ag}) y del anticuerpo libre (C_{Ac}) luego de establecerse el equilibrio de reacción. El modelo básico considera que tanto el antígeno como el anticuerpo son especies químicas homogéneas y univalentes.

Para los componentes en equilibrio es posible definir la siguiente nomenclatura: $C_{AgAc} = x$, $C_{Ag} = a$ y $C_{Ac} = i$. Considerando la concentración total de anticuerpos empleados en el ensayo (i_0), la concentración de anticuerpo libre en equilibrio resulta: $C_{Ac} = i_0 - x$.

Reemplazando en la ecuación (5), se obtiene:

$$\frac{1}{K_D} = \frac{x}{a \cdot (i_0 - x)} \quad (6)$$

Reordenando los términos se obtiene la expresión de Scatchard (Scatchard, 1949) para el cálculo de la constante de afinidad:

$$\frac{x}{a} = \frac{1}{K_D} (i_0 - x) \quad (7)$$

Una vez que las mezclas antígeno-anticuerpo han alcanzado el equilibrio, se monitorea la concentración de anticuerpo libre mediante técnica de ELISA específico indirecto. Para ello cada mezcla antígeno-anticuerpo se incuba en presencia del antígeno inmovilizado en fase sólida. De esta manera, si la concentración total de anticuerpo (i_0) se incuba con concentraciones crecientes del antígeno (a_0) soluble, la concentración de anticuerpo libre (i) se relacionará con la absorbancia (A), medida por ELISA específico indirecto, de la siguiente manera:

$$\frac{i}{i_0} = \frac{A}{A_0} \quad (8)$$

Donde A representa la absorbancia en presencia de antígeno soluble y A_0 la absorbancia medida para el anticuerpo en ausencia de antígeno soluble. Esto será real si no ocurren reajustes del equilibrio alcanzado en fase líquida durante la incubación de las mezclas con el antígeno adsorbido en fase sólida. Friguet y col. (1985) demostraron que el mencionado reajuste es despreciable frente a las condiciones experimentales seleccionadas.

Dado que $x = i_0 - i$, despejando el término i y reemplazándolo en la expresión anterior resulta:

$$x = i_0 \frac{A_0 - A}{A_0}$$

(9)

Por otro lado, la fracción de anticuerpo unido al antígeno expresada como la denominada función de unión (v), puede definirse como la disminución relativa de la absorbancia en presencia del antígeno de la siguiente manera:

$$v = \frac{x}{i_0} = \frac{A_0 - A}{A_0} \quad (10)$$

Así, se obtiene que:

$$x = i_0 \cdot v \quad (11)$$

Reemplazando la ecuación (11) en la ecuación (7) se obtiene:

$$\frac{v}{a} = \frac{1}{K_D} - \frac{1}{K_D} \cdot v \quad (12)$$

Para calcular los parámetros función de unión (v) y concentración de antígeno soluble libre en equilibrio (a) se dispuso de los valores experimentales de absorbancia en presencia y ausencia del antígeno soluble (A y A_0 , respectivamente) y de los datos iniciales de concentración de antígeno total empleado en cada incubación (a_0) y la concentración total y constante de anticuerpo (i_0):

$$v = \frac{A_0 - A}{A_0} \quad (13)$$

$$a = a_0 - x = a_0 - i_0 \cdot \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \quad (14)$$

Stevens en 1987 observó que el cálculo de la constante de disociación del complejo mAb-antígeno demostraba una subestimación con respecto a la calculada a partir del correspondiente fragmento Fab. Dicha diferencia fue asignada a la determinación de la función de unión por la técnica de ELISA específico indirecto. Esta técnica cuantifica el anticuerpo libre sobre la base de su habilidad de interactuar con el antígeno adsorbido en fase sólida, no distinguiendo entre inmunoglobulinas libres o unidas en forma univalente. Por lo tanto, la diferencia ($A_0 - A$) mide solamente el anticuerpo doblemente unido con el ligando (propiedad bivalente del anticuerpo), no teniendo en cuenta las moléculas de anticuerpo que lo hicieron en forma univalente. De esta manera, el cálculo de la fracción de sitios ocupados por el antígeno sufre una subestimación.

Dicho autor demostró que utilizando un análisis de distribución probabilística binomial, por el cual la función de unión puede calcularse de la manera indicada en la ecuación (15), es posible determinar la constante de disociación de un anticuerpo bivalente con una gran aproximación a la obtenida por métodos convencionales.

$$f = \sqrt{v} = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A_0}} \quad (15)$$

Por lo tanto, introduciendo la ecuación (15) en la ecuación (11), la ecuación (12) puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{f}{a} = \frac{1}{K_D} - \frac{1}{K_D} \cdot f \quad (16)$$

Representando gráficamente f/a en función de f (representación de Scatchard) de acuerdo con la ecuación (16), es posible determinar la constante de disociación de los mAbs a partir de la pendiente (o de la ordenada al origen) de la recta de regresión lineal obtenida mediante la representación de los datos experimentales. A continuación se enuncia el diseño experimental desarrollado para la determinación de la K_A .

En microtubos de 1,5 ml de capacidad se agregaron 175 μl de solución de rhIFN- α 2b en concentraciones decrecientes desde 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ hasta 78 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$. Posteriormente, se adicionaron 175 μl de una solución conteniendo un dado mAb en una concentración constante. Las concentraciones de los anticuerpos a utilizar en el ensayo fueron deducidas teniendo en cuenta el título de cada anticuerpo medido por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.2). Se seleccionó la concentración de mAb necesaria para generar una respuesta equivalente al 50% de la máxima absorbancia obtenida en condiciones de saturación de anticuerpo. Las diluciones se realizaron en solución de PBS, BSA 0,1% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v). Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Las mezclas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente.

Finalmente, el contenido de los tubos se transfirió a pozos de placas de microtitulación previamente sensibilizados con rhIFN- α 2b, realizándose un ensayo de ELISA específico indirecto siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- 1- Sensibilización: Placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100 μl de rhIFN- α 2b 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (50 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μl de solución de bloqueo (Anexo A.1). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Se transfirieron 100 μl de cada mezcla de incubación a los pozos correspondientes de las placas de microtitulación.

Para cada anticuerpo se evaluó el 100% de unión al antígeno inmovilizado en fase sólida en ausencia de antígeno soluble (A_0). Para ello, se incubaron previamente en fase líquida 175 μl de cada mAb con 175 μl de solución diluyente en las mismas condiciones indicadas con anterioridad. Posteriormente, 100 μl de la mezcla fueron transferidos a los correspondientes sitios de las placas de microtitulación.

De la misma manera, se realizaron controles negativos por triplicado incubando 200 μ l de solución diluyente en los pozos correspondientes.

Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C.

4- Segunda incubación: Se adicionaron 100 μ l de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) en una dilución 1:1.000 en solución diluyente. La incubación se efectuó durante 1 h 37 °C.

5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en el Anexo A.1.

11.2. Mapeo de los epitopes del rhIFN- α 2b reconocidos por cada mAb

Con el objetivo de caracterizar el panel de mAbs desde el punto de vista de los epitopes reconocidos por cada anticuerpo, se desarrollaron ensayos de interacción competitiva entre pares de mAbs en presencia de rhIFN- α 2b. De acuerdo con la capacidad competitiva de los mAbs analizados frente a la citoquina, se determinaron los grupos de epitopes de la molécula de rhIFN- α 2b que fueron mapeados por el conjunto de anticuerpos constituyentes del panel.

Para visualizar tal proceso fue indispensable disponer de uno de los reactivos (anticuerpos o citoquina) marcados con biotina. Dado que la marcación de la citoquina afectó su interacción con diferentes anticuerpos, se seleccionaron los mAbs biotinilados como moléculas reporteras. De esta manera, el ensayo se basó en el análisis de la capacidad de un mAb no biotinilado presente en fase soluble para inhibir la interacción de un segundo mAb biotinilado con la citoquina adsorbida en fase sólida.

11.2.1. Conjugación de los mAbs con biotina

La metodología desarrollada para la preparación de conjugados con biotina fue puesta a punto en el laboratorio siguiendo esencialmente las pautas establecidas por Bayer y col. en 1979:

- 1- Se preparó una solución de $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de biotina activada bajo la forma de *Biotinyl N-hydroxysuccinimide ester* (Sigma) en DMSO (Sigma).
- 2- Los mAbs se dializaron con solución de borato de sodio 0,1 M, pH 8,8. La concentración de anticuerpos en el material de diálisis fue determinada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280 \text{ nm}$. Se trabajó con soluciones proteicas de $1\text{-}3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cuando la solución de mAbs no alcanzó la concentración mínima establecida, se procedió a su concentración mediante ultrafiltración empleando los dispositivos *Ultrafree™ Amicon* (Millipore, EE.UU.) con membranas de 20 kDa de límite de exclusión de proteínas.
- 3- Posteriormente, se adicionó el volumen necesario de solución de éster de biotina a la solución de mAb, de manera de establecer una relación de $100 \mu\text{g}$ de biotina por cada mg de anticuerpo. Se incubó durante 4 h con agitación a temperatura ambiente.
- 4- Luego de la etapa de conjugación con biotina propiamente dicha, se inhibió la reacción agregando solución de NH_4Cl 1 M ($20 \mu\text{l}$ de NH_4Cl 1 M por cada $250 \mu\text{g}$ de biotina agregada). Se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. La reacción de inhibición se basó en la neutralización de la biotina remanente con iones amonio.
- 5- Para eliminar la biotina neutralizada se procedió a dializar la muestra con PBS durante 36 h.
- 6- Luego de la diálisis se centrifugó el material biotilado en microcentrífuga (Sanyo BS 4402, Gran Bretaña) a 13.000 rpm durante 5 min para eliminar el material precipitado durante esta etapa. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se diluyó con igual volumen de glicerol (Merck, Alemania) al 87% (v/v). Los mAbs biotilados se conservaron en glicerol al 43,5% (v/v) a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 7- La eficiencia de conjugación se determinó mediante titulación de los mAbs biotilados empleando técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.5).

11.2.2. Mapeo de los epitopes del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA de competición

- 1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fue sensibilizada con 100 μ l de rhIFN- α 2b en una concentración de 0,5 μ g. ml^{-1} (50 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μ l de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Se agregaron 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 del anticuerpo competidor (mAb no biotinilado), desde una concentración de 100 μ g. ml^{-1} hasta 0,78 μ g. ml^{-1} en presencia de 100 μ l de mAb biotinilado en una concentración constante de 0,5 μ g. ml^{-1} . Las diluciones se realizaron en solución diluyente. Se incubó durante 2 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: Se agregaron 100 μ l de Streptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (DAKO) diluida 1/2.000 con solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en Anexo A.1.
- 6- Controles: Se ensayaron dos clases de controles:
 - I. Sin mAb biotinilado ni mAb competidor para evaluar el posible reconocimiento inespecífico del conjugado sobre el rhIFN- α 2b.
 - II. En ausencia de mAb competidor: para evaluar la máxima capacidad de interacción del mAb biotinilado con la citoquina inmovilizada en fase sólida. Para realizar este control, en la etapa 3 se adicionaron 100 μ l de solución diluyente en lugar del correspondiente mAb competidor.

12. Detección y cuantificación del rhIFN- α 2b

La disponibilidad de un panel de mAbs permite la selección de aquellos más adecuados para el desarrollo de métodos destinados a la evaluación cualitativa y cuantitativa del antígeno correspondiente. A continuación, se enuncian los procedimientos diseñados en nuestro laboratorio para el cumplimiento de tal objetivo.

12.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y *Western-Blot*

La electroforesis en geles de poliacrilamida se desarrolló de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando para el armado de los geles el sistema de Electroforesis Modular Vertical *Mini-Protean II Cell* (Bio-Rad, EE.UU.). Las muestras, conteniendo 1 μ g de rhIFN- α 2b, fueron diluidas en solución de Tris/HCl 0,05 M, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), β -ME 5% (v/v), pH 6,8 en proporciones 3:1. Las mismas fueron incubadas a 100 $^{\circ}$ C durante 3 min y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento, cuya concentración de monómero/ramificante (acrilamida/bisacrilamida) fue del 5% (p/v). El gel de separación fue polimerizado con una concentración acrilamida/bisacrilamida del 15% (p/v). La corrida se realizó a voltaje constante de 200 V en baño de hielo, hasta que el marcador del frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel. Se empleó la fuente de poder modelo 3000 X_i de Bio-Rad.

Luego de la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (MSI-OSMONICS, EE.UU.) empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se empleó un protocolo estándar de transferencia de proteínas utilizando Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH 8,3 como solución de transferencia. La transferencia se realizó durante 1 h a 180 mA, refrigerando el dispositivo en todo momento. Una vez finalizada la misma, el éxito de la transferencia se evaluó detectando la presencia de proteínas transferidas con solución de Rojo *Ponceau* (Sigma) al 0,25% (p/v) en ácido acético glacial 15% (v/v), metanol 40% (v/v).

Posteriormente, sobre el papel de nitrocelulosa (lavado con solución salina de Tris, TBS: Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) se efectuó la siguiente reacción inmunoquímica para evaluar el reconocimiento del rhIFN- α 2b por parte de los mAbs:

- 1- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con solución de TBS, BSA 1% (p/v).
- 2- Primera incubación: Las membranas se incubaron con diluciones de fluidos ascíticos conteniendo diferentes mAbs. Las mismas se realizaron en solución de TBS, BSA 0,1% (p/v).
- 3- Segunda incubación: Las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) diluidos 1:1.000 en solución de TBS, BSA 0,1% (p/v).
- 4- Reacción reveladora: Se empleó como sustrato agua oxigenada 0,12 volúmenes diluida en TBS con el agregado de α -cloronaftol (Sigma) $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ disuelto en metanol al 20% (v/v). La incubación se realizó a temperatura ambiente hasta detectar la aparición de color. La reacción reveladora fue detenida por lavados sucesivos con agua destilada.

Todas las incubaciones fueron realizadas con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de cada etapa se realizaron lavados que consistieron en sumergir las membranas en solución de TBS durante 5 min con agitación.

12.2. Detección del rhIFN- α 2b mediante técnica de *Dot-Blot*

Se evaluó la capacidad de cada mAb para reconocer la molécula del rhIFN- α 2b empleando un ensayo de *Dot-Blot* en el cual la citoquina es inmovilizada sobre membrana de nitrocelulosa.

- 1- Se prepararon sucesivas diluciones 1:2 de rhIFN- α 2b desde 8.000 ng.ml^{-1} hasta $7,8 \text{ ng.ml}^{-1}$. La solución patrón de rhIFN- α 2b se diluyó, alternativamente, en TBS o en medio de cultivo (MC) de células de mamífero (mezcla de D-MEM/Ham's F12; Gibco) suplementado con SFB al 0,1% (v/v).

- 2- Empleando membranas de nitrocelulosa (MSI-OSMONICS) se sembraron 40 μ l de cada dilución de rhIFN- α 2b. Se incluyeron, además, controles negativos sembrando solamente los medios diluyentes. Se sembraron once grupos de diluciones de manera de evaluar cada uno de los mAbs del panel.
- 3- Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con solución de TBS, BSA 1% (p/v).
- 4- Luego de tres lavados sucesivos con solución de TBS, la membrana fue cortada en tiras conteniendo cada grupo de diluciones del rhIFN- α 2b. Cada tira se incubó con una solución del correspondiente mAb en una concentración de 10 μ g.ml⁻¹ preparado en TBS, BSA 0,1% (p/v).
- 5- Las tiras se lavaron con solución de TBS e incubaron con una solución de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) diluidos 1:1.000 con TBS, BSA 0,1% (p/v).
- 6- Todas las incubaciones se llevaron a cabo con agitación durante una hora a temperatura ambiente. Luego de los lavados correspondientes, se procedió al revelado del *Dot-Blot* repitiendo el procedimiento indicado para el *Western-Blot*.

12.3. Cuantificación del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich* heterogéneo

Este ensayo se basó en la captura del rhIFN- α 2b por parte de un dado mAb anti-rhIFN- α 2b purificado a partir de ascitis murina e inmovilizado sobre placas de poliestireno. Posteriormente, la citoquina fue reconocida por inmunoglobulinas de conejo anti-rhIFN- α 2b obtenidas en nuestro laboratorio. Finalmente, el éxito de sistema sándwich heterogéneo fue evidenciado mediante el empleo de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa.

En la puesta a punto del ensayo para la evaluación de la capacidad de cada mAb para ser empleado como anticuerpo de captura del antígeno se siguió el siguiente protocolo:

- 1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fue sensibilizada con 100 μ l de una solución del correspondiente mAb en una concentración de 1 μ g/ml (100 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 μ l de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 3- Reacción de captura: Se adicionaron 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 de rhIFN- α 2b realizadas en solución diluyente, desde 50 ng.ml⁻¹ hasta 0,098 ng.ml⁻¹. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 4- Segunda incubación: Se agregaron 100 μ l de suero de conejo anti-rhIFN- α 2b en una dilución 1:1.000 preparada en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 5- Reacción de identificación: Se adicionaron 100 μ l de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) en una dilución 1:1.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 6- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en Anexo A.1.
- 7- Controles: Se ensayaron tres tipos de controles:
- I. Sin mAb de captura, para evaluar el posible reconocimiento inespecífico entre el rhIFN- α 2b y la proteína de bloqueo.
 - II. Sin rhIFN- α 2b y sin suero de conejo, para evaluar el posible reconocimiento inespecífico entre el anticuerpo conjugado y los mAbs.
 - III. Sin suero de conejo, para evaluar el posible reconocimiento inespecífico entre el anticuerpo conjugado y el rhIFN- α 2b.

13. Evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* del rhIFN- α 2b por acción del panel de mAbs

13.1. Valoración de la actividad biológica anti-viral *in vitro* del rhIFN- α 2b

En una primera instancia se puso a punto el ensayo de valoración de la actividad biológica anti-viral *in vitro* del rhIFN- α 2b. El mismo se basa en la acción protectora que presentan los IFNs sobre células susceptibles a la acción citopática producida por una infección viral. Para ello, se empleó la línea celular MDBK, susceptible a la infección por el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) cepa Indiana. El efecto citopático se evaluó determinando la presencia de células viables mediante tinción con el colorante cristal violeta. La incorporación de cristal violeta por parte de las células viables es proporcional a la concentración de IFN. El colorante es luego disuelto con ácido acético y el color resultante es directamente proporcional al número de células viables y, por lo tanto, a la concentración de IFN empleada en el ensayo. De esta manera, este procedimiento resulta útil para evaluar la potencia biológica del rhIFN- α 2b o, indirectamente, analizar la capacidad de los mAbs para inhibir su actividad biológica anti-viral.

Con el propósito de determinar la especificidad de los mAbs del panel en cuanto a su capacidad neutralizante, se analizó la habilidad de los mismos para inhibir la actividad biológica anti-viral *in vitro* del IFN- β . En este caso se utilizó la línea celular WISH susceptible a la infección por el virus VSV. Para ello, los ensayos de actividad anti-viral y de neutralización de dicha actividad se llevaron a cabo empleando ambas citoquinas.

Las condiciones óptimas del ensayo para evaluar la actividad biológica *in vitro* de los IFNs (IFN- α 2b e IFN- β) fueron puestas a punto en el laboratorio siguiendo básicamente las pautas establecidas por Familletti y col. (1981):

- 1- Las líneas celulares MDBK (para IFN- α) o WISH (para IFN- β) fueron cultivadas en medio de crecimiento. Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron de manera de obtener una densidad celular de $2,5 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. Se sembraron 100 μ l de esta suspensión celular en cada cavidad de una placa de cultivo estéril de 96 pozos ($2,5 \cdot 10^4$ células por pozo) y se incubó durante 24 h.

- 2- Se eliminó el sobrenadante por inversión de la placa, se colocaron 100 μl por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b o de rhIFN- β desde 20 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 0,156 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ y desde 48 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 0,375 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, en medio de ensayo y se incubó durante 6 h.
- 3- Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó nuevamente el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 100 μl de medio de ensayo. Finalmente, se colocaron 100 μl de una dilución apropiada del virus VSV en medio de ensayo en cada cavidad, incubándose durante 24 h. Se trabajó con aquella dilución viral adecuada para desarrollar al cabo de 24 h, aproximadamente, una acción citopática del 100 % evaluada mediante titulación previa del virus utilizando ambas líneas celulares en ausencia de IFNs.
- 4- Al día siguiente, al observar una acción citopática aproximada del 100 % en aquellas cavidades controles en ausencia de IFN, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión de las placas y se realizó el revelado adicionando en cada cavidad 50 μl de solución de cristal violeta 0,75% (p/v) disuelto en metanol 40% (v/v). Las placas se incubaron a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, se eliminó el colorante y las placas fueron lavadas con agua destilada hasta verificar la ausencia del colorante en los lavados. Para disolver el colorante fijado se adicionaron 250 μl de solución de ácido acético al 20% (v/v). Las placas fueron agitadas hasta observar una coloración uniforme en cada cavidad y finalmente se determinó la absorbancia del colorante por mediciones espectrofotométricas a $\lambda = 540 \text{ nm}$ en un lector de placas de microtitulación.
- 5- Se realizaron los siguientes controles:
 - a- Control de 100% de efecto citopático viral (en ausencia de IFN). Para ello, se adicionaron 100 μl de medio de ensayo en lugar de las correspondientes diluciones de IFNs.
 - b- Control de máxima proliferación celular en ausencia de infección viral (ausencia de IFN y de virus). Para ello, se reemplazaron los 100 μl de soluciones de los distintos IFNs y los 50 μl de suspensión viral por 150 μl de medio de ensayo.

13.2. Neutralización de la actividad biológica anti-viral *in vitro* del rhIFN- α 2b y del rhIFN- β en presencia de los mAbs

Una vez seleccionada la concentración adecuada de ambas variedades de IFN, se empleó el siguiente protocolo para evaluar la capacidad neutralizante de cada mAb:

- 1- Las células MDBK o WISH se sembraron a razón de $2,5 \cdot 10^4$ células por pozo (100 μ l de suspensión celular) en placas de cultivo estéril de 96 pozos, incubándose durante 24 h.
- 2- Al día siguiente, en placas de fondo plano de 96 pozos se adicionaron por triplicado, 75 μ l de diluciones sucesivas 1:5 de cada mAb realizadas en medio de crecimiento. Se trabajó en un rango de concentraciones decreciente comprendido entre 17 μ M y 1,1 pM. A cada pozo, conteniendo las distintas diluciones de los mAbs, se adicionaron 75 μ l de una solución de cada variedad de rhIFN en una concentración de actividad de 2 UI. ml^{-1} en el caso de rhIFN- α 2b o de 1,5 UI. ml^{-1} para rhIFN- β . Las placas se incubaron durante 2 h, en estufa a 37 °C. Se incorporó, además, un mAb anti-Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos humano recombinante (rhGM-CSF) como control de un anticuerpo de especificidad irrelevante con respecto a IFN y, por lo tanto, carente de actividad neutralizante.
- 3- Finalizando el período de pre-incubación se transfirieron 100 μ l de mezcla preincubada mAb-IFN a las placas que contenían las células adheridas, previa eliminación del sobrenadante.
- 4- Transcurrido un tiempo de incubación de 6 h, se eliminó el sobrenadante de las placas y se adicionaron a cada pozo 100 μ l de una suspensión adecuada de VSV preparada en medio de crecimiento (aquella que desarrolla una acción citopática del 100% en aproximadamente 24 h). Las placas se incubaron nuevamente en estufa a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.
- 5- Al día siguiente se procedió al revelado del ensayo empleando la metodología descrita en 13.1.

- 6- Se realizaron cuatro clases de controles. En cada uno de ellos la ausencia de un componente fue reemplazada por el correspondiente volumen de medio de ensayo.
- a) Control de máxima protección de IFN (en ausencia de mAb).
 - b) Control de 100% de efecto citopático (en ausencia de IFN y mAb).
 - c) Control de 100% de efecto citopático (en presencia de mAb y ausencia de IFN).
 - d) Control de máxima proliferación celular (en ausencia IFN, mAb y virus).

14. Técnicas generales de biología molecular

14.1. Electroforesis en geles de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se llevaron a cabo empleando el sistema submarino (Ausubel y col., 1987). Para la preparación de los geles de concentración de agarosa variable entre 0,8% y 1,5% (p/v), se pesó la cantidad de agarosa adecuada y se disolvió por calentamiento en *buffer* TAE (Tris/Acetato 40 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH 8,0). La solución se enfrió a 60 °C y se adicionó bromuro de etidio en concentración de 0,5 µg.ml⁻¹. La solución se colocó en un soporte conteniendo un peine adecuado para formar los carriles de siembra y se dejó solidificar. Finalmente el gel fue transferido a una cuba para electroforesis horizontal de ADN de Bio-Rad.

Las muestras de ADN se mezclaron con el *buffer* de siembra 6X [Ficoll 400 10% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol FF 0,25% (p/v), *orange* G 0,4% (p/v), Tris/HCl 10 mM, EDTA 50 mM, pH 7,5] y se sembraron en cada una de las calles del gel. Se aplicó un voltaje entre 80 y 100 V hasta observar una adecuada migración de los colorantes constituyentes del *buffer* de siembra. Finalmente, el gel fue examinado utilizando un transiluminador UV (UVP, EE.UU.) y fotografiado. El fundamento de la detección de los fragmentos de ADN mediante luz UV se basa en que el bromuro de etidio presenta una estructura planar que le permite intercalarse entre las bases de las moléculas de ácidos nucleicos, interaccionar con ellas y originar un incremento en la fluorescencia comparado con el colorante libre. La radiación UV es absorbida y la energía es emitida en la región del espectro visible correspondiente a 590 nm (rojo-anaranjado).

La estimación de la longitud de los fragmentos de ADN separados durante la electroforesis se realizó mediante comparación con marcadores de masa molecular (Cien Marker, Biodynamics, EE.UU.)

14.2. Digestiones enzimáticas

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron respetando los medios y condiciones recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos (excepto para las enzimas *Sfi* I y *Not* I que se describen con mayor detalle en la sección 16.4) la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada µg de ADN en un volumen final de 20 µl.

Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación utilizando el sistema comercial *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

14.3 Ligaciones de ADN

En las reacciones de ligación se utilizó una relación molar inserto:plásmido de 3:1 en un volumen de reacción de 20 µl, en presencia de la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla se incubó toda la noche a 24 °C.

14.4. Preparación de bacterias competentes

La mayoría de los métodos para transformar bacterias están basados en las observaciones de Mandel e Higa (1970), los cuales demostraron que las bacterias tratadas con soluciones de CaCl₂ frías y seguidamente expuestas a un breve *shock* con calor se transformaban con el ADN del bacteriófago λ. El mismo método fue subsecuentemente empleado para transformar bacterias con ADN plasmídico (Cohen y col., 1972). Aparentemente, el tratamiento induce un estado transitorio de competencia de las bacterias receptoras durante el cual son capaces de incorporar ADN de diferentes orígenes.

Para la preparación de las bacterias *E. coli* DH5 α F'lq competentes se realizó una estría sobre una placa de LB-agar a partir de un *stock* celular conservado a -70 °C. Se cultivó durante toda la noche a 37 °C. Se seleccionó al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 3 ml de medio LB, incubando toda la noche a 37 °C en agitación a 200 rpm. Luego se repicó el cultivo en una dilución 1/100 en 50 ml de medio LB y se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una DO ($\lambda = 600$ nm) de aproximadamente 0,4 - 0,5. Posteriormente, se incubó durante 5 min en baño de hielo y se centrifugó a 2.500 g durante 5 min a 4 °C en una centrífuga *Eppendorf 5403*. Se eliminó el sobrenadante y se dejó escurrir el tubo en posición invertida. Las bacterias se resuspendieron en 20 ml de solución de transformación I fría [KAc 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15% (v/v), pH 5,8; esterilizada con filtro de 0,2 μ m] incubando durante 10 min en baño de hielo. Luego se centrifugó a 1.500 g durante 1 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, resuspendiendo las bacterias en 2 ml de solución de transformación II [MOPS 10 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15% (v/v), pH 6,5; esterilizada con filtro de 0,2 μ m] e incubándose durante 15 min. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 100 μ l en criotubos fríos y conservada a -70 °C hasta su utilización.

La cepa de *E. coli* TG-1 se procesó según el protocolo desarrollado por Chung y col. (1989). Se realizó una estría en placa de MMC a partir de *stock* celular conservado a -70 °C. Luego de cultivar toda la noche a 37 °C, se transfirió una colonia a 5 ml de medio 2xYT y se incubó nuevamente a igual temperatura en agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se repicó el cultivo a razón de 1 ml del mismo en 100 ml de medio 2xYT y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO ($\lambda = 600$ nm) comprendida entre 0,4 – 0,5. Las células se sedimentaron a 2.500 g durante 15 min a 4°C y se resuspendieron en 10 ml de *buffer* TSS frío [triptona 10 g.l⁻¹, extracto de levadura 5 g.l⁻¹, NaCl 5 g.l⁻¹, PEG 3350 10% (p/v), DMSO 5% (v/v) y MgCl₂ 50 mM, pH 6,5; esterilizado con filtro de 0,2 μ m]. La suspensión celular conservada en frío se utilizó dentro de las 2 h de adquisición de su competencia.

14.5. Transformación bacteriana

La transformación de bacterias *E. coli* DH5 α F'lq se llevó a cabo descongelando 100 μ l de células competentes, adicionándoles 10 μ l del producto de ligación, e incubando durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 1 min en

baño a 42 °C y, por último, durante 2 min en baño de hielo. Se adicionó 900 µl de medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las células se cosecharon mediante centrifugación (centrífuga Eppendorf Minispin® Plus, Alemania) a 5.000 rpm durante 5 min, se descartaron 850 µl de sobrenadante y el paquete celular se distribuyó uniformemente en placas conteniendo LB-agar con el antibiótico correspondiente, de modo tal de seleccionar las bacterias transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

En el caso de la cepa TG-1 se siguió esencialmente el mismo protocolo partiendo de las suspensión celular en *buffer* TSS y utilizando medio 2xYT y placas conteniendo SOB-agar suplementado con glucosa 2% (p/v) y ampicilina 100 µg.ml⁻¹

14.6. Extracción plasmídica

Para analizar la presencia de los genes de interés en las colonias de bacterias transformadas, se realizaron extracciones plasmídicas en pequeña escala. Para ello, se inoculó el clon bacteriano a analizar en 10 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, incubando toda la noche a 37 °C en agitación a 200 rpm. Se fraccionó 1,5 ml del cultivo en tubos para microcentrífuga, centrifugando a 2.000 g durante 10 min. El *pellet* fue resuspendido en 100 µl de solución I (Tris 25 mM, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM, pH 8), e incubado 5 min a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 200 µl de solución II [NaOH 0,2 N y SDS 1% (v/v)], incubando 5 min en baño de hielo. Seguidamente, se agregaron 150 µl de solución III (K⁺ 3 M y Ac⁻ 5 M), incubando 10 min en baño de hielo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. A partir del sobrenadante obtenido, se realizó una primera extracción con la mezcla fenol:cloroformo 1:1 y luego con cloroformo, conservando siempre la fase acuosa. Luego de cada extracción se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 min. Por último, se precipitó el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol, incubando 10 min a -20 °C y centrifugando a 14.000 rpm durante 15 min. Se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v), resuspendiéndolo finalmente en 20 µl de H₂O esterilizada 121 °C.

Con el fin de obtener preparaciones de los plásmidos a partir de bacterias transformadas con la calidad necesaria para efectuar la secuenciación del ADN de interés, o para ser utilizados en transformaciones bacterianas posteriores, se realizaron extracciones plasmídicas, utilizando el *kit Wizard SV 96 Plasmid DNA Purification Kit* (Promega, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

En el primer caso, la integridad, la concentración y pureza de los plásmidos se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa. En el caso de preparaciones plasmídicas obtenidas para su secuenciación o transformaciones bacterianas posteriores, la concentración y pureza de los plásmidos se evaluó por medida de su absorbancia a $\lambda = 260 \text{ nm}$ y $\lambda = 280 \text{ nm}$ en espectrofotómetro UV-visible (Ultraspec 2000, GE Healthcare) según Sambrook y col. (1989).

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \text{DO } (\lambda = 260 \text{ nm}) \cdot 50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \cdot (\text{dilución})^{-1} \quad (17)$$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{\text{DO } (\lambda = 260 \text{ nm})}{\text{DO } (\lambda = 280 \text{ nm})} \quad (18)$$

El valor de pureza debe estar comprendido entre 1,8 y 2,0, indicando una solución de ADN libre de proteínas y reactivos utilizados en la extracción, entre otros.

15. Obtención de fragmentos scFv a partir de hibridomas productores de mAbs

15.1 Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN total a partir de hibridomas en cultivo utilizando el reactivo comercial TRIZOL[®] (Invitrogen). Este método se basa en la utilización de una solución que contiene fenol y guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol, respectivamente, a partir de la fase acuosa. Para ello, células de hibridomas cultivadas en medio D-MEM suplementado con SFB 10% (v/v) fueron cosechadas en fase de crecimiento exponencial (aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$). La suspensión celular fue centrifugada a 1.000 rpm durante 10 min y el *pellet* fue homogeneizado utilizando el reactivo TRIZOL en una relación de 1 ml cada 10^7 células. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar detritos celulares y ADN de alto peso molecular. El sobrenadante clarificado se incubó a 30 °C durante 10 min para permitir la disociación completa de las nucleoproteínas. Seguidamente, se adicionó 0,2 ml de cloroformo por ml de TRIZOL incubando durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. El ARN contenido en la fase acuosa se precipitó adicionando 0,5 ml de isopropanol, centrifugando a máxima velocidad durante

10 min a 4 °C. Se lavó el precipitado con etanol 75% (v/v) y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua libre de ARNasas .

La concentración de ARN en solución se estimó a partir de la medida de absorbancia a $\lambda = 260$ nm y calculada mediante la ecuación (19). Adicionalmente se midió la absorbancia a $\lambda = 280$ nm , longitud de máxima absorción de las proteínas, para determinar la pureza mediante la ecuación (18). Una relación superior a 2 corresponde a una preparación de ARN prácticamente libre de proteínas.

$$\text{Concentración ARN } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \text{DO } (\lambda = 260 \text{ nm}) \cdot 40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \cdot (\text{dilución})^{-1} \quad (19)$$

15.2. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturizantes

El ARN extraído se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes, en un gel de agarosa al 1% (p/v) preparado en una solución de formaldehído al 16% (v/v) y HEPES (Sambrook y col., 1989). Antes de la siembra, 10 µg de cada muestra de ARN se incubaron durante 5 min a 65 °C con una mezcla desnaturizante compuesta por formamida 65% (v/v), formaldehído 20% (v/v) y HEPES, en una relación volumétrica de 1:3 (solución de ARN:solución desnaturizante). Posteriormente se les adicionaron los volúmenes correspondientes de solución de siembra 6X y bromuro de etidio en una concentración final de 5 mg.ml⁻¹. La separación electroforética se llevó a cabo en solución de HEPES empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel.

15.3. Purificación de ARNm a partir de ARN total

La purificación del ARNm proveniente de los hibridomas se llevó a cabo utilizando el *kit* comercial QuickPrep[®] Micro mRNA (GE Healthcare). Se utilizó como material de partida ARN total puro, disuelto en agua siguiendo esencialmente el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, la muestra de ARN total se diluyó con dos volúmenes de *Elution Buffer* y se incubó durante 3 min con la matriz de Oligo(dT)-Celulosa. La matriz se lavó cinco veces con *High-Salt Buffer* y dos veces con *Low-Salt Buffer*. Se transfirió la suspensión a una columna *MicroSpin*, se centrifugó durante 5 min. 13.000 rpm y se realizaron tres lavados adicionales con *Low-Salt Buffer*. Finalmente, se efectuó la elución con 0,4 ml de *Elution*

Buffer precalentado a 65 °C. Con este procedimiento se logró obtener ARNm puro en concentraciones de alrededor de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ determinadas por espectrofotometría a $\lambda = 260 \text{ nm}$ [ecuación (19)]. Finalmente, el ARNm correspondiente a cada una de las muestras se precipitó con etanol 75% (v/v) y se resuspendió en 20 μl de agua esterilizada a 121 °C.

16. Clonado de los fragmentos scFv en el vector pCANTAB 5E

16.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc

Para el clonado de los fragmentos scFv a partir de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b se utilizó el *kit* comercial RPAS (*Recombinant Phage Display System*, GE Healthcare). En una primera etapa, se realizó la síntesis de la primera cadena del ADNc a partir de ARNm purificado utilizando como *primers* hexanucleótidos de secuencia al azar [pd(N)₆]. Para cada una de las muestras se realizó la siguiente reacción por duplicado, incubando durante 1 h a 37 °C:

ARNm	5 μl
H ₂ O _{dd} estéril	16 μl
<i>Primed first-strand mix</i>	11 μl
DTT 200 mM	1 μl
Volumen total	33 μl

Para todas las reacciones de PCR se empleó agua esterilizada a 121 °C, en los procesos consecutivos (H₂O_{dd})

El reactivo *Primed first-strand mix* contiene los primers pd(N)₆, la enzima transcriptasa murina reversa M-MuLV y los nucleótidos en el *buffer* adecuado.

16.2. Amplificación del ADNc: PCR primaria

Los genes de las cadenas pesada (V_H) y liviana (V_L) fueron amplificados en dos reacciones independientes a partir del ADNc obtenido en la primera etapa. Se utilizó para cada cadena una mezcla de oligonucleótidos degenerados diseñados por el fabricante del sistema RPAS para hibridar en los extremos de las regiones variables V_H (*heavy primer* 1 y

2) y V_L (*light primer mix*) de las inmunoglobulinas murinas, a partir de la información de sus secuencias registrada en bases de datos. Los extremos de tales regiones presentan mayor grado de homología entre las distintas inmunoglobulinas, permitiendo el empleo de un conjunto discreto de oligonucleótidos para amplificar las mencionadas cadenas. Las reacciones correspondientes se detallan a continuación:

Mezcla de reacción para amplificación de la cadena liviana:

Reacción de síntesis de ADNc	33 μ l
<i>Light primer mix</i>	2 μ l
H ₂ O _{dd} estéril	64 μ l
<hr/>	
Volumen total	99 μ l

Mezcla de reacción para amplificación de la cadena pesada:

Reacción de síntesis de ADNc	33 μ l
<i>Heavy primer 1</i>	2 μ l
<i>Heavy primer 2</i>	2 μ l
H ₂ O _{dd} estéril	62 μ l
<hr/>	
Volumen total	99 μ l

Luego de incubar a 95 °C durante 5 min, se agregó 1 μ l de *GoTaq® DNA polimerase* (Promega, EE.UU.) a cada tubo y se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (Biometra, Alemania) ejecutando 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94 °C, 2 min de hibridación a 55 °C y 2 min. para la extensión a 72 °C. Posteriormente, los fragmentos V_H y V_L amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa en comparación con patrones de masa molecular (Cien Marler), purificándose el producto de tamaño esperado utilizando el *kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

16.3. Ensamblado de las cadenas V_H y V_L : reacción de *fill-in* y PCR secundaria

Los fragmentos de ADN correspondientes a las cadenas pesada y liviana se ensamblaron para formar una cadena única mediante un ADN oligonucleótido *linker*. Este fragmento provisto en el sistema RPAS bajo la denominación *linker-primer mix* ha sido diseñado mediante una secuencia central que codifica para el péptido de 15 aminoácidos

(G₄S)₃ y en sus extremos secuencias degeneradas que hibridan con la región 3' de la cadena pesada y con la región 5' de la cadena liviana. Cuando esto sucede, los oligonucleótidos *linker* actúan como *primers* en una reacción de *fill-in* en presencia de la enzima *Taq* ADN polimerasa. De esta manera, la reacción de ensamblado produce una pequeña cantidad del gen correspondiente al fragmento scFv, donde la región V_H está unida a la región V_L vía una secuencia que codifica para el *linker* (G₄S)₃.

Luego de cuantificar los fragmentos de ADN correspondientes a las cadenas pesada y liviana, comparando la intensidad de las bandas obtenidas en un gel de agarosa con un marcador de concentración conocida (V_H *marker*, incluido en el *kit* RPAS), se llevó a cabo la reacción de ensamblado respetando el siguiente protocolo:

Producto V _H (50 ng)	X µl
Producto V _L (50 ng)	Y µl
<i>Linker-primer mix</i>	4 µl
<i>Buffer</i> de PCR 10X	5 µl
Mezcla de dNTP (20 mM c/u)	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	5 µl
<i>Taq</i> ADN polimerasa (2,5 – 5 U)	0,5 – 1,0 µl
H ₂ O _{dd}	csp 50 µl

Para la realización de esta reacción se ejecutó un programa que comprende 7 ciclos de 1 min a 94 °C y 4 min a 63 °C.

El fragmento de ADN correspondiente al scFv ensamblado se amplificó en una segunda PCR utilizando una colección de *primers* provistos por el sistema RPAS (*RS primers*) que introducen los sitios de restricción *Sfi* I y *Not* I en los extremos 3' y 5', necesarios para el posterior clonado en el vector pCANTAB 5E (GE Healthcare). Se utilizó un programa constituido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, agregando al volumen de la reacción anterior (50 µl) la siguiente mezcla de reactivos:

<i>Buffer</i> de PCR 10X	5 µl
Mezcla de dNTP (20 mM c/u)	1 µl
<i>RS primers</i>	4 µl
MgCl ₂ 25 mM	3 µl
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U)	1 µl
H ₂ O _{dd}	36 µl
Volumen total	50 µl

Con el objeto de purificar el fragmento scFv amplificado de los restantes componentes de la PCR, se utilizó una resina de *Sephacryl S-400 HR* (GE Healthcare) en columnas *MicroSpin* (GE Healthcare). El volumen total de la reacción (aproximadamente 100 µl) se transfirió a la resina previamente equilibrada con *buffer TE* (Tris 10 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH 8,0) y se centrifugó durante 2 min a 735 g. El ADN purificado de esta manera se cuantificó mediante geles de agarosa utilizando como patrón el marcador scFv (scFv *marker*, RPAS) de concentración conocida.

16.4. Digestión con las enzimas de restricción *Sfi I* y *Not I*

El ADN del fragmento scFv ensamblado fue digerido con las enzimas de restricción *Sfi I* y *Not I* (GE Healthcare) en forma secuencial. Para la digestión con la enzima *Sfi I* se incubó durante 4 h a 50 °C la siguiente mezcla de reacción:

Producto scFv (0,25 – 1 µg)	hasta 70 µl
Buffer 1 10X [#]	8,5 µl
<i>Sfi I</i> (50 U)	4 µl
H ₂ O _{dd}	csp 85 µl

[#] Tris-HCl 100 mM, NaCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM , DTT 10 mM, pH 8,0.

Para la restricción con la enzima *Not I* se adicionaron a la mezcla anterior los siguientes reactivos:

NaCl 3 M	3,6 µl
Buffer 2 10X [#]	1,5 µl
<i>Not I</i> (50 U)	2 µl
H ₂ O _{dd}	7,8 µl

[#] Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 10 mM, Triton X-100 0,34% (p/v), pH 8,0.

Luego de incubar durante 4 h a 37 °C se realizó una extracción con solventes para purificar el ADN digerido. A los 100 µl de la digestión se adicionó un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 min. La fase acuosa superior se procesó utilizando la resina *Sephacryl S-400 HR* y el fragmento scFv purificado se cuantificó mediante geles de agarosa como se detalló anteriormente.

16.5. Ligación de los fragmentos scFv con el vector pCANTAB 5E y transformación de células TG-1 competentes

El vector pCANTAB 5E, desarrollado por *Cambridge Antibody Engineering y Pharmacia* (Jackson y col., 1992), puede ser empleado en conjunto con diferentes cepas de *E. coli* para producir anticuerpos recombinantes fusionados en la cápside de fagos o bien anticuerpos recombinantes solubles

En la reacción de ligación se utilizó el vector pCANTAB 5E que se provee en forma lineal (GE Healthcare). Se incubó durante 1 h a 16 °C la siguiente mezcla de componentes:

Gen del fragmento scFv (150 ng)	X µl
Buffer OPA ⁺ 10X [#]	5 µl
pCANTAB 5 E (250 ng)	5 µl
ATP 10 mM	5 µl
T4 ADN ligasa (5 U)	1 µl
H ₂ O _{dd}	csp 50 µl

[#] Tris-acetato 100 mM, Acetato de Magnesio 100 mM, Acetato de Potasio 500 mM, pH 7,5

Se inactivó la enzima ligasa mediante *shock* térmico incubando la muestra a 70 °C durante 10 min e inmediatamente enfriándola 5 min en hielo.

El volumen total de la ligación fue utilizado para transformar 1 ml de células TG-1 competentes. Luego de la transformación, 900 µl de la suspensión celular se destinaron para el procedimiento de rescate de la biblioteca de fagos recombinantes. Los 100 µl restantes se diluyeron a 1 ml con medio LB, se incubó durante 1 h a 37°C y, finalmente, se plaquearon 100 µl de esta suspensión celular en placas LB-agar con el objeto de estimar la eficiencia de transformación y el tamaño de la biblioteca resultante.

17. Selección de fagos portadores de anticuerpos recombinantes que reconocen al rhIFN-α2b.

El objetivo de la técnica de *panning* (selección) es capturar selectivamente aquellos anticuerpos recombinantes presentados en la superficie de los fagos que reconocen el antígeno inmovilizado en un soporte sólido (o en solución). Previamente al desarrollo del *panning*, los fagos recombinantes son precipitados con PEG para concentrarlos y separarlos

de los anticuerpos solubles que pudieran competir en el reconocimiento del antígeno. Luego, los fagos recombinantes son incubados con el antígeno inmovilizado en fase sólida. Aquéllos que se unen al antígeno son retenidos, mientras que aquéllos que no reaccionan o lo hacen muy débilmente (es decir, con baja afinidad) son removidos a lo largo de una serie de lavados subsecuentes. Cuando se adicionan células de *E. coli* TG-1 en fase de crecimiento logarítmico, los fagos retenidos por el antígeno infectan las bacterias que entonces pueden ser utilizadas para un nuevo procedimiento de rescate y posterior ronda de *panning* o, eventualmente, ser plaqueadas para analizar la producción de fragmentos scFv a partir de colonias individuales.

17.1. Rescate de la biblioteca de fagos recombinantes

En este procedimiento, el fago *helper* M13KO7 es utilizado para el rescate del fagémido con el gen del anticuerpo scFv inserto, a partir de las células TG-1 transformadas. Este fago provee la información genética necesaria para empaquetar el fagémido pCANTAB 5E que codifica para el anticuerpo recombinante expresado en el extremo del fago maduro. Adicionalmente, el M13KO7 es portador del gen que codifica para la resistencia al antibiótico kanamicina, posibilitando la selección de aquellas células que son infectadas.

A la suspensión de células TG-1 transformadas en el paso anterior (900 µl) se agregaron 9,1 ml de medio 2xYT-G, incubando durante 1 h a 37 °C con agitación, para permitir la replicación del vector y la generación de la resistencia al antibiótico. Seguidamente, se adicionó ampicilina (concentración final de 100 µg/ml) y $4 \cdot 10^{10}$ ufp del fago *helper* M13KO7. Luego de incubar 1 h a 37°C con agitación, se centrifugó la suspensión celular a 1.000 g durante 10 min. Finalmente, las células sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de medio 2xYT-AK y se cultivaron ON a 37 °C con agitación vigorosa para la producción de los fagos recombinantes.

17.2. Precipitación y concentración de los fagos recombinantes

El cultivo de células TG-1 crecido ON en medio 2xYT-AK se centrifugó durante 20 min a 1.000 g. A los 10 ml de sobrenadante conteniendo los fagos recombinantes se

adicionaron 2 ml de solución de PEG/NaCl [PEG 8000 20% (p/v) y NaCl 2,5 M] realizándose luego una incubación en hielo durante 1 h. Seguidamente, se centrifugó la mezcla 20 min a 10.000 g y 4 °C en centrífuga Beckman con rotor JA-30.50. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de PBS. Cuando no se realizó inmediatamente el proceso de *panning*, la solución de fagos recombinantes se filtró por 0,45 µm y se conservó a 4 °C.

17.3. Titulación de los fagos recombinantes

Previo a la realización de cada ronda de *panning* se tituló la solución de fagos para determinar la concentración de entrada (*INPUT*). Para ello, se prepararon diluciones seriadas 1:10 de la biblioteca de fagos en medio 2xYT siguiendo el siguiente esquema:

	Medio	Factor de dilución
2 µl de la solución inicial	+ 198 µl	10 ²
10 µl de dilución 10 ⁻²	+ 90 µl	10 ³
10 µl de dilución 10 ⁻³	+ 90 µl	10 ⁴
10 µl de dilución 10 ⁻⁴	+ 90 µl	10 ⁵
10 µl de dilución 10 ⁻⁵	+ 90 µl	10 ⁶
20 µl de dilución 10 ⁻⁶	+ 180 µl	10 ⁷
20 µl de dilución 10 ⁻⁷	+ 180 µl	10 ⁸
20 µl de dilución 10 ⁻⁸	+ 180 µl	10 ⁹

A 100 µl de las diluciones 10⁻⁷, 10⁻⁸ y 10⁻⁹ se adicionaron 100 µl de células TG-1 en fase de crecimiento logarítmico y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se plaquearon 100 µl de cada muestra en placas SOBAG que se cultivaron ON a 37 °C. Finalmente, se contaron las colonias en las placas que contenía entre 30 y 300 colonias y se calculó el título según:

$$cfu / ml = \frac{\# colonias \cdot dil^{-1}}{0,5 \cdot 0,1 ml} \quad (20)$$

La preparación del cultivo de células TG-1 en fase de crecimiento logarítmico se realizó inoculando medio 2xYT a partir de una colonia bacteriana crecida en placas con medio MMC e incubando a 37 °C hasta alcanzar una DO ($\lambda = 600 \text{ nm}$) de 0,5. De esta forma las bacterias expresan el pili F' y son susceptibles a la infección por parte de los fagos filamentosos.

17.4. Panning de los fagos recombinantes empleando antígeno inmovilizado en fase sólida

Una placa de poliestireno de 8 pozos de fondo plano (Greiner, Alemania) fue sensibilizada con 100 μl de una solución de rhIFN- $\alpha 2\text{b}$ de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (1 μg por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 hora a 37 °C y toda la noche a 4 °C. Luego de realizar 3 lavados con PBS, los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con 200 μl de solución de bloqueo [leche descremada 2% (p/v) en PBS y azida de sodio 0,01% (p/v)] incubando durante 1 h a 37 °C. La solución de fagos recombinantes se diluyó 1/5 en solución de bloqueo con el agregado de Tritón X-100 en una concentración final de 0,1% (v/v), y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para disminuir las interacciones inespecíficas del tipo hidrofóbicas entre las proteínas constitutivas del fago y el antígeno. Se adicionaron 100 μl por pozo de esta solución diluida y se incubó durante 2 h a 37 °C. A continuación, se realizó una serie de 20 lavados utilizando PBS con el agregado de Tween 20 0,1% (v/v) seguidos de otros 20 lavados con PBS.

17.5. Infección de células de *E. coli* TG-1 con la biblioteca de fagos recombinantes seleccionados

Para recuperar los fagos seleccionados por su capacidad de interacción con el antígeno inmovilizado en la fase sólida, se adicionaron 100 μl por pozo de una suspensión de células TG-1 en fase de crecimiento logarítmico y se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas 1:10 (10^{-1} y 10^{-2}) y se sembraron en placas SOBAG con el objeto de calcular la cantidad de fagos retenidos tras el *panning* (OUTPUT), y para realizar el *screening* de los fagos recombinantes o de los fragmentos scFv solubles a partir de colonias individuales.

Cuando se realizaron nuevas rondas de *panning*, las células TG-1 infectadas en el paso anterior se inocularon en 2 ml de medio 2xYT-AG y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO ($\lambda = 600$ nm) de 0,5 (2,5 – 3 h). En ese momento, se adicionaron 1.10^{10} ufp del fago *helper* y se realizó una nueva incubación a 37 °C durante 1 h. Finalmente, las células se sedimentaron a 1.000 g durante 10 min y se resuspendieron en 10 ml de medio 2xYT-AK para la producción de fagos recombinantes enriquecidos. Se incubó ON a 37 °C con agitación.

17.6. Screening de fragmentos scFv solubles específicos anti-rhIFN- α 2b

La cepa de *E. coli* TG-1 posee un ARNt supresor que no reconoce el codón *amber stop* ubicado entre la secuencia del fragmento scFv y el gen 3 del fago, presentes en el vector pCANTAB 5E. Debido a que esta supresión tiene una eficiencia del orden del 20%, se produce una proporción de anticuerpos solubles paralelamente a los anticuerpos fusionados al fago. De esta manera, es posible efectuar producciones a pequeña escala y evaluar la expresión de fragmentos solubles directamente utilizando las células TG-1, sin la necesidad de infectar la cepa no supresora *E. coli* HB2151.

A partir de las placas SOBAG con las células TG-1 infectadas tras el proceso de *panning*, se transfirieron 96 colonias individuales a los respectivos tubos cónicos de 1,5 ml conteniendo 400 μ l de medio 2xYT-AG, constituyéndose lo que se denominó “Placa Maestra”. La Placa Maestra se incubó durante toda la noche a 30 °C con agitación vigorosa para amplificar los clones. Al día siguiente, se transfirieron 40 μ l de cada cultivo a una nueva serie de 96 tubos conteniendo 400 μ l de medio 2xYT-AG y se incubó durante 2 h a 30 °C. Seguidamente, se centrifugaron los tubos a 1.500 g durante 20 min, se descartaron los sobrenadantes de cultivo y se resuspendió cada *pellet* en 400 μ l de medio 2xYT-AI, incubándose toda la noche a 30 °C. Finalmente, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm y se utilizaron los sobrenadantes para determinar la presencia de anticuerpos recombinantes solubles por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.6)

18. Preparación de fagos recombinantes a partir de clones productores de fragmentos scFv específicos anti-IFN- α 2b

En este procedimiento se utilizan los clones de las células TG-1 que resultaron positivos en el *screening* de fragmentos scFv solubles con el objetivo de generar fagos

recombinantes e infectar células HB2151. De esta manera, es posible obtener clones que produzcan los anticuerpos recombinantes solubles en una cantidad suficiente para la posterior caracterización de los mismos. En las células HB2151 (cepa no supresora) la síntesis proteica se detiene al final del gen correspondiente al fragmento scFv, no generándose una proteína de fusión con la g3p. En este caso el fragmento resultante es transportado hacia el espacio periplásmico donde se acumula y libera al medio de cultivo

Desde la Placa Maestra (conservada a 4 °C) se transfirieron 40 µl de cultivo saturado de cada clon positivo a nuevos tubos conteniendo 400 µl de medio 2xYT-AG con el agregado de $2,5 \cdot 10^8$ ufp del fago *helper* M13KO7. Luego de incubar durante 2 h a 37 °C, los tubos se centrifugaron a 1.500 g durante 20 min. Posteriormente, las células sedimentadas se resuspendieron en 400 µl de medio 2xYT-AK y se cultivaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se centrifugaron los cultivos durante 20 min a 1.500 g y los sobrenadantes clarificados, conteniendo los fagos recombinantes específicos correspondientes a cada clon positivo original, se conservaron a 4 °C.

19. Infección de células de *E.coli* HB2151 y producción de anticuerpos recombinantes solubles

Se adicionaron 2 µl del sobrenadante conteniendo los fagos recombinantes de cada clon positivo a 400 µl de una suspensión de células HB2151 en fase de crecimiento exponencial. La infección se llevó a cabo incubando las células a 37 °C durante 30 min. Inmediatamente, se realizó una estría en placas con medio SOBAG-N para cada muestra y se incubaron toda la noche a 30 °C. La utilización de ácido nalidíxico permite seleccionar células HB2151 (resistentes a dicho antibiótico) evitando la contaminación con células TG-1 (sensibles al mismo) que podrían presentarse en el sobrenadante clarificado de fagos por arrastre o contaminación.

A partir de colonias individuales de células HB2151 infectadas, se realizaron cultivos en medio 2xYT-AG para verificar la producción de los fragmentos scFv solubles y determinar dónde se acumulan en mayor concentración (sobrenadante de cultivo, espacio periplásmico o citoplasma). La producción se llevó a cabo mediante el reemplazo del medio de crecimiento cuando el cultivo alcanzó una DO ($\lambda = 600$ nm) de 0,5 por medio de inducción (2xYT-AI), e incubando 4 h o toda la noche a 30 °C con agitación. Posteriormente, los

cultivos se separaron en dos partes que se centrifugaron a 1.500 g durante 20 min. Los sobrenadantes se conservaron a -20 °C y los *pellets* se utilizaron para preparar extractos periplásmicos y extractos de células totales.

La obtención de los extractos periplásmicos se realizó mediante un *shock* osmótico suave. Para ello, el *pellet* celular se resuspendió en solución TES (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,5 mM, sacarosa 0,5 M, pH 8) e inmediatamente se adicionó 1,5 volúmenes de solución TES diluida 1/5. Luego de incubar 30 min en hielo se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min. El sobrenadante (extracto periplásmico) se conservó a -20 °C. Para la preparación de los extractos de células totales se resuspendió el *pellet* celular en PBS y se hirvió durante 5 min. Se sedimentaron los detritos celulares como se indicó anteriormente y se conservó el sobrenadante a -20 °C.

Los extractos periplásmicos y totales y los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante técnicas de SDS-PAGE y *Western-blot* realizadas tal como se describe en las secciones 12.1 y 12.2. Finalizado el procedimiento de transferencia se realizó sobre el papel de nitrocelulosa la siguiente reacción inmunológica:

- 1- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con solución leche descremada 2 % (p/v) en TBS.
- 2- Primera incubación: La membrana se incubó con el mAb anti-*E tag* conjugado con la enzima peroxidasa (GE Healthcare) diluido 1:2.000 en solución de bloqueo.
- 3- Reacción reveladora: Se empleó como sustrato agua oxigenada 0,12 volúmenes diluida en TBS con el agregado de α -cloronaftol (Sigma) 0,5 mg/ml disuelto en metanol al 20% (v/v). La incubación se realizó a temperatura ambiente hasta detectar la aparición de color. La reacción reveladora fue detenida por lavados sucesivos con agua destilada.

20. Purificación de fragmentos scFv solubles mediante cromatografía de afinidad al mAb anti-E tag

La purificación de los fragmentos scFv a partir de extractos periplásmicos o sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo empleando una columna HiTrap™ de 16 x 25 mm (GE Healthcare) que consiste en un mAb específico para el péptido *E-tag* inmovilizado en una matriz de *Sepharose High Performance*. Se empleó un cromatógrafo líquido de baja presión (Fast Protein Liquid Chromatography System, FPLC®, GE Healthcare) equipado con un colector automático de fracciones (FRAC-100) y una unidad registradora (REC-102). El protocolo de purificación utilizado se describe a continuación:

1. EQUILIBRADO: con solución de fosfatos 20 mM pH 7. Se emplearon 5 volúmenes de columna para esta etapa.
2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: el extracto periplásmico o el sobrenadante de cultivo se acondicionaron llevando a pH 7 con HCl 1 M. Posteriormente, la muestra se filtró por 0,45 µm.
3. SIEMBRA: se sembró un volumen de muestra apropiado según la capacidad de la matriz cromatográfica informada por el fabricante (0,7 mg scFv) y la concentración estimada de fragmento scFv.
4. LAVADO: las proteínas no retenidas por la matriz se lavaron con solución de fosfatos 20 mM pH 7 hasta demostrar la ausencia de proteínas por medida de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm.
5. ELUCIÓN: se realizó por descenso de pH. Se empleó una solución de glicina-HCl 0,1 M, pH 3. Se recogieron alícuotas de 1 ml y se neutralizaron inmediatamente agregando 30 µl de solución de Tris-HCl 1 M, pH 9. Las fracciones correspondientes al pico de elución de scFv, monitoreado a $\lambda = 280$ nm y mediante ELISA específico indirecto, fueron mezcladas y el producto obtenido fue diafiltrado contra PBS y concentrado utilizando el sistema de ultrafiltración Amicon Ultra-4 con membrana de 10 kDa de límite de corte (Millipore, Francia).
6. Luego de la elución la matriz fue rápidamente equilibrada con solución de equilibrio y conservada a 4 °C en dicha solución con el agregado de azida sódica 0,05% (p/v).

El flujo establecido durante las distintas etapas del proceso cromatográfico fue de 1 ml/min.

La concentración de los fragmentos scFv purificados se determinó espectrofotométricamente ($\lambda = 280$ nm) utilizando coeficientes de extinción (ϵ para 1 mg.ml⁻¹) deducidos a partir del contenido de aminoácidos aromáticos de la molécula (Gill y von Hippel, 1989) utilizando el programa *Vector NTI 4.0* (Invitrogen).

La determinación de pureza de los fragmentos se llevó a cabo mediante técnica de SDS-PAGE con posterior tinción argéntica. Para tal fin, se empleó el *kit Silver Strain Plus* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la densitometría de bandas coloreadas empleando un *scanner* para densitometría (ImageScanner, GE Healthcare) y el *software* ImageMaster TotalLab v 1.11 (GE Healthcare).

21. Caracterización de los fragmentos scFv recombinantes

21.1. Determinación de la constante de afinidad

La determinación de la constante de afinidad de los fragmentos recombinantes purificados se llevó a cabo mediante la metodología descrita en la sección 11.1, estudiando el equilibrio asociación-disociación entre el scFv y su antígeno y evaluando la concentración de scFv libre mediante técnica de ELISA específico indirecto. En este caso, al tratarse de anticuerpos monovalentes, se asumió que la concentración de Ab unido al antígeno resultaba idéntica a la concentración de sitios de unión ligados al antígeno, por lo que no se tuvo en cuenta la corrección efectuada por Stevens (1987).

En microtubos de 1,5 ml de capacidad se agregaron 175 μ l de soluciones de rhIFN- α 2b en concentraciones decrecientes desde 10 μ g.ml⁻¹ hasta 78 ng.ml⁻¹. Posteriormente, se adicionaron 175 μ l de una solución conteniendo el correspondiente scFv en una concentración constante. Las concentraciones de los fragmentos recombinantes fueron deducidas teniendo en cuenta el título de cada anticuerpo medido por técnica de ELISA específico indirecto (Anexo A.6). Se seleccionó la concentración de scFv necesaria para generar una respuesta equivalente al 50% de la máxima absorbancia obtenida en

condiciones de saturación del fragmento. Las diluciones se realizaron en solución de PBS, BSA 0,1% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v). Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Las mezclas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente.

Finalmente, el contenido de los tubos se transfirió a pozos de placas de microtitulación previamente sensibilizados con rhIFN- α 2b, realizándose un ensayo de ELISA específico indirecto siguiendo esencialmente el protocolo descrito en la sección 11.1, variando solamente la etapa correspondiente a la segunda incubación, donde la detección de la interacción de los fragmentos scFv con el antígeno inmovilizado se llevó a cabo empleando un mAb anti-E-Tag conjugado con la enzima peroxidasa diluido 1/8.000 en solución diluyente. La incubación se efectuó 1 h a 37 °C procediéndose, posteriormente, al revelado siguiendo el protocolo indicado en el anexo A.1.

21.2. Neutralización de la actividad biológica anti-viral *in vitro* de diferentes tipos de hIFN- α en presencia de los fragmentos scFv recombinantes

Los ensayos de neutralización de la actividad biológica anti-viral de los fragmentos scFv se llevaron a cabo empleando los estándares internacionales (NIBSC) de rhIFN- α 2a, rhIFN- α 2b, hIFN- α leucocitario y linfoblástico. El IFN- α leucocitario consiste en una mezcla de interferones alfa producidos por leucocitos de sangre periférica tras la inducción efectuada con el virus Sendai, mientras que el IFN- α linfoblástico, que también está constituido por una colección heterogénea de IFNs alfa, se produce por la acción del mismo virus sobre células Namalwa (células tumorales derivadas de un linfoma B humano).

Tanto la puesta a punto como la realización del ensayo de valoración de la actividad biológica anti-viral *in vitro* de los distintos tipos de IFN- α por parte de los fragmentos recombinantes, se llevaron a cabo mediante los procedimientos descritos en las secciones 12.1 y 12.2, respectivamente.

22. Incremento de la afinidad del fragmento scFv CA5E6 mediante mutagénesis al azar

Con el objeto de introducir mutaciones al azar en la secuencia correspondiente al scFv CA5E6 se utilizó la técnica de *error-prone* PCR (Cadwell y Joyce, 1992; Fromant y col.,

1995). Esta metodología consiste en inducir un aumento en la tasa de error de la enzima *Taq* polimerasa mediante el uso de los cuatro dNTPs en proporciones diferentes, o bien mediante el agregado de Mn^{2+} . En el presente trabajo se utilizaron diferentes concentraciones del mencionado catión sin modificar la proporción de los nucleótidos.

Para generar una biblioteca de fragmentos scFv CA5E6 mutados, se diseñaron oligonucleótidos complementarios a la regiones 3' y 5' de la secuencia del mencionado fragmento (*primers* EP Fw y EP Rv, respectivamente), conteniendo los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Sfi* I (EP Fw) y *Not* I (EP Rv). A continuación se indica la secuencia de cada oligonucleótido:

EP Fw: 5' - CCT TTC TAT GCG GCC CAG CC - 3'

EP Rv: 5' - AGC GGA TCC GGA TAC GGC AC - 3'

Para la reacción, llevada a cabo en termociclador, se utilizó un programa con 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 58 °C y 2 min a 72 °C con la siguiente mezcla de reactivos:

Templado (pCANTAB 5E-scFV CA5E6)	2 µl
Buffer de PCR 5X	20 µl
Mezcla de dNTPs (20 mM c/u)	2 µl
Primer EP Fw (50 µM)	2 µl
Primer EP Rv (50 µM)	2 µl
MnCl ₂ (10 mM)	X µl
GoTaq DNA pol. (5 U)	0,5 µl
H ₂ O _{dd} c.s.p.	100 µl

donde X es el volumen necesario de la solución de MnCl₂ necesario para obtener una concentración final de 0,075, 0,150, 0,300 o 0,600 mM de la sal.

Luego de purificar los productos amplificados se realizó la digestión enzimática y la posterior reacción de ligación con el vector pCANTAB 5E tal como se detalló en las secciones 16.4 y 16.5.

La construcción y expresión de la biblioteca de los fagos recombinantes correspondientes a los fragmentos scFv CA5E6 mutados, así como su *screening* y selección, se realizaron como se indicó en la sección 17. Durante el proceso de selección,

los fagos recombinantes se incubaron en presencia de rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida utilizando distintas condiciones de pH y fuerza iónica, con el objeto de seleccionar aquéllos que mostraran una mayor capacidad de unión con la citoquina. Para ello, en la primera ronda de *panning* se realizó un lavado de 30 min a temperatura ambiente utilizando las siguientes soluciones: glicina 0,1 M, pH 2; glicina 0,1 M, pH 3; acetatos 0,1 M, pH 4; acetatos 0,1 M, pH 5; NaCl 1 M en PBS; PBS (control).

23. Neutralización de la actividad biológica *in vivo* del rhIFN- α 2b por acción del mAb CA5E6

La capacidad neutralizante *in vivo* del mAb CA5E6 fue evaluada mediante el estudio de su habilidad para inhibir la actividad antiproliferativa del IFN- α 2b sobre el crecimiento de tumores sólidos implantados subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos.

Se utilizaron ratones *nude* atímicos de la cepa N:NIH *nu/nu* (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina) de 8 a 10 semanas de edad. Esta cepa fue generada en Glasgow, Escocia, en el año 1962, a partir de una colonia exocriada de ratones albinos Swiss que sufrió una mutación en un gen autosómico y recesivo, asociado a la ausencia de pelo, que produce disgenesia gonadal y aumento de la susceptibilidad a infecciones y a variaciones de temperatura. El ratón homocigota recesivo (*nu/nu*) presenta aplasia de timo, lo que produce numerosos defectos del sistema inmunológico y, en consecuencia, una escasa respuesta a los antígenos timodependientes debido a deficiencias cuantitativas y funcionales de las células T. Por estas características, es una de las cepas más utilizadas en investigación biomédica en el campo de la oncología al ser animales capaces de aceptar trasplantes tumorales sin producir el rechazo de los mismos (Pantelorius, 1971). Por su condición de inmunodeficientes, los ratones *nude* deben criarse y mantenerse bajo estrictas condiciones ambientales, libres de virus, bacterias, parásitos y hongos, clasificándose de acuerdo a su condición sanitaria como animales libres de patógenos específicos (SPF; Carbone y Maschi, 2006).

Los animales se alojaron en un gabinete de flujo laminar tipo I provisto de un filtro HEPA, a una temperatura de 28 ± 1 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 14-10 h. Se contuvieron en cajas de acero inoxidable con lecho de viruta estéril y se les proporcionó agua corriente autoclavada y alimento irradiado con luz UV *ad libitum*. Para su manipulación

se utilizó guardapolvo, guantes, cofia y barbijo, con el fin de evitar la transmisión de agentes infecciosos.

La línea tumoral prostática humana PC-3 fue utilizada para generar el modelo de tumor subcutáneo. Con este fin, las células se cultivaron en medio F y se cosecharon a partir de cultivos subconfluentes mediante tratamiento con tripsina. Seguidamente, se lavaron con medio RPMI libre de suero, se contaron y finalmente se resuspendieron en un volumen de PBS de manera de obtener una densidad celular de $1 \cdot 10^7$ cél.ml⁻¹. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en el flanco trasero izquierdo con 200 µl de suspensión celular ($2 \cdot 10^6$ células por animal). Dos días después de la implantación de las células tumorales, los ratones fueron distribuidos al azar en diferentes grupos para el comienzo del tratamiento.

En un experimento, los ratones fueron separados en dos grupos: un grupo control de tres animales y un grupo de seis animales que recibieron tratamiento con rhIFN-α2b. Los ratones correspondientes a este último grupo recibieron tres inyecciones por vía subcutánea y peritumoral de 33.000 UI de la citoquina, mientras que los animales del grupo control se inyectaron de igual forma con solución diluyente de la citoquina: PBS-BSA 0,1% (v/v). Todas las soluciones fueron previamente esterilizadas por filtración.

En otra experiencia, se conformaron tres grupos de ocho animales cada uno que recibieron tres inyecciones semanales por vía subcutánea y peritumoral de: 33.000 UI de rhIFN-α2b (grupo I), mezcla (preincubada durante 2 h a 37 °C) de 33.000 UI de la citoquina en presencia del mAb CA5E6 en una relación molar 1:10 (grupo II) y solución diluyente (grupo III).

La dimensión de los tumores se determinó semanalmente, previo al tratamiento, utilizando un calibre. El cálculo del volumen tumoral se realizó asumiendo una geometría elíptica, debido a que se ha reportado que la fórmula del elipsoide permite correlacionar adecuadamente el volumen con la masa del tumor (Tomayko y Reynolds, 1989). De acuerdo a ello, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen (cm}^3\text{)} = \frac{1}{2} \cdot L \cdot W^2 \quad (21)$$

donde L es el eje de mayor longitud y W el eje menor del tumor.

Luego de finalizado el tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos y pesados. Los resultados entre grupos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de test t de Student para comparación de diferentes tratamientos, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

ANEXO A: Técnicas inmunoquímicas

A.1. Determinación de la presencia de anticuerpos específicos anti-rhIFN- α 2b en el sobrenadante de cultivo de hibridomas o plasma de ratones inmunizados por técnica de ELISA específico indirecto

- 1- Sensibilización: Placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner, Alemania) fueron sensibilizadas con 100 μ l de rhIFN- α 2b en una concentración de 0,5 μ g.ml⁻¹ (50 ng por pozo) diluido en solución de carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l de solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE.UU.) 1% (p/v) preparada en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Se adicionaron 100 μ l de cada sobrenadante de cultivo de hibridomas para evaluar la presencia de anticuerpos específicos o diluciones 1:2 de plasma de ratones inmunizados con la citoquina para determinar el título de anticuerpos. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: Se agregaron 100 μ l de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO, Dinamarca), diluidos 1:1.000 con PBS, BSA 0,1% (p/v), Tween 20 al 0,05% (v/v) (solución diluyente). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: Comprende la reacción enzimática reveladora empleando como sustrato agua oxigenada 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3 con el agregado de o-fenilendiamina (Sigma) en una concentración de 0,5 mg.ml⁻¹ (solución de revelado). Se agregaron 100 μ l de solución de

revelado por cavidad y, luego de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μl de H_2SO_4 2 N. La lectura del color generado se efectuó a $\lambda = 492 \text{ nm}$ en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia).

6- Control: Sin sobrenadante de cultivo de hibridomas, pero con el agregado de medio de cultivo o plasmás basales de ratones no inmunizados.

A.2. Determinación del título de mAbs anti-rhIFN- α 2b por técnica de ELISA específico indirecto

1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fue sensibilizada con 100 μl de rhIFN- α 2b 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (50 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.

2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 μl de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

3- Primera incubación: Se agregaron 100 μl de diluciones sucesivas 1:2 de diferentes muestras. Las diluciones se realizaron con solución diluyente. El rango de diluciones ensayadas se seleccionó de acuerdo con el tipo de muestra estudiada:

- Líquido ascítico: 1:1.000 hasta 1:8.192.000

- mAb purificado: 1:100 hasta 1:204.800

Se incubó durante 1 h a 37 °C.

4- Segunda incubación: Se adicionaron 100 μl de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa (Dako) diluidos 1:1.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en A.1.

- 6- Controles: Se ensayaron dos controles:
- A- Sin muestra (líquido ascítico o mAb purificado) para evaluar el posible reconocimiento inespecífico del anticuerpo conjugado sobre el antígeno de sensibilización. El líquido ascítico o mAb fueron reemplazados por solución diluyente.
 - B- Sin sensibilizar (sólo bloqueo), pero con diluciones seriadas 1:2 de los distintos líquidos ascíticos y mAbs purificados para evaluar la inespecificidad sobre el agente bloqueante.

A.3. Determinación de las variedades isotípicas de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas murinas por técnica de ELISA específico indirecto

- 1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fue sensibilizada con 100 μl de rhIFN- α 2b 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (50 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 μl de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Se agregaron 100 μl de sobrenadante de cultivo de hibridomas sin diluir o líquido ascítico murino diluido 1:1.000 con solución diluyente empleando 8 pozos por placa para cada muestra (corresponde un pozo para cada isotipo murino de cadena pesada y liviana). Se incubó durante 2 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: Cada muestra se incubó con 100 μl de anticuerpos de conejo anti-isotipos murinos diluidos 1:1.000 en PBS. Se ensayó un pozo de muestra por cada anti-isotipo: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, IgM, κ y λ (Bio-Rad, EE.UU). La incubación se efectuó durante 1 h a 37 °C.

- 5- Tercera incubación: Se adicionaron 100 μ l de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) diluidos 1:1.000 con solución diluyente. La incubación se efectuó durante 1 h a 37 °C.
- 6- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en A.1.

A.4. Cuantificación de inmunoglobulinas monoclonales por técnica de ELISA sandwich

- 1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fue sensibilizada con 100 μ l de inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón (DAKO) diluidas 1:2.000 en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 μ l solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Estándar: se incubaron 100 μ l de de inmunoglobulinas policlonales de ratón (Sigma) diluidas en solución diluyente desde una concentración de 400 ng.ml⁻¹ hasta 1,57 ng.ml⁻¹ en sucesivas diluciones 1:2.
- Muestra: 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 en solución diluyente de:
- Líquido ascítico: dilución 1:20.000 hasta 1:1.280.000
 - mAb purificado: dilución 1:2.000 hasta 1:128.000
- Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: Se adicionaron 100 μ l de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) diluido 1:500 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

- 5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en A.1.
- 6- Control: Sin muestra (líquido ascítico o mAb purificado) para evaluar el posible reconocimiento inespecífico del conjugado sobre el antígeno de sensibilización. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.

A.5. Medición de la eficiencia de acoplamiento de biotina a los mAbs mediante técnica de ELISA específico indirecto

- 1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano fue sensibilizada con 100 μl de rhIFN- α 2b en una concentración de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (50 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 μl de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Se adicionaron 100 μl por pozo de diluciones sucesivas 1:2 de los diferentes mAbs biotinilados, desde 1:50 hasta 1:102.400 preparadas en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: Se agregaron 100 μl por pozo de streptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (DAKO) diluida 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en A.1.
- 6- Control: Se ensayaron dos controles:
- A- Sin sensibilizar (sólo bloqueo), pero con diluciones seriadas al medio de los distintos mAbs biotinilados para evaluar la inespecificidad sobre el agente bloqueante.
 - B- Sin muestra (mAb biotinilado) para evaluar el posible reconocimiento inespecífico del conjugado sobre el antígeno de

sensibilización. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.

A.6. Determinación de la presencia de fragmentos scFv solubles específicos anti-IFN- α 2b por técnica de ELISA específico indirecto

- 1- Sensibilización: Una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fue sensibilizada con 100 μ l de rhIFN- α 2b 1 μ g.ml⁻¹ (100 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 200 μ l de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: Se agregaron 100 μ l de sobrenadante de cultivo de células de *E. coli* TG-1 o HB2151 transformadas con los vectores correspondientes diluido 1:2 con solución diluyente. Se incubó durante 2 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: Se acondicionaron 100 μ l de mAbs anti-*E-tag* conjugados con la enzima peroxidasa diluidos 1:8.000 en solución diluyente. La incubación se efectuó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en A.1.
- 6- Controles: Se realizaron dos controles:
 - A- Sin sensibilizar (sólo bloqueo), pero con diluciones seriadas 1:2 de los sobrenadantes de cultivo para evaluar la inespecificidad sobre el agente bloqueante.
 - B- Sin muestra (sobrenadante de cultivo de bacterias) para evaluar el posible reconocimiento inespecífico del conjugado. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Preparación de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b

1.1 Evaluación del título de anticuerpos policlonales anti-rhIFN- α 2b en plasma de ratones inmunizados

Se verificó la respuesta inmune humoral anti-rhIFN- α 2b en el plasma de 4 ratones inoculados con 4 dosis semanales de 50 μ g de rhIFN- α 2b por vía ip. Con ese fin, se evaluó el título de anticuerpos específicos mediante técnica de ELISA específico indirecto (Fig 7).

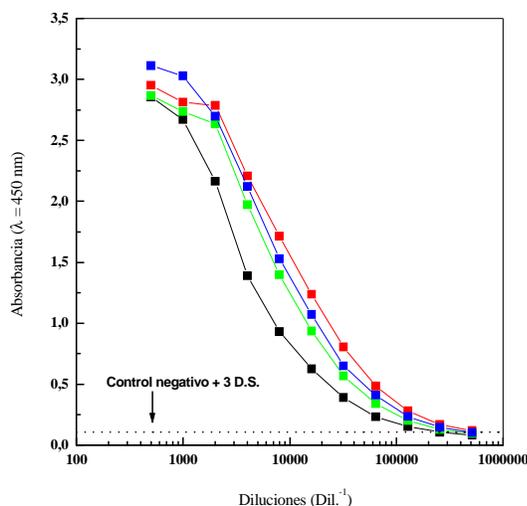


Fig. 7: Determinación del título de anticuerpos específicos en plasma de ratones inmunizados con rhIFN- α 2b no glicosilado.

En eje de ordenadas se graficó la absorbancia medida a una $\lambda = 492$ nm para cada una de las diluciones de plasma ensayadas, cuyos valores recíprocos fueron graficados en eje de abscisas. El valor de absorbancia del control negativo más 3 D.S. se indica en línea de puntos.

Muestras: plasma de ratón 1 (■), plasma de ratón 2 (■), plasma de ratón 3 (■) y plasma de ratón 4 (■).

Se definió un título de corte del ensayo a partir del cual todo plasma fue considerado positivo con respecto a la presencia de anticuerpos específicos anti-rhIFN- α 2b. El título de cada plasma fue calculado como la máxima dilución cuyo valor de absorbancia superó en tres desviaciones estándar el valor de absorbancia promedio del correspondiente control negativo (solución diluyente de ELISA, que coincidió con la absorbancia de diluciones sucesivas del plasma de ratones sin inmunizar). De esta manera, el título de anticuerpos específicos osciló entre 128.000^{-1} y 512.000^{-1} , considerándose adecuados para la generación de hibridomas.

1.2 Ensayos de fusión y clonado celular para la obtención de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b

Los ensayos de fusión celular rindieron un total de 55 líneas de hibridomas productores de anticuerpos anti-rhIFN- α 2b (sólo uno de los procesos de fusión no generó hibridomas productores de inmunoglobulinas específicas). En la Tabla I se indican las líneas obtenidas en cada fusión celular, incluyéndose además el isotipo de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas producidas por cada línea celular, evaluadas por técnica de ELISA específico indirecto. Dichas líneas celulares fueron amplificadas gradualmente de manera de obtener material celular apropiado para la criopreservación y el clonado subsiguientes.

Tabla I: Líneas de hibridomas obtenidas en los procesos de fusión celular.

Fusión	Línea de hibridoma	Isotipo	Fusión	Línea de hibridoma	Isotipo	Fusión	Línea de hibridoma	Isotipo
1	A4A4	P.E.	2	B10G8	IgG ₁	4	D8B11	IgG ₁
	A3F11	IgM		B1D10	IgG ₁		D8G3	IgG ₁
	A3H9	P.E.		B9C3	IgG ₁		D1G10	IgG ₁
	A5E8	P.E.		B8F8	IgG ₁		D1C1	IgG ₁
	A5E10	IgG _{2b}		B8D12	IgG ₁		D6G11	P.E.
	A4F11	IgG ₁		B9A5	IgG ₁		D1H10	P.E.
	A3C4	P.E.		B4B10	IgG ₁		D9B9	IgG ₁
	A1C5	IgG ₁		B1A10	IgG ₁		D1E5	IgG ₁
	A1C11	IgG ₁		B1D9	P.E.	D1G4	IgG ₁	
	A1A3	P.E.		B9F1	IgG ₁	D6D1	IgG ₁	
	A5F12	IgG ₁		B1E11	IgG ₁			
	A1C2	N.D.		B6H7	P.E.			
	A2E1	IgG ₁		B4B2	IgG ₁			
	A4C12	N.D.		B1B5	IgG ₁			
	A1F5	P.E.		B1B4	IgG ₁			
	A1D5	IgG ₁		B1G5	IgG ₁			
	A4E8	IgG _{2a}		B8G4	P.E.			
	A2F4	N.D.		B6F5	IgG ₁			
	A1H3	N.D.		B8F3	IgG ₁			
	A2F1	IgG ₁		B5H2	IgG ₁			
A4D9	IgG _{2b}	B3H3	IgG ₁					
A3G10	P.E.	B10D9	IgG ₁					
A3G7	IgG ₁							

P.E.: Pérdida de la capacidad para expresar inmunoglobulinas específicas.

N.D. No determinado

De acuerdo con lo observado en la Tabla I, todos los isotipos que pudieron identificarse resultaron IgG (con predominio de la subclase IgG₁), exceptuando el caso de la línea de hibridomas A3F11, que produjo inmunoglobulinas de isotipo IgM. Normalmente la producción de mAbs de isotipo IgM ocurre cuando las fusiones se desarrollan en períodos muy cercanos a la respuesta primaria del animal frente al antígeno o bien frente a antígenos de naturaleza timo-independientes. Asimismo, las moléculas de IgM exhiben baja afinidad y superior inespecificidad antigénica (Harlow y Lane, 1988) careciendo de interés biotecnológico. Por lo tanto, se consideró satisfactorio el plan de inmunización utilizado, resultando adecuados todos los períodos de descanso desarrollados (4, 7 y 9 meses) antes de la última re-estimulación con el inmunógeno.

Con el objetivo de aislar clones productores de mAbs con distinta especificidad y afinidad por el rhIFN- α 2b, se clonaron 22 líneas de hibridomas productores de anticuerpos anti-rhIFN- α 2b de isotipo IgG. A partir del momento en que se observó crecimiento de híbridos se determinó el número de clones visualizados por pozo. Cuando éstos llegaron a densidad adecuada (70% de confluencia) se evaluó la presencia de anticuerpos anti-rhIFN- α 2b por técnica de ELISA específico indirecto. Los clones que demostraron reacción positiva por técnica de ELISA fueron amplificados gradualmente y congelados.

Durante el proceso de clonado, cuatro líneas de hibridomas demostraron capacidad para proliferar en cultivo generando clones no productores de inmunoglobulinas específicas anti-rhIFN- α 2b. Probablemente, estas células perdieron la capacidad de expresión de la inmunoglobulina de interés debido a la segregación de genes indispensables para tal fin durante las sucesivas divisiones celulares. De esta manera, 18 líneas fueron clonadas con éxito obteniéndose 50 clones productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b, a los que se les determinó el isotipo de cadena pesada mediante técnica de ELISA específico indirecto (Tabla II).

En resumen, se obtuvieron 45 hibridomas productores de inmunoglobulinas de isotipo IgG₁, 3 hibridomas productores de inmunoglobulinas de isotipo IgG_{2a} (correspondientes a la única línea de hibridomas productores de mAbs con ese isotipo) y 2 clones que perdieron la capacidad para producir mAbs anti-IFN- α 2b durante los sucesivos subcultivos. Estos últimos hibridomas confirman que en las etapas iniciales de crecimiento luego del clonado, algunos clones son inestables y exhiben el comportamiento anteriormente mencionado de pérdida de cromosomas (Butler, 1988).

Tabla II: Clonado de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b.

Línea celular	Clones seleccionados	Isotipo
A3G7	CA1A3	IgG ₁
A4F11	CA8B7	IgG ₁
A2E1	CA6C8	IgG ₁
	CA6E7	IgG ₁
	CA6G8	IgG ₁
	CA5E7	IgG ₁
	CA5E6	IgG ₁
A1D5	CA3E6	IgG ₁
	CA3F6	IgG ₁
	CA9E2	IgG ₁
	CA9C3	IgG ₁
A4E8	CA1G6	P.E.
	CA2A7	P.E.
	CA2H6	IgG _{2a}
	CA2F8	IgG _{2a}
	CA2G7	IgG _{2a}
A2F1	Clones no productores de Ig específicas	
B10G8	CB33B3	IgG ₁
	CB33E4	IgG ₁
B8D12	CB24D5	IgG ₁
	CB24A10	IgG ₁
	CB23D9	IgG ₁
B4B10	CB29D3	IgG ₁
	CB30E4	IgG ₁
B4B2	Clones no productores de Ig específicas	
B9F1	CB27H5	IgG ₁
	CB27H2	IgG ₁
	CB28C8	IgG ₁
	CB28F8	IgG ₁
B1E11	CB32G7	IgG ₁
	CB32G6	IgG ₁
B1B4	CB13A7	IgG ₁
	CB14E6	IgG ₁
	CB14F6	IgG ₁
B1D10	Clones no productores de de Ig específicas	
B10D9	CB15D7	IgG ₁
	CB15C6	IgG ₁
	CB16E5	IgG ₁
D8G3	CD35E11	IgG ₁
	CD36F11	IgG ₁
D1G4	CD37F8	IgG ₁
D8B11	Clones no productores de Ig específicas	
D9B9	CD42H11	IgG ₁
	CD41G11	IgG ₁
	CD42H10	IgG ₁
	CD42F9	IgG ₁

D1E5	CD43F10	IgG ₁
	CD43G10	IgG ₁
D6D1	CD46F6	IgG ₁
	CD45G3	IgG ₁
	CD45C6	IgG ₁
D1G10	CD48G10	IgG ₁
	CD47H10	IgG ₁
	CD47G9	IgG ₁

P.E: pérdida de la capacidad para expresar la inmunoglobulina específica luego de subcultivos sucesivos al procedimiento de clonado celular.

2. Producción y purificación de mAbs anti-rhIFN- α 2b

2.1. Producción *in vivo* de mAbs anti-rhIFN- α 2b

Se seleccionaron 11 clones para su amplificación *in vivo* (procedentes de las distintas líneas celulares obtenidas en los dos primeros procesos de fusión celular): CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB13A7, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3 y CB33B3. Dada la multiplicidad de hibridomas obtenidos se trabajó con un clon representante de cada una de las primeras 11 líneas clonadas.

Luego de amplificar los hibridomas *in vivo* para la producción de líquido ascítico, se procedió a confirmar el isotipo de cadena pesada de las inmunoglobulinas, incorporándose, además, el análisis del isotipo de cadena liviana mediante técnica de ELISA específico indirecto. Todos los clones seleccionados demostraron el mismo isotipo de cadena pesada anteriormente analizado (IgG₁) y, a su vez, todos ellos demostraron pertenecer al grupo de isotipo de cadena liviana κ (Tabla III). El análisis de la variedad isotópica de las inmunoglobulinas constituye un factor de importancia desde el punto de vista biotecnológico, inherente al diseño de los procedimientos de cuantificación y purificación y, en particular, constituye una condición indispensable para llevar a cabo la obtención de fragmentos recombinantes de cadena única (scFv) a partir de los hibridomas producidos.

La determinación del título de anticuerpos por técnica de ELISA específico mediado por antígeno brinda información acerca de la especificidad y afinidad aparente de los anticuerpos por el antígeno inmovilizado en una fase sólida, así como información con respecto a su concentración, dependiente de los dos parámetros antes mencionados. Con este ensayo se puede determinar un título de corte, el que puede ser relacionado con la concentración de inmunoglobulinas determinada por otro método. La Fig. 8A muestra la

titulación de los mAbs anti-rhIFN- α 2b en algunos ejemplos de líquidos ascíticos. Se definió como título de corte a la mayor dilución de fluido ascítico o solución de mAb purificado cuyo valor de absorbancia superó en tres desviaciones estándar el valor promedio de absorbancia del control negativo.

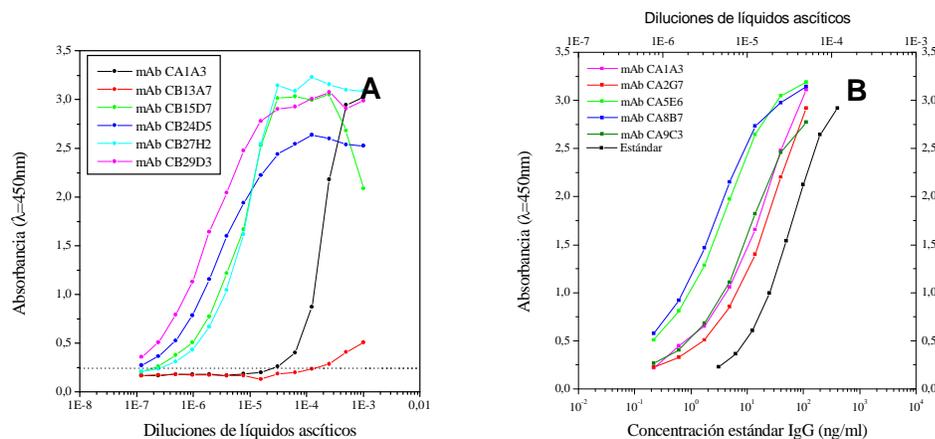


Fig. 8: Titulación y cuantificación de mAbs anti-rhIFN- α 2b presentes en líquido ascítico murino.

- A- Titulación de los anticuerpos anti-rhIFN- α 2b mediante ELISA específico indirecto. La línea de puntos indica el valor de absorbancia promedio correspondiente al control negativo del ensayo ($n=3$).
- B- Cuantificación de los anticuerpos anti-rhIFN- α 2b presentes en ascitis murina mediante ELISA *Sándwich*.

La determinación de la concentración de anticuerpos en líquido ascítico fue efectuada por técnica de ELISA *sandwich*. Este ensayo pone en evidencia la totalidad de los anticuerpos de tipo IgG presentes en el fluido biológico: monoclonales producidos a partir del tumor de células híbridas y policlonales de ratón. Mediante la mencionada técnica se calculó con bastante aproximación la concentración de mAbs debido a que en una ascitis murina más del 90% de las inmunoglobulinas son las monoclonales producidas por los hibridomas. En la Fig. 8B se muestra la curva de calibración obtenida empleando inmunoglobulinas policlonales de isotipo IgG de ratón como patrón de cuantificación y las curvas correspondientes a algunos ejemplos de fluidos ascíticos. Las pendientes de las curvas, calculadas por el método de regresión lineal demostraron un comportamiento semejante, lo que indica que el anticuerpo de captura es capaz de reconocer de la misma manera a las inmunoglobulinas del estándar y a las inmunoglobulinas presentes en las muestras. La cuantificación de los anticuerpos se llevó a cabo determinando la concentración del estándar y la dilución de la muestra para un valor de absorbancia correspondiente al 50% de la zona de respuesta lineal del ensayo. Posteriormente,

multiplicando dicha concentración por el valor recíproco de la dilución se obtuvo la concentración de anticuerpos en los líquidos ascíticos.

Los resultados, resumidos en la Tabla III, señalan al hibridoma CB15D7 como el clon que produjo mayor concentración acumulada de inmunoglobulinas murinas ($23,1 \text{ mg.ml}^{-1}$), incluso superior a la máxima descrita en bibliografía (Butler, 1988). El hibridoma CB13A7 demostró ser el clon menos productor, con una concentración acumulada de anticuerpos en líquido ascítico de $0,9 \text{ mg.ml}^{-1}$. Asimismo, el mAb producido por este último hibridoma exhibió el título de anticuerpos específicos más bajo de todo el panel de mAbs. Otros dos clones con bajo título de mAbs fueron los correspondientes a los hibridomas CA1A3 y CA2G7. Los restantes mAbs del panel demostraron elevados títulos de anticuerpos específicos, indicando elevada capacidad de reconocimiento de la molécula inmovilizada en fase sólida.

Tabla III: Comparación del título, concentración e isotipo de los mAbs amplificados en fluido ascítico.

Clon	Isotipo	Título (dil^{-1})	Concentración IgG (mg.ml^{-1})
CA1A3	IgG ₁ /κ	32.000	$2,7 \pm 0,1$
CA2G7	IgG _{2a} /κ	256.000	$1,7 \pm 0,1$
CA5E6	IgG ₁ /κ	2.048.000	$5,6 \pm 0,2$
CA8B7	IgG ₁ /κ	8.192.000	$6,6 \pm 0,4$
CA9C3	IgG ₁ /κ	1.024.000	$5,7 \pm 0,2$
CB13A7	IgG ₁ /κ	4.000	$0,9 \pm 0,1$
CB15D7	IgG ₁ /κ	4.096.000	$23,1 \pm 0,4$
CB24D5	IgG ₁ /κ	8.192.000	$16,9 \pm 0,2$
CB27H2	IgG ₁ /κ	2.048.000	$12,7 \pm 0,3$
CB29D3	IgG ₁ /κ	8.192.000	$20,1 \pm 0,4$
CB33B3	IgG ₁ /κ	4.096.000	$7,8 \pm 0,2$

2.2 Purificación de mAbs por cromatografía de afinidad a proteína A

Los mAbs presentes en las ascitis murinas fueron purificados por cromatografía de afinidad a proteína A.

La Fig. 9 muestra un cromatograma típico obtenido durante la purificación del mAb CA5E6, monitoreado por lecturas espectrofotométricas a $\lambda = 280 \text{ nm}$.

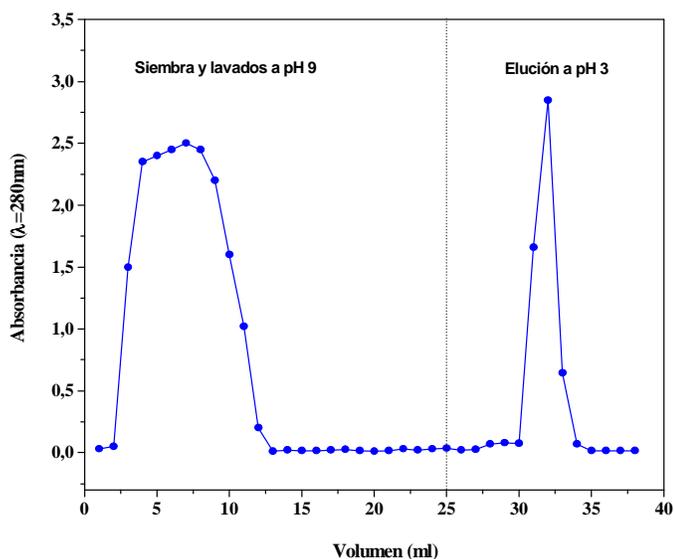


Fig. 9: Purificación de mAbs mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

Se ejemplifica la purificación del mAb CA5E6. En eje de ordenadas se graficó la absorbanza medida a $\lambda=280$ nm para cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso cromatográfico (eje de abscisas). La línea de puntos separa la etapa correspondiente a la siembra y lavados a pH 9 de la etapa de elución a pH 3.

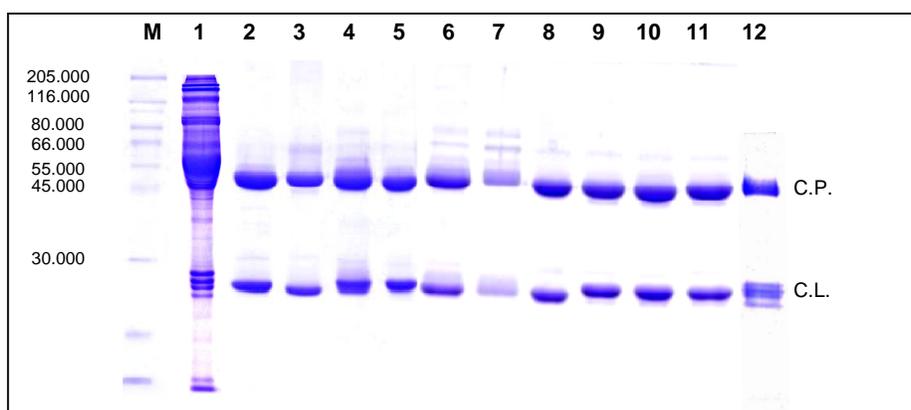
El rendimiento de la purificación de cada mAb fue calculado teniendo en cuenta la masa de anticuerpo sembrada y la masa recuperada durante la etapa de elución a pH 3, determinadas mediante técnica de ELISA *sándwich*. Se observó un rendimiento variable que osciló entre 33 y 97% (Tabla IV).

La pureza del producto de la elución ácida correspondiente a cada uno de los líquidos ascíticos procesados fue evaluada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 10). En todos los eluidos se visualizan mayoritariamente las bandas correspondientes a las cadenas pesadas (50 kDa) y livianas (25 kDa) de los anticuerpos, observándose en algunos de los productos de elución, la presencia de escasos contaminantes típicos de un líquido ascítico murino (principalmente albúmina).

Tabla IV: Rendimiento de la purificación de mAbs por cromatografía de afinidad a proteína A a partir de ascitis.

Clon	Concentración IgG en el mAb purificado (mg.ml ⁻¹)	Rendimiento (%)
CA1A3	0,5 ± 0,1	37
CA2G7	1,3 ± 0,1	97
CA5E6	1,3 ± 0,1	92
CA8B7	0,8 ± 0,1	52
CA9C3	0,5 ± 0,1	80
CB13A7	0,3 ± 0,1	80
CB15D7	1,1 ± 0,1	57
CB24D5	1,3 ± 0,1	80
CB27H2	1,6 ± 0,1	95
CB29D3	1,2 ± 0,1	77
CB33B3	0,3 ± 0,1	33

El grado de pureza obtenido fue considerado adecuado para continuar con las siguientes etapas del trabajo.

**Fig. 10:** Evaluación de la purificación de mAbs mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

Las fracciones correspondientes a los picos de elución de cada mAb se mezclaron, dializaron y analizaron mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción con azul brillante de Coomasie.

Carriles: (M) Marcadores de masa molecular; (1) Ascitis murina obtenida a partir del hibridoma CB15D7; eluidos a pH 3 de los anticuerpos: (2) mAb CA5E6, (3) mAb CA2G7, (4) mAb CA9C3, (5) mAb CA8B7, (6) mAb CA1A3, (7) mAb CB13A7, (8) mAb CB24D5, (9) mAb CB29D3, (10) mAb CB27H2, (11) mAb CB15D7, (12) mAb CB33B3.

Se indican además, las bandas proteicas correspondientes a la cadena pesada (C.P.) y cadena liviana (C.L.) de las inmunoglobulinas.

3. Caracterización inmunoquímica del panel de mAbs anti-rhIFN- α 2b

3.1. Identificación del rhIFN- α 2b desnaturalizado mediante ensayos de *Western-Blot*

Se evaluó la capacidad de cada mAb para reconocer la citoquina desnaturalizada por acción combinada de los reactivos SDS y 2-ME empleando la técnica de *Western-Blot*. En la Fig. 11 se muestran los resultados correspondientes a aquellos anticuerpos que demostraron capacidad de reconocimiento del rhIFN- α 2b (mAbs CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA15D7, CB27H2, CB29D3 y CB33B3). En todos los casos se observó una única banda de masa molecular aparente de 19 kDa aproximadamente, correspondiente a la molécula del rhIFN- α 2b producido en bacterias (no glicosilado).

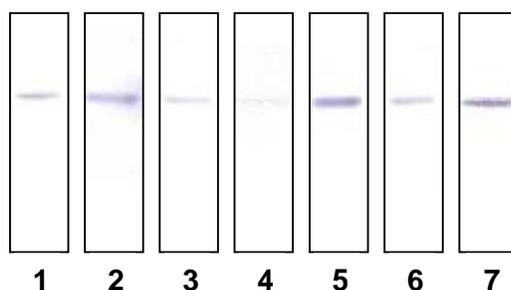


Fig. 11: Identificación del rhIFN- α 2b mediante ensayo de *Western-Blot* empleando diferentes mAbs.

Se evaluó la reactividad de cada mAb en presencia de la citoquina desnaturalizada por acción de SDS y 2-ME. Sólo se indican aquellos anticuerpos que demostraron reactividad frente a la citoquina: (1) mAb CA1A3, (2) mAb CA2G7, (3) mAb CA5E6, (4) mAb CA15D7, (5) mAb CB27H2, (6) mAb CB29D3 y (7) mAb CB33B3.

Los mAbs CA2G7, CB27H2 y CB33B3 fueron los más reactivos, resultando adecuados para la detección e identificación de la citoquina adsorbida a membranas.

3.2. Determinación de la constante de afinidad de los mAbs

El estudio del equilibrio de asociación-disociación entre un determinado mAb y su correspondiente antígeno, basado en la utilización de una técnica de ELISA para determinar la concentración de anticuerpo libre, permitió la cuantificación de la constante de disociación de dicho equilibrio. Esta metodología ofrece una serie de ventajas relacionadas con la practicidad, sencillez y rapidez de un método clásico como el ELISA específico indirecto que requiere, a su vez, pequeñas cantidades de reactivos (antígeno y anticuerpo),

proporcionando una elevada sensibilidad para la detección de bajas concentraciones de anticuerpo libre. Asimismo, la posibilidad de evitar marcaciones del antígeno o anticuerpo con radioisótopos o reactivos fluorogénicos constituye otra ventaja del método, que contribuye a su amplia aplicación y aceptación.

Algunos autores han cuestionado errores sistemáticos que se cometen usando esta técnica y que afectan directamente el cálculo de la verdadera afinidad existente entre el antígeno y un determinado anticuerpo. Entre ellos, se mencionaron los efectos de la diferente densidad y composición del antígeno presente en la fase sólida, sobre la cuantificación de la constante de disociación (Seligman, 1994). Además, se señaló el efecto de la bivalencia de los anticuerpos en la subestimación de la afinidad de un anticuerpo por su antígeno (Stevens, 1987), o el resultado de la distorsión del equilibrio en solución debido a la asociación del anticuerpo con el antígeno adsorbido en fase sólida (Friguet y col., 1985).

El análisis desarrollado por Stevens (1987) y aplicado en este trabajo, permitió corregir el error de tal subestimación, convirtiendo las concentraciones aparentes de anticuerpo unido al antígeno en concentraciones de sitios de unión ligados al antígeno. De esta forma, se acercó el cálculo de la constante de disociación de un anticuerpo intacto con gran aproximación al realizado por un método convencional como el inmunoanálisis radiométrico. Por otro lado, los experimentos llevados a cabo por Friguet y col. (1985) y Friguet y col. (1989) demostraron que la cantidad de anticuerpo libre medida por el método de ELISA específico indirecto solamente representa una muy pequeña fracción del anticuerpo libre en fase líquida, asegurando de esta manera que dicha técnica no provoca un desplazamiento significativo del equilibrio antígeno-anticuerpo y que, si éste existiese, estaría limitado en un valor aproximado del 10%.

Con respecto al efecto de la densidad y composición del antígeno, en este estudio se utilizó la misma cantidad de antígeno inmovilizado en fase sólida (50 ng de citoquina por pozo) y la misma composición antigénica para la determinación de la constante de disociación correspondiente al equilibrio de asociación-disociación de cada mAb. Por consiguiente, la cuantificación de la misma estaría afectada, en este aspecto, en el mismo sentido para todos los anticuerpos. A los efectos de establecer comparaciones entre las distintas afinidades de los mAbs por la molécula de rhIFN- α 2b, el método propuesto inicialmente por Friguet y col. (1985) y posteriormente corregido por Stevens (1987) fue considerado apropiado.

En la Fig. 12 se muestran, a modo de ejemplo, algunas representaciones gráficas realizadas con el objeto de calcular la constante de afinidad de cada mAb con la molécula de rhIFN- α 2b. Mediante representaciones de Scatchard, se calculó la constante de afinidad a partir de la pendiente de la regresión lineal establecida con los datos experimentales procesados por triplicado. El resultado de la constante de afinidad se expresó mediante el promedio de las pendientes calculadas, y el error de tal estimación, mediante la desviación estándar de las tres determinaciones.

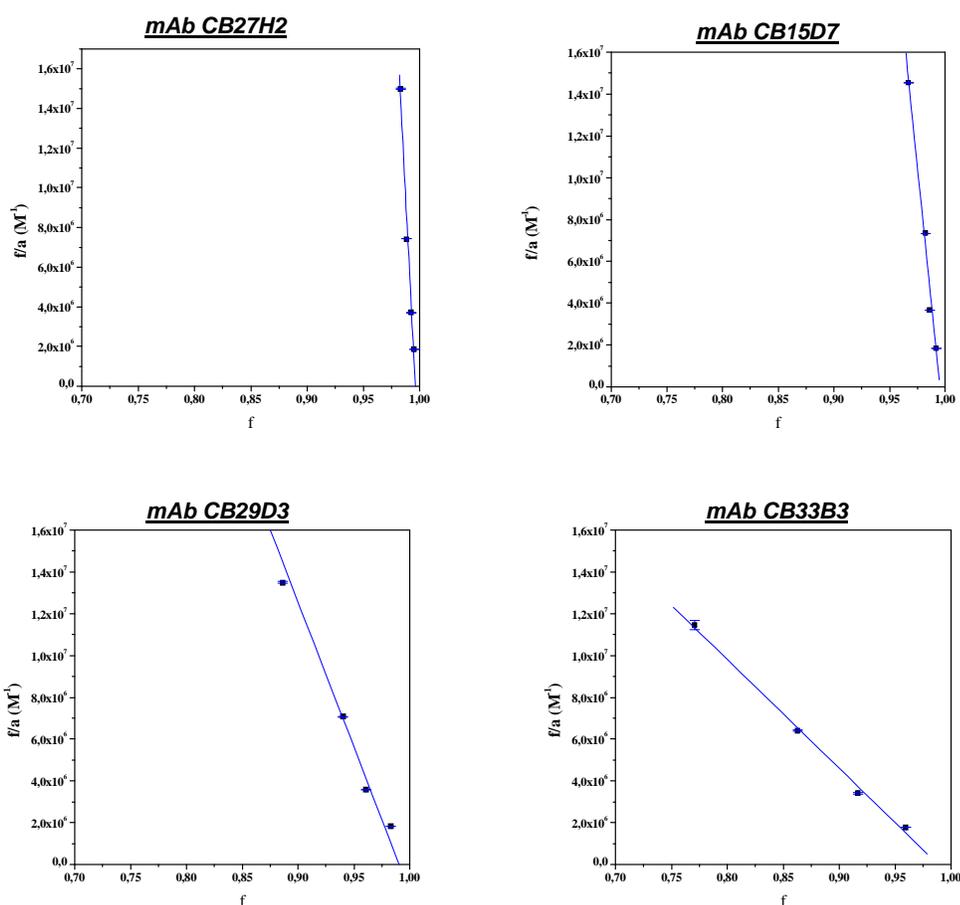


Fig. 12: Representación de Scatchard para la determinación de la constante de afinidad del complejo mAb purificado-rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA.

En eje de ordenadas se representó el cociente entre la raíz cuadrada de la función de unión y la concentración de antígeno libre en el equilibrio para cada concentración total de antígeno ensayada. En eje de abscisas se representó la raíz cuadrada de la función de unión. La constante de afinidad, calculada a partir del valor de la pendiente de la regresión lineal de los datos experimentales, fue evaluada en presencia de concentraciones decrecientes de la citoquina. Las barras de error indican las desviaciones estándares de las determinaciones ($n=3$).

En las representaciones gráficas de la Fig. 12, se observa efectivamente el ajuste de los datos experimentales a una regresión lineal, cumpliendo con la rectificación de la ley de acción de masas desarrollada originalmente por Scatchard (1949). De este modo, el cumplimiento de la ecuación 16 para el cálculo de la constante de afinidad quedó demostrado por la tendencia a la unidad en el eje de abscisas cuando el cociente entre la raíz cuadrada de la función de unión y la concentración de antígeno libre en el equilibrio tendió a cero. En el modelo de equilibrio, dicha tendencia al valor 1 para la raíz de la función de unión ocurre frente a la saturación de los sitios de unión existentes en el paratope del anticuerpo. Esta situación se observó para concentraciones elevadas de antígeno total (a_0) que favorecieron la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Por otro lado, la similitud observada entre el valor de la pendiente de la recta de regresión y el correspondiente valor de la ordenada al origen confirmó el ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto.

Las constantes de afinidad de los mAbs que componen el panel en estudio, se resumen en la Tabla V.

Tabla V: Constante de afinidad de los mAbs purificados.

mAbs	Constante de afinidad (M^{-1})
CA1A3	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$
CA2G7	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$
CA5E6	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$
CA8B7	$(4,7 \pm 0,4) \cdot 10^7$
CA9C3	$(4,1 \pm 0,3) \cdot 10^7$
CB13A7	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$
CB15D7	$(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^8$
CB24D5	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^7$
CB27H2	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^9$
CB29D3	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^8$
CB33B3	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^7$

El panel de mAbs demostró un amplio rango de afinidades por la molécula nativa de rhIFN- α 2b. Los mAbs CA1A3 y CB27H2 mostraron elevadas afinidades por la citoquina en condiciones nativas. Los anticuerpos CB15D7, CA5E6, CA2G7, CB13A7 y CB29D3 exhibieron afinidades moderadas, mientras que los restantes mAbs evidenciaron bajas afinidades ($< 10^8 M^{-1}$).

Independientemente de la afinidad de los mAbs constituyentes del panel, todos ellos exhibieron capacidad para reconocer a la molécula de rhIFN- α 2b en su estado nativo. En consecuencia, estos anticuerpos resultan aptos para todas aquellas técnicas que requieran el reconocimiento de la citoquina en tal condición (técnica de ELISA de captura de antígeno para su cuantificación, cromatografía de inmunoafinidad para la purificación del antígeno, ensayos de neutralización de la actividad biológica *in vitro*, entre otras).

3.3. Mapeo de los epitopes del rhIFN- α 2b

Se realizó el análisis de los epitopes reconocidos por cada mAb, desde el punto de vista de la identidad (epitopes análogos o solapados) o no identidad (epitopes diferentes) de los mismos, mediante ensayos de inhibición competitiva por ELISA. De esta manera, se evaluó la capacidad de pares de mAbs para competir en su interacción con el rhIFN- α 2b.

Para ello, se empleó uno de los reactivos conjugado con biotina como molécula reportera de la competición. Inicialmente, se conjugó el rhIFN- α 2b con biotina, de manera de evitar el laborioso proceso que significa conjugar todos los mAbs constituyentes del panel. Desafortunadamente, la mayoría de los mAbs no interaccionaron con la molécula de rhIFN- α 2b biotinilada debido al enmascaramiento de sitios indispensables para el reconocimiento antigénico. Por esta razón, se realizó la conjugación de cada mAb con biotina.

Mediante ELISA específico indirecto se analizó, simultáneamente, la incorporación de biotina a la estructura proteica y el grado de compromiso en el reconocimiento antígeno-anticuerpo como resultado de dicha reacción de conjugación. De los 11 anticuerpos ensayados, 9 fueron conjugados con éxito preservando la capacidad de reconocimiento antigénico (Fig. 13). Los mAbs CA9C3 y CB13A7 perdieron capacidad de reconocimiento del antígeno luego de la biotinilación, lo que evidenciaría que la incorporación de biotina ocurrió en sitios comprometidos en la interacción con el antígeno (regiones Fv del anticuerpo).

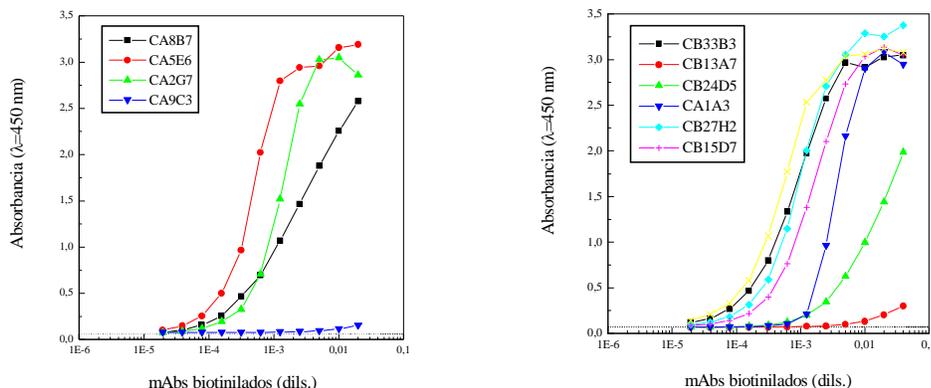


Fig. 13: Análisis de la reactividad de los mAbs biotinilados mediante ELISA específico indirecto.

En eje de ordenadas se graficó la absorbancia medida a una $\lambda = 450$ nm para cada una de las diluciones de mAb biotinilado ensayado (eje de abscisas).

El ensayo seleccionado para llevar a cabo el mapeo de epítopes se esquematiza en la Fig. 14. El procedimiento consistió en incubar cada mAb biotinilado, en una concentración constante, con diluciones seriadas de los mAbs no biotinilados en presencia del rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida. Finalmente, se midió la presencia de anticuerpo biotinilado unido a la fase sólida empleando estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa.

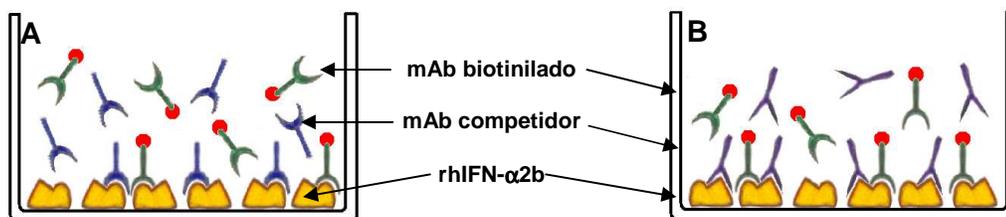


Fig. 14: Representación esquemática del ensayo de ELISA de competición utilizado en el mapeo de epítopes del rhIFN- α 2b.

El sistema seleccionado permite distinguir:

- A- Anticuerpos que compiten por la unión a la citoquina inmovilizada
- B- Anticuerpos que no compiten por la unión a la citoquina inmovilizada

En estos ensayos se realizó una distinción entre anticuerpos homólogos y heterólogos. Cuando el anticuerpo biotinilado y el competidor correspondieron al mismo mAb, se los denominó anticuerpos homólogos. Alternativamente, cuando se trató de mAbs diferentes se los denominó anticuerpos heterólogos.

En la Fig. 15 se muestran dos ejemplos típicos de ensayos de competición en los que se evaluó el comportamiento de los distintos mAbs del panel como anticuerpos competidores frente a dos mAbs biotinilados (en este caso CA8B7 y CB29D3). En esta figura se ejemplifican algunas de las variantes observadas en los ensayos de competición. Por un lado, cuando se utilizó el mAb CA8B7 biotinilado, sólo dos de los mAbs no biotinilados (su homólogo y CA24D5) mostraron competición total dependiendo de la dosis de mAb competidor utilizado. Los restantes mAbs del panel no compitieron con el mAb CA8B7 biotinilado, utilizando incluso elevadas concentraciones de mAb competidor. Sin embargo, algunos anticuerpos (CA1A3, CA2G7, CA5E6, CB15D7, CB27H2, CB29D3 y CB33B3) exhibieron señales espectrofotométricas superiores con respecto a la señal generada por el mAb biotinilado en ausencia de mAb competidor, la cual fue considerada como 100% de interacción.

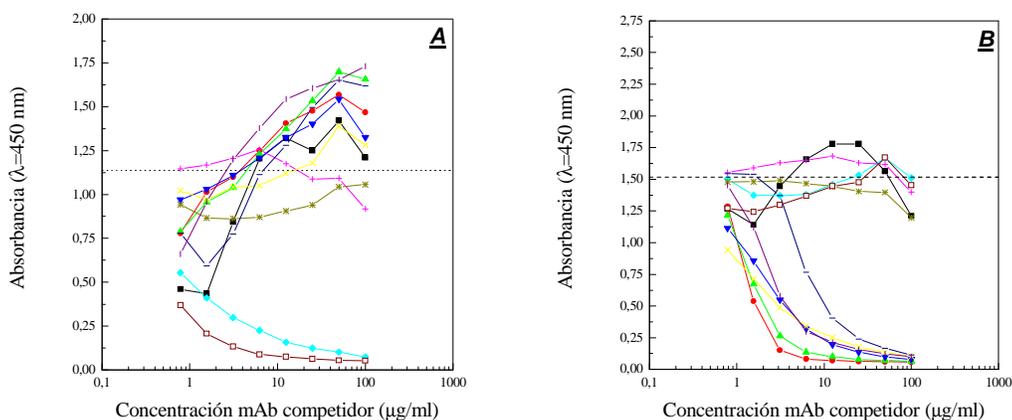


Fig. 15: ELISA de competición para el mapeo de epítopes del rhIFN- α 2b.

Se ejemplifica el sistema empleado mostrando los resultados correspondientes a los mAbs biotinilados:

A- CA8B7

B- CB29D3

La línea de puntos indica la interacción del anticuerpo biotinilado en ausencia de mAbs competidores.

mAb no biotinilados: (■) mAb CA1A3, (●) mAb CB27H2, (▲) mAb CB15D7, (▼) mAb CB29D3, (◆) mAb CB24D5, (+) mAb CB13A7, (x) mAb CB33B3, (*) mAb CA9C3, (□) mAb CA2G7, (□) mAb CA5E6, (□) mAb CA8B7.

Por otro lado, cuando se utilizó el mAb CB29D3 biotinilado, seis mAbs no biotinilados (su homólogo, CA2G7, CA5E6, CB15D7, CB27H2 y CB33B3) evidenciaron competición total por la interacción con el rhIFN- α 2b. Los restantes mAbs no compitieron frente a este anticuerpo biotinilado.

Con el objeto de analizar comparativamente la capacidad de competición de cada mAb con los restantes anticuerpos del panel, se determinó el porcentaje de interacción del anticuerpo biotinilado con la citoquina adsorbida en fase sólida en presencia de la máxima concentración de anticuerpo competidor no biotinilado ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Interacción (\%)} = [(A - N) / (A_0 - N)] \cdot 100 \quad (22)$$

Donde A, A_0 y N representan lecturas espectrofotométricas de absorbancia a $\lambda = 450 \text{ nm}$ correspondientes a la presencia de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de mAb competidor (A), ausencia del mismo (B) y al control negativo del ensayo (N).

La Fig. 16 resume los resultados de los ensayos de competición en una representación gráfica que permite comparar en forma recíproca la habilidad de cada mAb para inhibir la interacción de los restantes anticuerpos con el rhIFN- α 2b. Cada anticuerpo no biotinilado, en condiciones saturantes ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), inhibió completamente la interacción de su homólogo biotinilado con la citoquina, mientras que la comparación de las contrapartes heterólogas definió diferentes patrones de competición: competición total (0-20% de interacción del anticuerpo biotinilado), competición parcial (21-80% de interacción) y ausencia de competición (más del 80% de interacción).

En dicha figura se observa la variante de competición cruzada parcial entre diversos pares de mAbs. Por ejemplo, cuando se empleó el mAb CB33B3 biotinilado, tanto su homólogo como los heterólogos CA2G7 y CA5E6 compitieron inhibiendo completamente la asociación del rhIFN- α 2b con el mAb biotinilado. Sin embargo, cuando se utilizó el mAb CA2G7 biotinilado o el mAb CA5E6 biotinilado, sus homólogos y el mAb CB33B3 no compitieron de igual manera, exhibiendo este último menor capacidad de inhibición. El mAb CB29D3 evidenció el mismo comportamiento que el mAb CB33B3, dado que su homólogo no biotinilado sólo compitió parcialmente con los mAbs CA2G7 y CA5E6 biotinilados, mientras que cuando se lo utilizó biotinilado su asociación con el rhIFN- α 2b fue completamente inhibida tanto por su homólogo como por los heterólogos CA2G7 y CA5E6. Algo similar ocurrió cuando se realizaron los ensayos de competición entre los mAbs CB29D3 y CB15D7, y el mAb CA1A3. En este caso, los anticuerpos CB29D3 y CB15D7

mostraron ausencia de competición con el mAb CA1A3 biotinilado, mientras que el homólogo no biotinilado del mAb CA1A3 inhibió parcialmente la interacción de los mAbs CB29D3 y CB15D7 biotinilados con la citoquina.

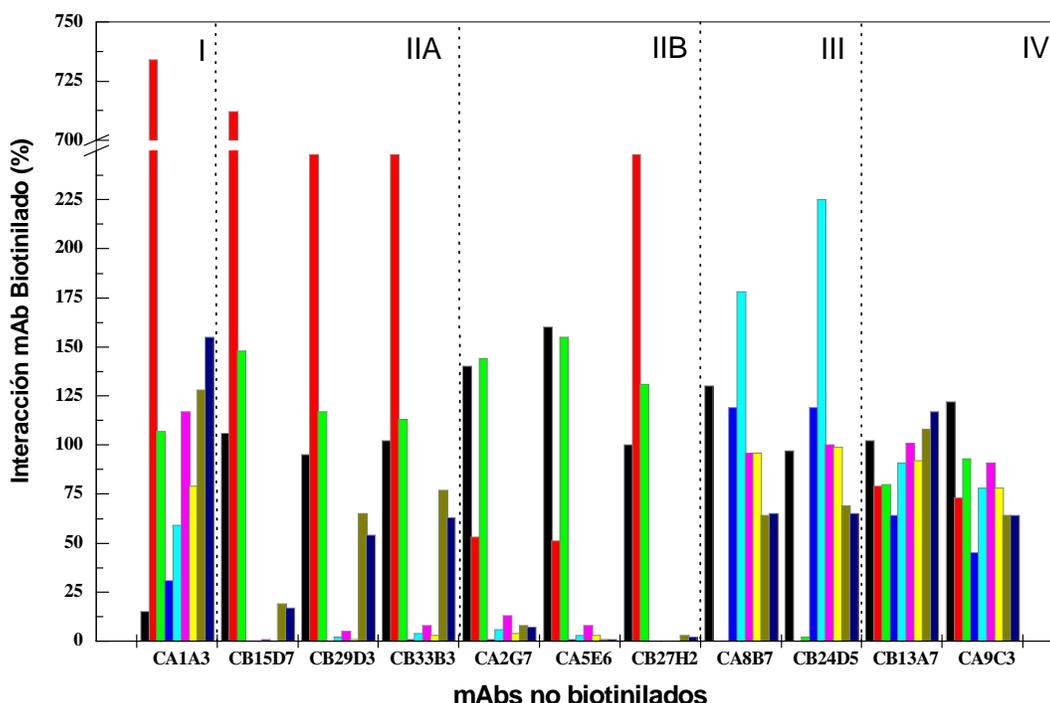


Fig. 16: Comparación recíproca de los ensayos de competición entre los mAbs del panel.

En eje de ordenadas se graficó la interacción porcentual del mAb biotinilado con la citoquina inmovilizada en fase sólida en presencia de la máxima concentración de anticuerpo competidor. En eje de abscisas se indican los mAbs no biotinilados empleados como anticuerpos competidores. Los números romanos y letras indican las regiones de la citoquina mapeadas por los distintos mAbs.

mAbs biotinilados: (●) mAb CA1A3, (●) mAb CB27H2, (●) mAb CB15D7, (●) mAb CB29D3, (●) mAb CB24D5, (●) mAb CB33B3, (●) mAb CA2G7, (●) mAb CA5E6, (●) mAb CA8B7.

Este tipo de competición cruzada parcial fue observado por diferentes autores que emplearon ensayos similares para el análisis de la especificidad de epitopes de un dado antígeno (Tzartos, 1996; Kuroki, 1996; Meulenberg, 1998). Estos autores observaron comportamientos francamente no recíprocos entre pares de mAbs. La presencia de competición cruzada no recíproca genera información de compleja interpretación. Dicho efecto puede explicarse por diferencias importantes en las afinidades de los mAbs, o por la inducción de cambios conformacionales como consecuencia de la unión de uno de los anticuerpos al antígeno, lo que afecta la interacción del segundo anticuerpo, o bien un impedimento estérico que se observa en un sentido pero no en el inverso.

Analizando otro aspecto del ensayo de competición, se observó que algunos mAbs competidores heterólogos incrementaron la señal espectrofotométrica de la interacción del rhIFN- α 2b con el mAb biotinilado a valores superiores al 100% correspondiente a dicha interacción en ausencia de mAb competidor. Este efecto se denominó efecto cooperativo o mejorador (cuando la asociación del antígeno con el anticuerpo biotinilado en presencia del anticuerpo competidor superó un valor del 120% de interacción con la citoquina). Como puede apreciarse en la Fig. 11, es notable el efecto cooperativo que ejercieron los mAbs CA1A3, CB15D7, CB27H2, CB29D3 y CB33B3 hacia la unión del mAb CB24D5 biotinilado con la citoquina, ya que en todos los casos la interacción fue superior al 350%.

Diversos autores, estudiando las interacciones entre mAbs, encontraron que ocasionalmente la unión de un antígeno soluble a un mAb incrementa su unión a un segundo mAb. Este efecto ha sido denominado mejoramiento y en la literatura se han descrito dos modelos generales para explicarlo (Ehrlich y col., 1982; Holmes y Parham, 1983; Diamond y col., 1984). En nuestro laboratorio fenómenos similares fueron observados cuando se llevó a cabo el mapeo de epitopes de eritropoyetina humana recombinante y rhGM-CSF (Zenclussen y col., 2002; Oggero y col., 2003).

Independientemente de la observación del efecto cooperativo, para que el mismo ocurra es necesario que cada uno de los miembros del par de mAbs reconozca diferentes epitopes del antígeno. De esta manera, se consideró que los mAbs involucrados en esta clase particular de interacción reconocerían epitopes diferentes.

Teniendo en cuenta la capacidad de competición cruzada total, parcial o la ausencia de la misma y, por otro lado, la propiedad cooperativa o mejoradora de determinados anticuerpos, se definieron los perfiles de competición mostrados en la Fig. 16. La agrupación de los mencionados patrones de competición en función de sus similitudes permitió delinear 5 áreas de la molécula de rhIFN- α 2b, mapeadas por los 11 mAbs constituyentes del panel.

De esta manera, se definió el área I mapeada solamente por el mAb CA1A3; el área II reconocida por los mAbs CA2G7, CA5E6, CB15D7, CB27H2, CB29D3 y CB33B3; la región III identificada por los mAbs CA8B7 y CB24D5 y la región IV mapeada por los mAbs CA9C3 y CB13A7. Si bien no fue posible el estudio recíproco con respecto a estos últimos mAbs biotinilados, sus homólogos no biotinilados no compitieron prácticamente con ninguno de los restantes mAbs. De esta manera, dichos anticuerpos reconocerían áreas distintas de

aquéllas mapeadas por las otras inmunoglobulinas, proponiéndose una cuarta región identificada por CA9C3 y CB13A7. Por otro lado, los mAbs que mapearon la región II demostraron pequeñas diferencias en sus perfiles competitivos, lo que indicaría el reconocimiento de distintos epítopes situados en un área molecular común. Estas variaciones permitieron subdividir la región II en dos áreas: IIA (mapeada por CB15D7, CB29D3 y CB33B3) y IIB (mapeada por CA2G7, CA5E6 y CB27H2).

4. Selección de mAbs adecuados para desarrollar métodos inmunoquímicos útiles para la detección y cuantificación de rhIFN- α 2b

4.1. Detección de rhIFN- α 2b mediante técnica de *Dot-Blot*

Se desarrolló un *Dot-Blot* para la detección y valoración semi-cuantitativa de rhIFN- α 2b. En la Fig. 17 se esquematizan los resultados para los distintos mAbs empleando dos medios diluyentes diferentes.

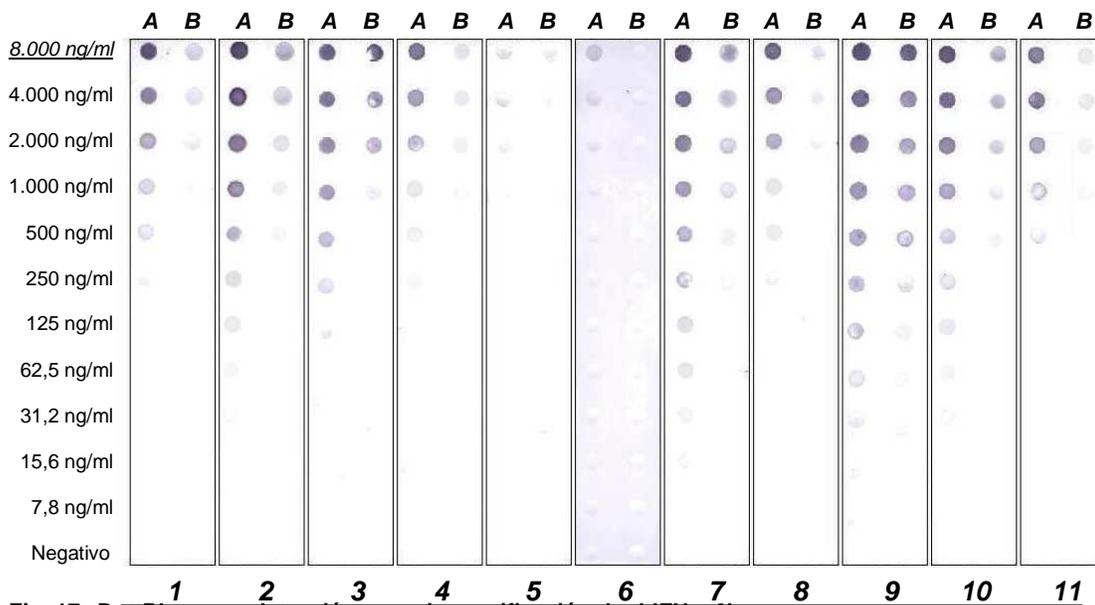


Fig. 17: *Dot-Blot* para detección y semi-cuantificación de rhIFN- α 2b.

Las diluciones de IFN- α 2b fueron realizadas en TBS (A) y en medio de cultivo para células de mamífero (B). Los mAbs utilizados se indican en la parte inferior del gráfico: (1) mAb CA1A3, (2) mAb CA2G7, (3) mAb CA5E6, (4) mAb CA8B7, (5) mAb CA9C3, (6) mAb CB13A7, (7) mAb CB15D7, (8) mAb CB24D5, (9) mAb CB27H2, (10) mAb CB29D3, (11) mAb CB33B3.

Los controles negativos no mostraron señal alguna, tanto para el caso de TBS como el medio de cultivo suplementado con SFB (MC). Como se observa en la Fig. 17 el mAb

CB13A7 presentó una señal de fondo más intensa, probablemente debida a la interacción inespecífica entre el mAb y el agente bloqueante, lo que interfiere con la visualización de la curva del estándar.

El límite de detección del ensayo se determinó considerando la mínima concentración de citoquina detectada en comparación con su correspondiente control negativo (Tabla VI).

Tabla VI: Límite de detección del ensayo de Dot-Blot desarrollado para rhIFN- α 2b.

mAb	Limite de detección (ng.ml ⁻¹)	
	TBS	MC
CA1A3	63	1.000
CA2G7	31	500
CA5E6	125	1.000
CA8B7	125	1.000
CA9C3	2.000	4.000
CB13A7	1.000	-
CB15D7	8	63
CB24D5	62	1.000
CB27H2	8	32
CB29D3	32	250
CB33B3	250	500

El ensayo de *Dot-Blot* mostró límites de detección diferentes dependiendo del anticuerpo y del medio diluyente empleado. Al utilizar TBS como medio diluyente se evidenció mayor capacidad de detección en todos los casos analizados, con respecto al alcanzado en los ensayos llevados a cabo diluyendo la citoquina con MC. Este comportamiento se fundamenta en la presencia de proteínas en el medio de cultivo que compiten con el rhIFN- α 2b por la unión a la nitrocelulosa, alcanzándose rápidamente la capacidad de saturación del papel (80-100 μ g.cm⁻²). Por lo tanto, es muy importante tener en cuenta la influencia del medio de dilución cuando se desea emplear este ensayo para la semi-cuantificación de muestras que contienen un entorno proteico diferente al de la proteína empleada como estándar.

De los anticuerpos analizados, el mAb CB27H2 mostró la mayor capacidad de detección empleando TBS o MC como diluyentes. El mAb CB15D7 exhibió también límites de detección adecuados en los dos diluyentes ensayados.

4.2. ELISA *sandwich* heterogéneo para la cuantificación de rhIFN- α 2b

En todo desarrollo de un proceso que involucra la producción de una proteína recombinante, es necesario contar con métodos precisos y de alta sensibilidad que permitan detectar y cuantificar la misma en diferentes muestras. Los enzimoimmunoensayos (*enzyme-linked immunosorbent assays, ELISAs*) poseen la propiedad de ser altamente específicos, debido al uso de anticuerpos, y sensibles, debido al empleo de enzimas que resultan eficaces para amplificar la señal generada por el analito. Además, la metodología es simple, rápida y requiere poco equipamiento.

Con el objeto de disponer en el laboratorio de un sistema útil para la cuantificación de rhIFN- α 2b durante las distintas etapas involucradas en el proceso de su obtención, se evaluó un sistema de ELISA *sandwich* heterogéneo. El mismo se basó en la captura del antígeno mediante el empleo de un determinado mAb y el posterior reconocimiento del antígeno capturado mediante anticuerpos policlonales específicos obtenidos en conejo (desarrollados previamente en nuestro laboratorio). Finalmente, estos anticuerpos fueron detectados empleando un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa.

En la puesta a punto del ensayo se evaluó la capacidad de cada mAb para ser empleado como anticuerpo de captura del antígeno. En la Fig. 18 se muestran las curvas dosis-respuesta correspondientes a cada mAb, empleando un rango de concentraciones de rhIFN- α 2b comprendido entre 0,098 ng.ml⁻¹ y 50 ng.ml⁻¹ para un grupo de mAbs (A), y entre 0,98 ng.ml⁻¹ y 1.000 ng.ml⁻¹ para otro grupo de anticuerpos (B).

La mayoría de los mAbs mostraron capacidad de reconocimiento de la citoquina soluble con diferentes grados de captación. Solamente tres anticuerpos del panel demostraron una muy débil (CA8B7) o nula (CB13A7 y CB24D5) habilidad para capturar la citoquina. Si bien las constantes de afinidad calculadas para cada mAb son elevadas para la molécula nativa (K_A que oscilaron entre 10⁷ y 10¹⁰ M⁻¹), la conducta del anticuerpo puede

modificarse cuando se encuentra inmovilizado en una fase sólida. Por esta razón, la falta de respuesta cuando se utilizan los mAbs CB13A7, CB24D5 y CA8B7 como anticuerpos de captura podría estar relacionada con factores intrínsecos del mAb, como por ejemplo la existencia de regiones hidrofóbicas en la región Fab que favorecen su interacción con el material plástico disminuyendo la densidad de sitios potenciales para la unión con el antígeno.

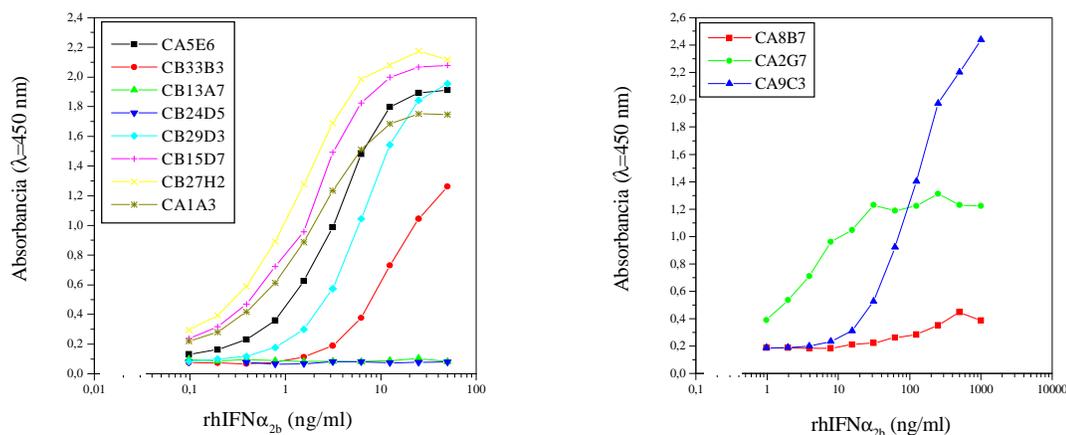


Fig. 18: ELISA sandwich heterogéneo para la cuantificación de rhIFN- α 2b.

En eje de ordenadas se representó la respuesta del ensayo medida como la absorbancia a $\lambda=450$ nm en función de la concentración de antígeno empleado (graficado en eje de abscisas). El mismo ensayo se llevó a cabo empleando los diferentes mAbs.

Con el fin de comprobar la utilidad de los diferentes mAbs como anticuerpos de captura se calcularon algunos parámetros analíticos para cada caso (Tabla VII). El límite de detección se definió como la mínima concentración de rhIFN- α 2b cuyo valor de absorbancia superó al correspondiente valor de absorbancia del promedio de los controles negativos más 3 D.S. La sensibilidad del ensayo se calculó como la pendiente de la curva en su rango de linealidad.

El límite inferior y superior de detección de este ensayo fue de $0,01 \text{ ng.ml}^{-1}$ y $7,80 \text{ ng.ml}^{-1}$ respectivamente, mientras que el rango de sensibilidad osciló entre $0,57 \text{ ml.ng}^{-1}$ y $1,35 \text{ ml.ng}^{-1}$ dependiendo del mAb utilizado como anticuerpo de captura. La mayor sensibilidad se obtuvo empleando los mAbs CB29D3, CA5E6, CB27H2, CB15D7 y CA1A3, mientras que la mayor detectabilidad se logró empleando los mAbs CA1A3, CA5E6, CB15D7, CB27H2 y CB29D3. De esta manera, se cuenta con un grupo de anticuerpos

adecuados para el diseño de ELISA sensible y con elevada capacidad de detección de la citoquina.

Tabla VII: Límite de detección, sensibilidad y rango de linealidad del ELISA *sandwich*.

mAb	Límite de detección (ng.ml ⁻¹)	Sensibilidad (ml.ng ⁻¹)	Rango lineal (ng.ml ⁻¹)
CA1A3	0,10	1,00	0,78 - 6,25
CA2G7	< 1,00	0,57	0,98 - 31,25
CA5E6	0,10	1,24	0,78 - 12,50
CA8B7*	-	-	
CA9C3	7,80	0,83	31,25 - 250,00
CB13A7*	-	-	
CB15D7	0,10	1,16	0,39 - 6,25
CB24D5*	-	-	
CB27H2	0,20	1,19	0,39 - 6,25
CB29D3	0,39	1,35	1,56 - 25,00
CB33B3	1.56	0,97	3,12 - 50,00

* No exhibieron capacidad de reconocimiento de la citoquina soluble.

Trabajos posteriores de nuestro laboratorio permitieron seleccionar 4 mAbs que reconocen áreas moleculares diferentes de la citoquina no glicosilada (CA1A3, CB15D7, CA5E6 y CA9C3) con el fin de disponer de sistemas adecuados para cuantificar nuevas variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b (Ceaglio y col., 2008). Dichas variantes se obtuvieron mediante la introducción de sitios consenso de N-glicosilación en la secuencia de la proteína empleando mutagénesis sitio-dirigida. El panel de mAbs permitió seleccionar anticuerpos capaces de reconocer epitopes de las variantes glicosiladas de IFN que no fueron modificados por la presencia de carbohidratos y que mostraron, por lo tanto, la misma afinidad por sus epitopes homólogos presentes en la citoquina no glicosilada (estándar de cuantificación). Es decir, se seleccionaron mAbs que reconocieran epitopes cuya identidad inmunoquímica se conserva luego de la glicosilación. Así, fue posible diseñar un sistema de cuantificación que demostró la misma respuesta frente a concentraciones similares de analito o sustancia de referencia (utilizando el mAb CA5E6).

5. Neutralización de la actividad biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b en presencia de los mAbs

Los ensayos utilizados para evaluar la actividad biológica antiviral *in vitro* de los IFNs fueron desarrollados previamente en nuestro laboratorio, basándose en la cuantificación del efecto protector de la citoquina sobre células susceptibles a la acción citopática producida por una infección viral (Familetti y col., 1981; Rubistein y col., 1981). Con el objetivo de seleccionar la concentración óptima de rhIFN- α 2b e IFN- β a ser utilizada en los ensayos de neutralización, sucesivas diluciones de cada citoquina (desde 20 UI.ml⁻¹ hasta 0,156 UI.ml⁻¹ para el rhIFN- α 2b y desde 48 UI.ml⁻¹ hasta 0,375 UI.ml⁻¹ para el IFN- β) fueron incubadas durante 6 h o 2 h con células MDBK o células WISH, respectivamente, agregándose luego el virus VSV. La Fig. 19 muestra las curvas dosis-respuesta del ensayo desarrollado para valorar la actividad biológica de ambas citoquinas

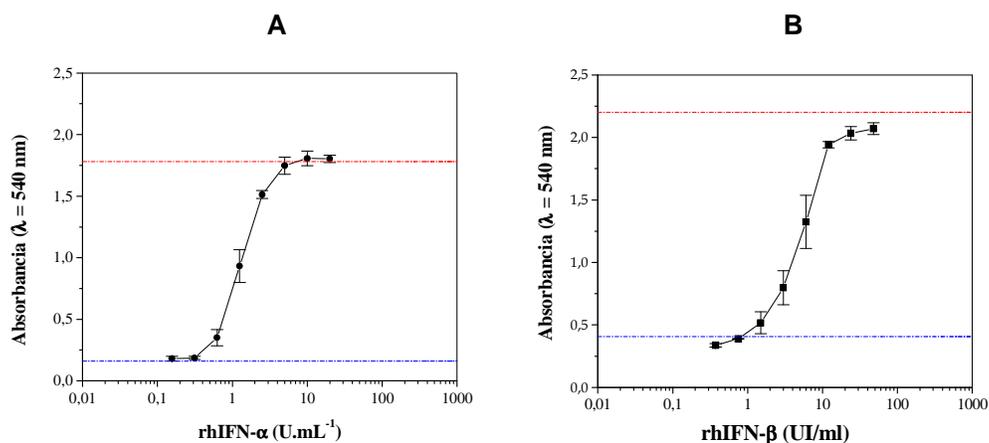


Fig. 19: Valoración de la actividad biológica antiviral *in vitro* de IFNs.

La actividad biológica fue evaluada mediante la inhibición del efecto citopático producido por el VSV sobre las líneas celulares MDBK (rhIFN- α 2b, Fig. 19A) y WISH (rhIFN- β , Fig. 19B). La línea horizontal roja indica el valor promedio de absorbancia correspondiente al control de crecimiento celular en ausencia de virus e IFN. La línea horizontal azul indica el valor promedio de absorbancia del control de máximo efecto citopático producido en ausencia de IFN. Las barras de error indican las D.S. de las determinaciones realizadas por triplicado.

Con el objetivo de llevar a cabo ensayos de neutralización de la actividad biológica de ambas citoquinas en presencia de los mAbs, se seleccionó la concentración de citoquina que fue capaz de generar aproximadamente un 50% del máximo efecto protector producido por cada IFN. Adicionalmente, estos ensayos fueron desarrollados para analizar la probable

reactividad cruzada de los mAbs con IFN- β , dado que presenta un 30% de homología con IFN- α 2b y comparten el mismo receptor celular.

La habilidad de los anticuerpos para neutralizar la actividad biológica anti-viral *in vitro* de los IFNs se analizó comparando el efecto protector (frente a una infección con VSV) que dichas citoquinas ejercen sobre las células MDBK o WISH incubadas en presencia y ausencia de cada mAb. Previamente, se incubaron diluciones sucesivas de cada mAb purificado con una concentración constante de rhIFN- α 2b (2 UI.ml⁻¹) o de rhIFN- β (4,5 UI.ml⁻¹). Se adicionó el inóculo de las correspondientes células incubándose durante 6 o 2 horas, respectivamente. Luego de la incubación, se agregó una suspensión adecuada de VSV, incubándose nuevamente durante 20 horas. Finalmente, se evaluó la incorporación del colorante cristal violeta a las células viables. Para analizar la inhibición producida por acción de los mAbs, se calculó la actividad antiviral porcentual con respecto al máximo efecto protector (actividad máxima) ejercido por ambas citoquinas en ausencia de mAbs. La determinación del porcentaje de actividad antiviral en presencia de sucesivas diluciones de cada mAb fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad anti-viral (\%)} = [(A - C) / (B - D)] \cdot 100 \quad (23)$$

Donde A, B, C y D corresponden a mediciones de absorbancias ($\lambda=540$ nm) representando: A, proliferación celular observada en presencia de diferentes concentraciones de un dado mAb; B, máxima protección del IFN en ausencia de mAb; C, efecto citopático en ausencia de citoquina y presencia de mAb, y D, efecto citopático en ausencia de citoquina y mAb. El control de efecto citopático en ausencia de IFN y presencia de mAb fue ensayado para cada concentración de anticuerpo.

La Fig. 20A muestra el efecto neutralizante o no neutralizante de los mAbs del panel con respecto a la actividad antiviral del rhIFN- α 2b, evidenciándose un aumento de tal actividad (efecto protector de la citoquina) a medida que decrece la concentración del anticuerpo neutralizante. Por otro lado, ninguno de los anticuerpos del panel fue capaz de neutralizar la actividad biológica antiviral del rhIFN- β (Fig. 20B). De esta manera, se confirma la ausencia de reactividad cruzada por parte de los anticuerpos del panel (analizada desde el punto de vista de la neutralización de la actividad antiviral) y,

simultáneamente, se confirma la especificidad de los mismos hacia el rhIFN- α 2b. Esto se correlaciona directamente con datos bibliográficos que establecen que, si bien el IFN- α 2 es el subtipo de IFN- α estructuralmente más relacionado con el IFN- β , ambas citoquinas muestran sólo un 33% de homología en sus secuencias de aminoácidos y son antigénicamente distintas (Kontsek, 1994).

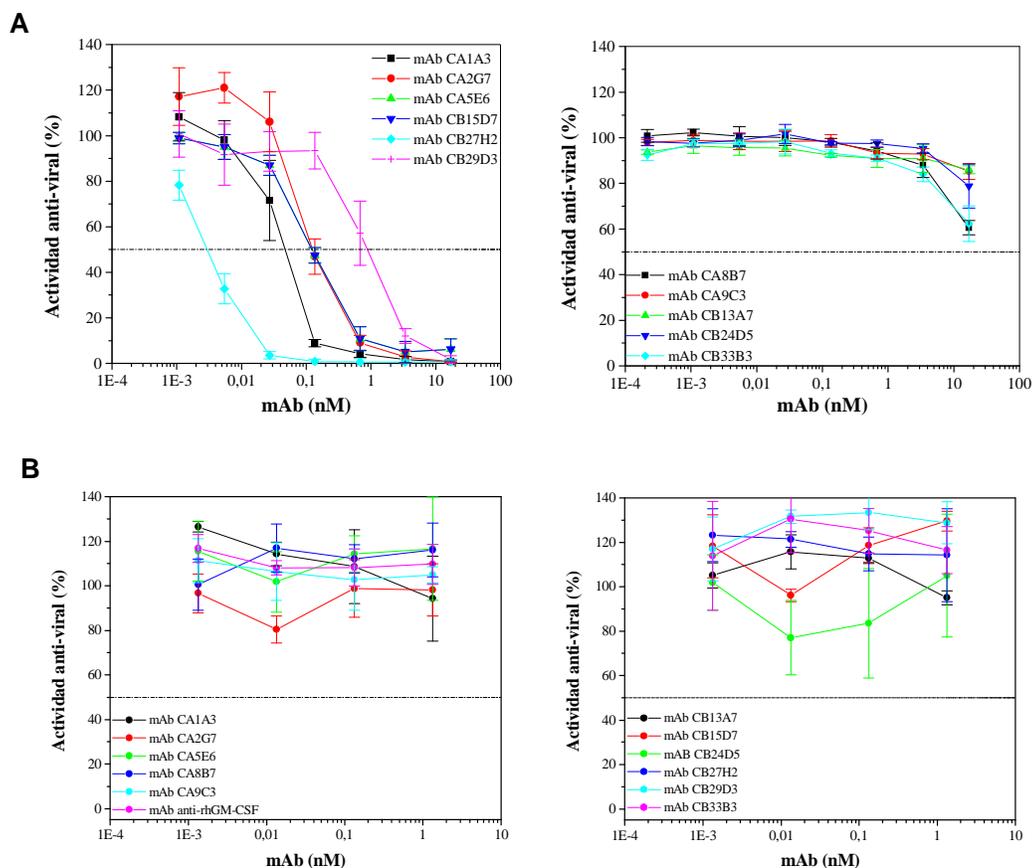


Fig. 20: Neutralización de la actividad biológica antiviral *in vitro* de los IFNs por acción de mAbs.

En eje de ordenadas se representó el porcentaje de actividad antiviral de los IFNs en presencia de los mAbs, en función de concentraciones crecientes del anticuerpo correspondiente (eje de abscisas). Las barras de error indican las D.S. de las determinaciones realizadas por triplicado. Se evaluó la actividad neutralizante en presencia de: **(A)** rhIFN- α 2b y **(B)** rhIFN- β . La línea horizontal indica el 50% de la máxima actividad biológica anti-viral *in vitro* de los IFNs en presencia de 2 UI.ml⁻¹ de rhIFN- α 2b o 4,5 UI.ml⁻¹ de IFN- β .

Teniendo en cuenta la máxima concentración de mAb ensayada, se calculó el porcentaje de la actividad biológica antiviral del rhIFN- α 2b en presencia de cada anticuerpo

(Fig. 21). De esta manera, fue posible clasificar a los anticuerpos del panel en dos grupos, mAbs neutralizantes y no neutralizantes de la actividad anti-viral de la citoquina.

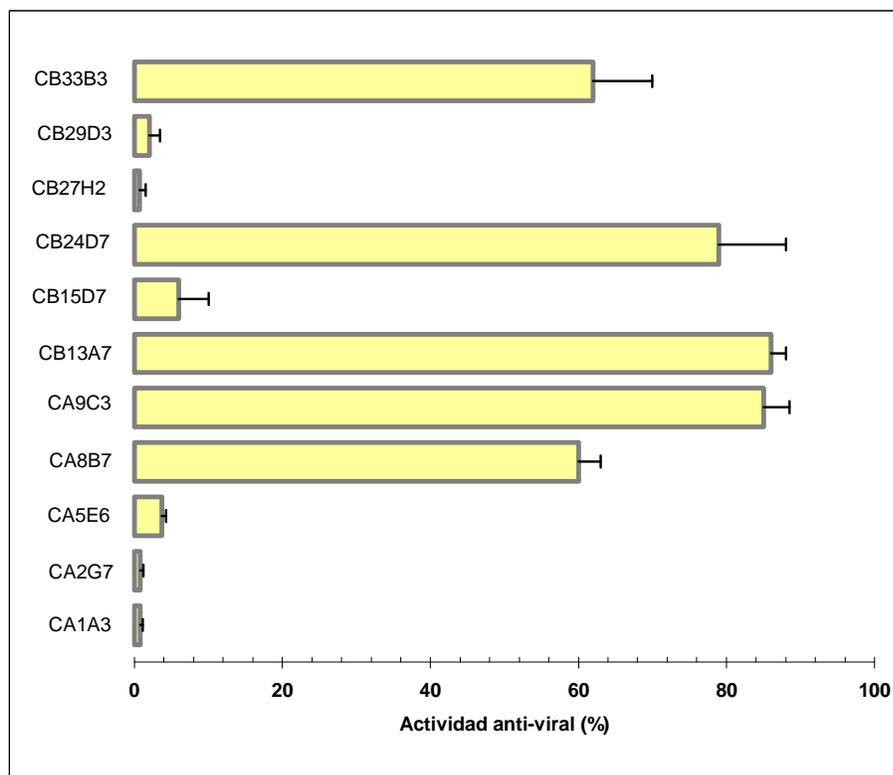


Fig. 21: Actividad antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b en presencia de los mAbs.

Se representó el porcentaje de actividad antiviral desarrollada por el rhIFN- α 2b en presencia de la máxima concentración de cada mAb ensayado. Las barras de error indican las D.S. de las determinaciones realizadas por triplicado.

En la Fig. 21 se observa el efecto neutralizante de los mAbs CA1A3, CA5E6, CB15D7, CB27H2, CA2G7 y CB29D3, en tanto que los restantes anticuerpos fueron considerados como mAbs no neutralizantes de la actividad antiviral del rhIFN- α 2b.

Definiendo la capacidad neutralizante como la concentración de mAb necesaria para producir el 50% de neutralización de la actividad biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b, se calculó la concentración de cada anticuerpo necesaria para producir dicho efecto. Los resultados se resumen en la Tabla VIII.

El mAb con mayor capacidad neutralizante de la actividad biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b fue el mAb CB27H2. Los mAbs CA1A3, CB15D7, CA2G7, CA5E6 y CB29D3 neutralizaron en diferente medida la actividad antiviral del rhIFN- α 2b, observándose en general un mayor grado de neutralización cuando la afinidad de los mAbs es mayor.

Tabla VIII: Capacidad neutralizante de los mAbs.

mAb	Capacidad neutralizante (pM)
CB27H2	3,0 \pm 1,0
CA1A3	45 \pm 13
CB15D7	120 \pm 10
CA2G7	126 \pm 30
CA5E6	130 \pm 60
CB29D3	873 \pm 200

Los resultados se expresan como promedio de las determinaciones \pm D.S. (n=3)

6. Obtención de fragmentos scFv a partir de hibridomas productores de mAbs

6.1. Extracción del ARN total a partir de hibridomas en cultivo

Teniendo en cuenta la habilidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* del IFN- α 2b, la capacidad para mapear diferentes áreas moleculares de la citoquina y el valor de sus constantes de afinidad, los mAbs CA1A3, CA5E6, CB15D7 y CB27H2 fueron seleccionados para la preparación de fragmentos recombinantes scFv.

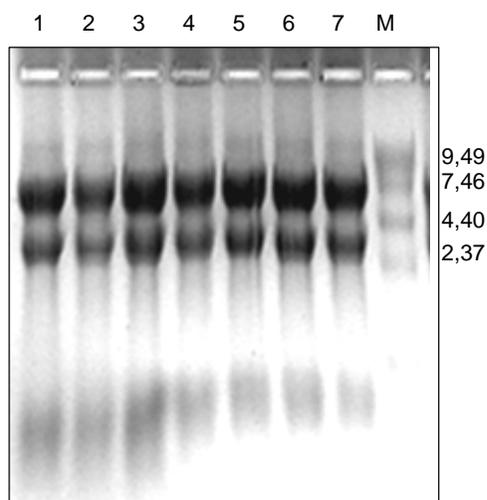
Los hibridomas se cultivaron en frascos *spinner* utilizando medio D-MEM suplementado con 10% (v/v) de SFB y se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial (viabilidad superior al 90%) para realizar la extracción de ARN total utilizando el reactivo TRIZOL[®]. Luego de la extracción y purificación, el ARN total correspondiente a cada clon se resuspendió en 50 μ l de agua estéril y se determinó su concentración y grado de pureza a partir de la medida de absorbancia a $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 280$ nm (Tabla IX). Con excepción del clon CA5E6, los restantes hibridomas fueron procesados por duplicado. Se obtuvieron concentraciones en un rango de 7,6 μ g.ml⁻¹ a 12,7 μ g.ml⁻¹, consideradas adecuadas para las siguientes etapas del proceso, mientras que en todos los casos la relación R resultó superior a 2, indicando ausencia de contaminantes proteicos.

Tabla IX: Purificación de ARN total a partir de hibridomas.

Muestra	Abs. (260 nm)	Abs. (280 nm)	R*	ARN total ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
Agua estéril	0,173	0,157	-	-
CA5E6	1,760	0,871	2,220	12,7
CA1A3-A	1,114	0,582	2,214	7,5
CB27H2-A	0,773	0,425	2,239	4,8
CB15D7-A	1,304	0,658	2,257	9,1
CA1A3-B	1,408	0,709	2,245	9,9
CB27H2-B	0,709	0,397	2,233	4,3
CB15D7-B	1,128	0,582	2,470	7,6

*R: Abs. (260 nm) / Abs. (280 nm)

La integridad del ARN total purificado se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. En la Fig. 22 se observan claramente las bandas correspondientes a las subunidades menor (18 S) y mayor (28 S) intactas del ARN ribosomal, con una relación de intensidades aproximada de 1:2, respectivamente. Estos indicadores confirman la ausencia de degradación del ARN total en todas las muestras ensayadas.

**Fig. 22: Verificación de la integridad del ARN total purificado mediante electroforesis en geles de agarosa**

Para analizar la calidad del ARN total se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en condiciones desnaturalizantes.

Carriles: (1) CA1A3-A, (2) CA1A3-B, (3) CA5E6, (4) CB15D7-A, (5) CB15D7-B, (6) CB27H2-A, (7) CB27H2-B y (M) Marcadores de tamaño molecular de ARN (kb).

6.2. Obtención del ADN codificante para las cadenas V_H y V_L

A partir del ARN total obtenido en la etapa anterior se procedió a la purificación de ARNm mediante el empleo de una matriz comercial de oligo(dT)-celulosa.

El ARNm puro fue utilizado para la síntesis de la primera cadena de ADNc empleando los hexanucleótidos pd(N)₆ de secuencia al azar. El uso de estos hexámeros elimina la necesidad de *primers* específicos para inmunoglobulinas. Por otro lado, este sistema resulta más eficiente que los *primers* oligo(dT) genéricos en la obtención de ADNc con la extensión suficiente como para posibilitar el clonado de las regiones variables de los genes de las cadenas pesada y liviana.

El sistema RPAS está diseñado para amplificar las cadenas V_H y V_L por separado, mediante la utilización de conjuntos de *primers* parcialmente degenerados específicos para cada cadena. Debido a que el isotipo λ de cadena liviana representa sólo el 5% del total de las cadenas livianas murinas, la información de su secuencia es insuficiente para diseñar *primers* consenso y por lo tanto no están representados en el conjunto de oligonucleótidos provisto. En este hecho radica la importancia de la determinación del isotipo de la cadena liviana de los mAbs obtenidos. En este trabajo, la totalidad de los clones de hibridomas expresó mAbs con cadena liviana κ (ver Tabla III), resultando por lo tanto factibles de amplificación mediante el sistema escogido.

Mediante la PCR primaria fue posible amplificar los ADNc correspondientes a las cadenas V_H y V_L de los cuatro mAbs ensayados. En la Fig. 23 se muestra, a manera de ejemplo, un gel de agarosa conteniendo los productos amplificados a partir del ARNm extraído del clon CB27H2 cuyos tamaños coincidieron con el esperado para la cadena V_H (banda de ~340 pb) y para la cadena V_L (banda de ~325 pb).

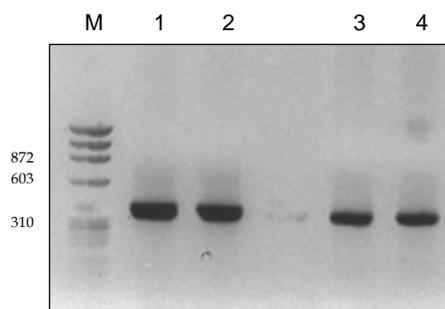


Fig. 23: Amplificación de las cadenas V_H (~340 pb) y V_L (~325 pb) correspondientes al mAb CB27H2.

En un gel de agarosa al 1,5% (p/v) se sembró todo el volumen correspondiente a cada reacción de amplificación llevada a cabo por duplicado para la purificación posterior de cada cadena.

Carriles: (M) marcador de tamaño molecular Φ (pb), (1 – 2) cadena V_H, (3 – 4) cadena V_L.

Como se observa en la Fig. 23, la cantidad de producto V_H obtenida resultó superior a la correspondiente al producto V_L. Este efecto, que se repitió en las amplificaciones de las cadenas de los cuatro mAbs ensayados, está descrito por varios autores que utilizaron el sistema RPAS para la obtención de fragmentos scFv a partir de hibridomas secretores de mAbs específicos. Inclusive, existen varios ejemplos documentados donde fue imposible amplificar la región variable de la cadena liviana (isotipo κ) mediante el uso de los *primers* suministrados por el *kit*, adjudicándose el problema a la posible falta de representación de varias secuencias necesarias en la mezcla de oligonucleótidos degenerados (Krebbber y col., 1997).

Los productos de PCR correspondientes a las regiones variables fueron purificados a partir del gel de agarosa y ligados al plásmido pGEM[®]-T easy. Dicho plásmido ofrece una estrategia de clonado altamente eficiente y una rápida evaluación de colonias azules y blancas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α F'lp, las cuales crecieron en placas con medio LB suplementado con ampicilina, X gal e IPTG. El análisis de las colonias transformadas se llevó a cabo por digestión con enzimas de restricción. Posteriormente, se seleccionaron 10 clones de cada cadena y se realizó el secuenciamiento automático del ADN plasmídico.

Las cadenas V_H y V_L derivadas de los mAbs CA5E6, CB15D7 y CB27H2 presentaron secuencias aminoácidas similares a las encontradas en las regiones variables murinas cuando se las comparó en la base de datos IgBLAST (NCBI, *National Center for*

Biotechnology Information). Por otro lado, el producto correspondiente a la región variable de la cadena pesada del mAb CA1A3 mostró elevada homología (97,5%) con un cadena V_H aberrante no funcional (número de acceso bases de datos D50398, publicada por Yamanaka y col., 1995). Esta cadena pesada presenta un rearrreglo aberrante en el sitio de recombinación DJ en el CDR3 que genera un corrimiento del marco de lectura y, por lo tanto, contiene varios aminoácidos en el FR4 que se desvían de las secuencias consenso de los anticuerpos murinos. En la Fig. 24 se muestra la secuencia aminoacídica de dicha cadena.

EVQLKESGPGGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNSALKSRLSISKDNSK
 SQVFLKMNSLQTTDDTAMYYCAREPPTYV*CLLGPRDHGHR*

Fig. 24: Secuencia aminoacídica de la cadena V_H aberrante.

La secuencia correspondiente a la región variable de la cadena pesada del mAb CA1A3 resultó idéntica (salvo un aminoácido N-terminal) a una secuencia aberrante descrita por varios autores. Las regiones CDR aparecen subrayadas. El FR4, que presenta una secuencia diferente a la consenso debido a un corrimiento del marco de lectura en el CDR3, se resalta en letras itálicas rojas.

Está documentada la existencia de ARNm aberrantes en hibridomas, transcritos a partir de los genes de la cadena pesada y la cadena liviana, re-arreglados pero no funcionales (Krebber y col., 1997). Estas cadenas no productivas serían amplificadas preferentemente por los *sets* de *primers* específicos para las regiones variables de anticuerpo. Por otro lado, ciertas células de mieloma utilizadas en los procesos de fusión, en particular las líneas Sp2, p3-X63-Ag8.653, derivadas de la línea de mieloma MOPC-21, pueden expresar este tipo de cadenas aberrantes (Berdichevsky y col., 1999). La línea MOPC-21 expresa ARNm de cadenas aberrantes de inmunoglobulinas y dado que el mieloma NS0 (utilizado en las hibridaciones) deriva de dicha línea troncal, es probable que porte tal carga genética.

Las cadenas aberrantes podrían ser silenciadas o segregadas durante el período de estabilización de una línea multiploide de un hibridoma emergente y así, como ocurre en la mayoría de los hibridomas, no expresar cadenas aberrantes. En otros casos, como el hibridoma CA1A3, las cadenas aberrantes podrían “diluir” ampliamente la secuencia de las regiones variables deseadas dificultando la posibilidad de obtener anticuerpos funcionales (Krebber y col., 1997). Es posible, además, que otras cadenas no funcionales puedan originarse debido a rearrreglos aberrantes en el segundo alelo de la célula B secretora del mAb.

A partir de lo expuesto, se justifica la necesidad de utilizar una estrategia de selección y amplificación con las características de la tecnología de *phage-display* para aislar proteínas funcionales de un conjunto de moléculas que puede presentar enriquecimiento en moléculas aberrantes tal como la cadena V_H aberrante demostrada para el hibridoma CA1A3.

6.3. Síntesis de los fragmentos de ADN de cadena única scFv

Los productos de ADN purificados correspondientes a las cadenas pesada y liviana se deben ensamblar para formar un gen único utilizando un fragmento de ADN *linker* mediante una estrategia de *Splicing by Overlap Extension (SOE) PCR*. En este paso crítico resulta de suma importancia que los tres fragmentos de ADN involucrados en la amplificación (V_H , V_L y *linker*) se encuentren en concentraciones equimolares. Por ello, se cuantificaron los fragmentos V_H y V_L purificados en geles de agarosa utilizando un marcador V_H de concentración conocida incluido en el *kit* RPAS (Fig. 25). En todos los casos, la concentración del fragmento V_H amplificado se ubicó en un rango de 10 ng.ml^{-1} a 25 ng.ml^{-1} , mientras que la correspondiente al fragmento V_L resultó ligeramente inferior, entre 5 ng.ml^{-1} y 15 ng.ml^{-1} .

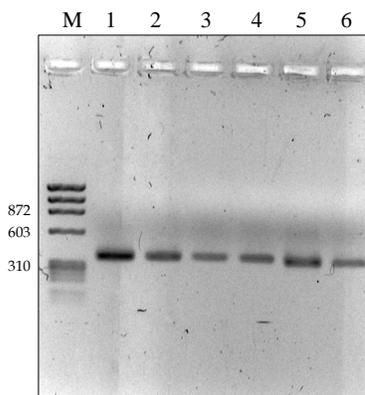


Fig. 25: Cuantificación de los productos purificados V_H y V_L del mAb CB27H2 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v).

Se sembraron $5 \mu\text{l}$ de diluciones de cada producto purificado y dos concentraciones diferentes del marcador V_H comercial (GE Healthcare) para facilitar la comparación visual de las bandas.

Carriles: (M) marcador de tamaño molecular Φ (pb), (1) cadena V_H 1/10, (2) cadena V_H 1/20. (3) marcador 25 ng, (4) marcador 50 ng, (5) cadena V_L 1/10 y (6) cadena V_L 1/20.

Teóricamente, la reacción de ensamblado de las unidades V_H y V_L produce cantidades suficientes de fragmento de cadena única como para constituir el ADN molde que se amplificará en una segunda reacción de PCR utilizando *primers*, cuya secuencia parcialmente degenerada contiene sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Not I* y *Sfi I* necesarias para el proceso de clonado. En la Fig. 26 se comparan los resultados del ensamblado y amplificación de los fragmentos scFv correspondientes a los cuatro mAbs procesados.

En todos los casos, la reacción de amplificación no generó un único producto representado por una banda discreta. Por el contrario, además de la banda de tamaño esperado (~750 pb), se evidenciaron, por ejemplo, bandas de ~500 pb y de ~1.000 pb como las observadas para la preparación de anticuerpos derivados de los hibridomas CA1A3 y CA5E6. En el caso del fragmento derivado del mAb CB15D7, se produjo un fenómeno recurrente durante los diversos intentos de amplificación ensayados, generándose de manera preferencial un producto de tamaño inferior (~650 pb) al esperado (Fig. 26). Este resultado se reiteró incluso en aquellos casos en los que se realizaron nuevas reacciones de amplificación utilizando como molde el ADN correspondiente a la banda de 750 pb (producida en menor proporción, Fig. 26), previamente purificado desde geles de agarosa.

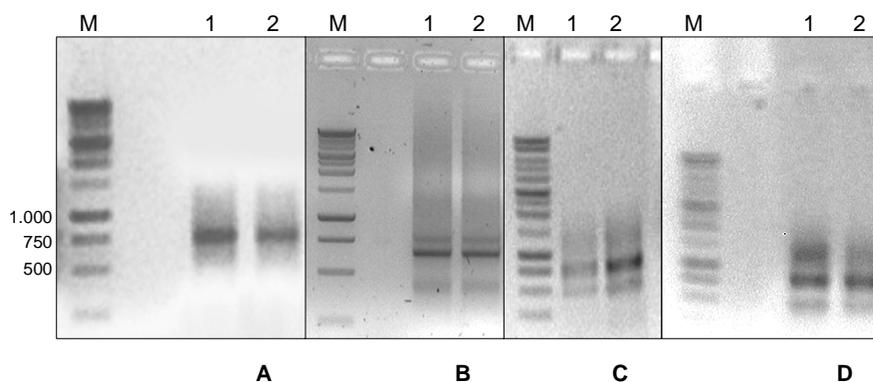


Fig. 26: Análisis de los productos obtenidos luego del ensamblado y amplificación de los fragmentos scFv.

El volumen total de la reacción de amplificación fue dividido y sembrado en 2 carriles (1 y 2) de los geles de agarosa correspondientes a los mAbs CB27H2 (A), CB15D7 (B), CA5E6 (C) y CA1A3 (D). En todos los geles se sembró el marcador de tamaño molecular 1 kb *ladder*.

Carril (M), marcador de tamaño molecular 1 kb *ladder*; carriles (1) y (2), volumen total de la reacción de amplificación correspondiente a cada muestra de mAb procesada.

6.4. Clonado de los genes de scFv en el vector pCANTAB 5E

Los productos amplificados del tamaño adecuado fueron purificados para realizar posteriormente la digestión enzimática de manera secuencial con las enzimas *Sfi* I y *Not* I. Los fragmentos de ADN digeridos fueron purificados y cuantificados en geles de agarosa (por comparación con un patrón scFv de concentración conocida) con el objeto de determinar la masa de scFv necesaria para efectuar la reacción de ligación con el vector pCANTAB 5E.

Como se observa en la Fig. 27, se obtuvieron cantidades mínimas de fragmento scFv digerido (concentraciones en un rango de 3 ng.ml⁻¹ a 10 ng.ml⁻¹) para los clones CA1A3, CA5E6 y CB27H2. La fracción de ADN de tamaño adecuado correspondiente al mAb CB15D7 resultó escasamente visible en los geles de agarosa luego de la primera purificación, perdiéndose totalmente tras el proceso de digestión enzimática. Luego de repetir en varias ocasiones con resultados insatisfactorios el procedimiento de ensamblado del fragmento scFv a partir de las cadenas V_H y V_L derivadas del ARNm del mAb CB15D7, se resolvió suspender el procesamiento de dicho clon.

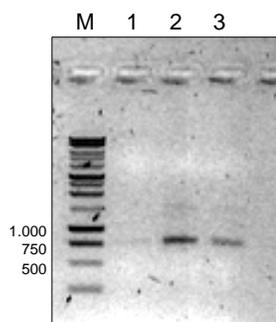


Fig. 27: Cuantificación del producto de 750 pb purificado correspondiente al clon CB27H2 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v)

Se sembró una alícuota de 5 µl del producto purificado y dos concentraciones diferentes del marcador scFv comercial (GE Healthcare) para facilitar la comparación entre las bandas. Se muestra como ejemplo el fragmento digerido y purificado proveniente del mAb CB27H2.

Carriles: (M) marcador de tamaño molecular 1 kb *ladder*, (1) producto CB27H2, (2) marcador scFv 50 ng y (3) marcador scFv 25 ng.

A pesar de que las regiones variables de los anticuerpos fueron clonadas desde líneas de hibridomas monoclonales teóricamente secretoras de una molécula única de inmunoglobulina, el proceso utilizado para tal fin involucró etapas que potencialmente pueden generar mutaciones en la secuencia nucleotídica. El uso de *primers* degenerados,

sumado a las condiciones de baja astringencia en la técnica de PCR, favorece, en muchos casos, la hibridación inespecífica con la concomitante generación de mutaciones puntuales, pérdida del marco de lectura y producción de fragmentos de longitud incorrecta (Krebber y col., 1997). En este trabajo, un fenómeno como el descrito podría fundamentar el comportamiento observado en la amplificación del fragmento derivado del mAb CB15D7, donde se obtuvo mayoritariamente un producto de menor tamaño que el esperado (cabe destacar que, en este caso, la extensión del producto trunco resultó sensiblemente menor, facilitándose su discriminación en los geles de agarosa).

Luego de proceder con la reacción de ligación de los fragmentos scFv CA1A3, CA5E6 y CB27H2 con el vector pCANTAB 5E se realizaron las correspondientes transformaciones de las células de *E. coli* TG-1 competentes. Paralelamente, se procesó un inserto control digerido con las enzimas *Sfi*I y *Not*I (provisto en el *kit* RPAS de GE Healthcare) para corroborar la eficiencia del procedimiento de ligación y transformación. En la Tabla X se detalla, para cada muestra, la eficiencia de transformación en términos del número de colonias obtenidas por unidad de masa de inserto empleada en la ligación, y el tamaño de la biblioteca referido al número total de transformantes logrados. Este último parámetro es determinante para la continuidad del proceso global, ya que la probabilidad de encontrar clones que secreten fragmentos scFv funcionales está directamente relacionada con la cantidad de clones totales obtenidos. La eficiencia de transformación debe considerarse como un parámetro estimativo debido a que la masa de ligando utilizado para su cálculo fue determinada de manera visual por comparación de bandas en geles de agarosa con un patrón de masa conocida. De todos modos, las eficiencias de clonado fueron comparables con la correspondiente al inserto control, incluso mayores para el caso de los clones CA1A3 y CA5E6. En relación al tamaño de la biblioteca correspondiente a cada fragmento, se registraron valores que variaron entre $6,8 \cdot 10^3$ ufc y $1,0 \cdot 10^4$ ufc, coincidiendo con resultados típicos de procesos que utilizan métodos de transformación química. Tratándose de la obtención de fragmentos de anticuerpos recombinantes a partir de hibridomas secretores de mAbs específicos, el tamaño de las bibliotecas se consideró adecuado.

Tabla X: Parámetros de la transformación de células TG-1 con las construcciones correspondientes a los fragmentos scFv CA1A3, CA5E6 y CB27H2.

scFv	Eficiencia de clonado (ufc.ng ⁻¹)	Tamaño de la biblioteca (ufc)
Control	67	10.000
CA1A3	136	6.800
CA5E6	133	10.000
CB27H2	48	7.200

6.5. Selección y amplificación de los fragmentos recombinantes mediante técnica de *phage-display*

Durante el desarrollo del presente trabajo hemos mencionado y demostrado que la obtención de fragmentos scFv funcionales a partir de ARNm de hibridomas puede presentar diferentes inconvenientes basados en características inherentes a los mismos, como la expresión de regiones variables aberrantes, o bien propios del procedimiento de obtención de tales moléculas. Entre estos últimos, dado que los genes variables son amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos degenerados, pueden ocurrir errores en la coincidencia de bases (*mismatch*) y errores propios de la PCR que causan mutaciones puntuales y corrimientos en el marco de lectura traduccional. En consecuencia, todos los aspectos mencionados pueden incrementar ampliamente la posibilidad de generar una gran diversidad de moléculas de scFv no funcionales. Por tal motivo, se impone demostrar la especificidad de los fragmentos y su selección de aquellos no funcionales. La ventaja inherente a la tecnología de *phage display* reside en su capacidad de vincular un ligando o proteína funcional con el gen codificante (McCafferty y col., 1990). De esta manera, diferentes clones pueden ser rápidamente monitoreados por su capacidad de interactuar con el antígeno de interés y seleccionados de un repertorio de moléculas.

El sistema implica el empleo del vector “fagémido” pCANTAB 5E, diseñado de forma tal que las regiones variables de los anticuerpos puedan ser clonadas entre la secuencia líder (g3 *signal*) y el núcleo principal del gen 3 del fago M13. La proteína de fusión que es expresada de esta manera retiene las funciones de ambas proteínas originales. La secuencia señal de la g3p dirige el transporte de la proteína a la membrana interna y al periplasma de *E. coli*, mientras que el dominio principal de dicha molécula une la proteína de fusión al extremo del fago en formación. La mayor parte de los fagos maduros presentan una copia de la fusión scFv-g3p y dos a cuatro copias de la g3p nativa, suficientes para

asegurar la infectividad de la partícula viral. Adicionalmente, este vector contiene un codón *amber* de finalización de la traducción entre el scFv clonado y la secuencia codificante para g3p. Cuando una cepa de *E. coli* supresora (*supE*) como la TG-1 es transformada con esta construcción, la traducción no se detiene en el codón de finalización y se produce la proteína de fusión g3p. En las células TG-1 la supresión del codón *amber stop* se efectúa con una eficiencia del 20%, suficiente para la presentación del fragmento scFv sobre la superficie del fago.

Las células TG-1 transformadas con las construcciones scFv-pCANTAB se infectaron con el fago *helper* M13KO7 con el fin de obtener la biblioteca de fagos recombinantes correspondiente a cada scFv. Luego de incubar el cultivo durante una noche se procedió a cosechar el sobrenadante conteniendo los fagos recombinantes para someterlos a una precipitación con PEG/NaCl con el fin de concentrarlos y purificarlos.

Una vez producidos y purificados, los fagos recombinantes fueron sometidos a tres rondas consecutivas de *panning* empleando el rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida con el fin de seleccionar determinados miembros del repertorio en base a su capacidad de unión a la citoquina. El enriquecimiento selectivo de los mismos puede inferirse cuando, para un dado número de fagos totales usados en la selección (*INPUT*), el número de fagos retenidos debido a su interacción con el antígeno (*OUTPUT*) aumenta a lo largo de las sucesivas rondas de *panning*. En la Fig. 28 se detallan los resultados obtenidos durante el proceso de enriquecimiento en términos de la cantidad de fagos que permanecieron retenidos luego de cada ronda de selección con el antígeno inmovilizado en fase sólida. El inóculo de los fagos (*INPUT*) para cada ronda en todos los ensayos se mantuvo constante en el orden de 10^{11} ufp.

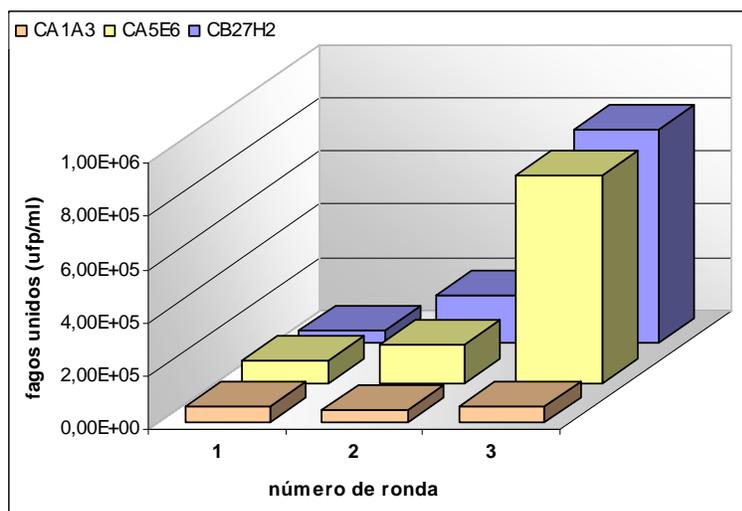


Fig. 28: Enriquecimiento selectivo de fagos recombinantes mediante procedimiento de *panning* empleando rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de microtitulación. Los fagos recombinantes correspondientes a cada muestra se incubaron con el antígeno inmovilizado en la fase sólida. Luego de sucesivos lavados se agregaron células de *E. coli* TG-1 para recuperar, mediante infección, los fagos que permanecieron retenidos. Finalmente, diversas diluciones de las bacterias infectadas se sembraron en placas de cultivo para evaluar la eficiencia del procedimiento mediante el recuento del número de colonias resultantes (*OUTPUT*).

Tal como se observa en la Fig. 28, es evidente el aumento de la concentración de los fagos recombinantes que presentan en su superficie los fragmentos scFv derivados de los mAbs CA5E6 y CB27H2 luego del tercer ciclo de selección y amplificación, evidenciándose un factor de enriquecimiento de 9 y 17, respectivamente (Tabla XI). Por el contrario, no se observó este efecto en el ensayo correspondiente al clon CA1A3. Para este caso, la cantidad de fagos obtenidos luego de las tres rondas de *panning* se mantuvo constante en el orden de $5 \cdot 10^4$ ufp.ml⁻¹. Esta concentración es la misma que se obtuvo al realizar la experiencia utilizando placas sin el antígeno inmovilizado (control sólo bloqueo) y que corresponde a la cantidad basal de fagos que no presentan la proteína de interés pero que se unen al soporte sólido mediante interacciones inespecíficas.

Luego de la última ronda de *panning* correspondiente a cada fragmento de anticuerpo en estudio, se realizó el *screening* de los fagos recombinantes mediante técnica de ELISA específico indirecto. A partir de colonias de células TG-1 tomadas al azar se realizaron cultivos que fueron inducidos con IPTG durante toda la noche para obtener los fragmentos scFv solubles (conjuntamente con la proteína de fusión scFv-pIII) en el

sobrenadante. Estos sobrenadantes clarificados fueron evaluados en el inmunoensayo utilizando un anticuerpo específico para el péptido *E-tag* expresado en la región C-terminal de los fragmentos recombinantes con el fin de identificar la formación de complejo scFv-IFN- α 2b. En el caso de los anticuerpos CA5E6 y CB27H2 fue posible identificar varios clones de células TG-1 productores de fragmentos recombinantes que reconocieron al IFN- α 2b mediante técnica de ELISA (Tabla XI).

Tabla XI: Selección y amplificación de fagos recombinantes específicos. Resumen del procedimiento de *panning* y *screening* mediante ELISA específico indirecto de las bibliotecas correspondientes a los fragmentos scFv CA1A3, CA5E6 y CB27H2.

scFv	Factor de enriquecimiento ^a	Clones positivos ^b
CA1A3	1	0/94
CA5E6	9	17/94
CB27H2	17	32/71

^a Factor de enriquecimiento de la biblioteca calculado como la relación entre los valores del OUTPUT de la tercera y primera ronda de *panning* (O_3/O_1).

^b Relación entre clones positivos y clones totales ensayados.

Por otro lado, coincidiendo con el factor de enriquecimiento, se evidenció una mayor proporción de clones productores de scFv específicos para el mAb CB27H2 (45%) en comparación con el mAb CA5E6 (18%).

Con respecto al mAb CA1A3, los resultados confirmaron la hipótesis planteada con anterioridad, es decir, el hibridoma que secreta dicho anticuerpo produce una molécula de ARNm de secuencia aberrante, transcrita a partir de genes de la cadena pesada rearrreglados pero no funcionales, que es preferentemente aislada con el sistema de *primers* utilizado para la amplificación de la región V_H . Si bien se planteó la posibilidad de que durante el proceso de selección de los fagos recombinantes frente al antígeno surgieran algunos que presentaran en su superficie un fragmento scFv CA1A3 funcional, todos los intentos efectuados resultaron infructuosos.

6.6. Obtención de fragmentos scFv solubles

El siguiente paso en el proceso de obtención de los fragmentos recombinantes consistió en la generación de clones de células HB2151 productores de los anticuerpos scFv CA5E6 y CB27H2. En la cepa no supresora HB2151, el codón *stop* es reconocido y la

traducción se detiene al final del gen del scFv sin formarse la proteína de fusión con g3p. De esta manera, es posible obtener los fragmentos solubles no fusionados a la proteína del fago para su posterior caracterización.

A partir de los clones de células TG-1 considerados positivos en el proceso de *screening* (17 clones para el scFv CA5E6 y 32 clones para el scFv CB27H2), se obtuvieron los fagos correspondientes para infectar células HB2151. Los clones resultantes se cultivaron con el objeto de seleccionar clones celulares productores de scFv solubles específicos empleando la técnica usual de ELISA específico indirecto mediado por rhIFN- α 2b. Así, siguiendo el mismo criterio que en el caso anterior, se aislaron clones productores de los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2, los cuales fueron procesados para realizar preparaciones de ADN plasmídico para su posterior secuenciación.

scFv CA5E6:

QVKLQQSGAELVRPGASVKLSCKASG ^{H1}YTFTSYWVNWWKQRPEQGLEWIG ^{H2}RIDPYDGETQYNQKFKDKAILT
 VDKSSNIAYMQLSSLTSDASAVYYCAR ^{H3}PFTTWTWYFDVWGQTTVTVSS GGGSGGGSGGGGSDIELT
 QSPKIMSISVGDVSVTC ^{L1}KASQNVGTNVAWYQQKPGHSPKVLIV ^{L2}STSSRYSGVPDRFTGSGSGTDFLTISN
 VQSEDLADYFC ^{L3}HQYDNSPYTFGGGTKLEIKRAAAGAPVPYPDPLEPR

scFv CB27H2:

QVKLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSG ^{H1}SIKDSYMHWVRQRPEQGLEWIG ^{H2}RIDPANGYTQFDPKFKGKATITA
 DTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCAR ^{H3}RYDYALDYWGQTTVTVSS GGGSGGGSGGGGSDIELTQSPSSL
 TVTAGEKVTMSC ^{L1}KSSQLLNSGKQKNYLTWFQKPGQPPKLLIF ^{L2}WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISS
 VQAEDLAVYYC ^{L3}QNDYSYPLTFGAGTKLEIKRAAAGAPVPYPDPLEPR

Fig. 29: Secuencias aminoacídicas deducidas de los scFv CA5E6 y CB27H2.

Las regiones CDR se identifican con letras itálicas rojas: (H) CDR correspondiente a la cadena pesada, (L) CDR correspondiente a la cadena liviana. El péptido *linker* se señala en letras azules, mientras que la secuencia correspondiente al péptido *E-tag* aparece subrayada.

En la Fig. 29 se detallan las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los scFv CA5E6 y CB27H2. Para la identificación de los residuos de los CDRs se utilizó la información suministrada por la página *web* de Martin y col. basada en Chotia y Lesk (1987) y Kabat y col. (1991). A partir

de la secuencia de aminoácidos empleando el *software* Vector NTI, se calculó la masa molecular de cada fragmento (teniendo en cuenta el péptido *E-tag* cuya masa molecular es 1.407 Da): 28.034 Da para el scFv CA5E6 y 28.041 Da para el scFv CB27H2.

Un clon representativo de cada fragmento fue cultivado en medio 2xYT-AG y su expresión fue inducida con IPTG (durante 4 h y ON) para confirmar la producción de la proteína soluble y verificar la localización celular y el tiempo de incubación óptimo para lograr un elevado rendimiento de scFv funcional. Para ello, los extractos periplásmico (EP) y total (ET) y el sobrenadante (SN) de dichos cultivos fueron evaluados por *SDS-PAGE* en condiciones reductoras y posterior *Western Blot* revelando la presencia de los fragmentos mediante el empleo de un anticuerpo anti *E-tag* conjugado con la enzima peroxidasa. En todos los casos, se observó una banda de masa molecular aparente de 30 kDa correspondiente a la expresión de la proteína de fusión scFv-*E-tag*, verificándose que esta proteína se concentra en el EP cuando se realizan inducciones cortas (4 h) y en el SN cuando la producción se extiende toda la noche. En la Fig. 30A se muestra a manera de ejemplo, el resultado del *SDS-PAGE/Western Blot* para las muestras de EP y SN correspondientes al scFv CB27H2.

Paralelamente, la capacidad de reconocimiento específico de los fragmentos solubles (en el EP, ET o SN) fue evaluada mediante ELISA específico indirecto, inmovilizando el rhIFN- α 2b en la fase sólida. Tal como se ilustra en la Fig. 30B, tanto los fragmentos presentes en el EP como los presentes en el SN se unieron en forma específica al antígeno inmovilizado, no evidenciándose señal de inespecificidad en aquellos pocillos no sensibilizados con la citoquina (controles negativos de sólo bloqueo). Los fragmentos scFv correspondientes al ET no reconocieron al interferón posiblemente debido al plegamiento incorrecto de la molécula de anticuerpo en dichos extractos, originado por la imposibilidad de formación de los enlaces disulfuro en el ambiente reductor del citoplasma celular, sumado a una concentración baja de los fragmentos en dichos ET. Por otro lado, se confirmó que, luego de la inducción de los cultivos con IPTG, los fragmentos scFv solubles (funcionales) se concentran en el espacio periplásmico y lentamente comienzan a difundir hacia el sobrenadante de cultivo a medida que se prolonga la incubación. Diversos autores han reportado este fenómeno empleando diferentes cepas bacterianas y secuencias señales de secreción en el espacio periplásmico, sin encontrar una explicación molecular al incremento de la permeabilidad de la membrana externa de tal compartimento en forma consecuente con la inducción de la expresión de anticuerpos (Plückthun y Skerra, 1989).

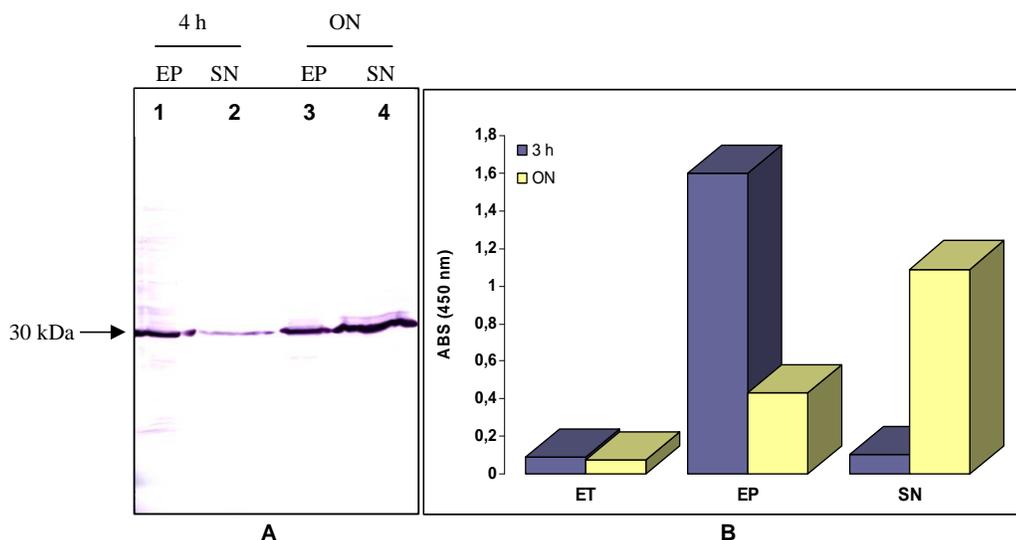


Fig. 30: Evaluación de la producción de fragmentos scFv funcionales durante el cultivo de *E. coli* HB2151/CB27H2. Análisis de la localización celular de producción del fragmento.

- A. SDS-PAGE y *Western Blot* correspondiente a los EP y SN de cultivos de HB2151/CB27H2 inducidos durante 4 h y ON. Los extractos ET exhibieron una banda de masa molecular aparente de 30 kDa de muy tenue intensidad (resultados no mostrados).
Carriles: (1) EP 4 h, (2) SN 4 h, (3) EP ON, (4) SN ON.
- B. ELISA específico indirecto de las muestras correspondientes a ET, EP y SN de cultivos de HB2151/CB27H2 inducidos durante 4 h y ON. Las muestras se sembraron paralelamente en pocillos sin rhIFN- α 2b, donde la señal resultó comparable a la correspondiente al control negativo, confirmando la interacción específica.

Así, la concentración de scFv se incrementó al prolongarse el tiempo de inducción del cultivo (Fig. 30A, carriles 2 y 4). Sin embargo, se observó pérdida de la funcionalidad del mismo basada en su menor capacidad de reconocimiento del antígeno mediante técnica de ELISA. Efectivamente, la mayor masa del scFv en el SN inducido ON (Fig. 30A, carril 4) no se correspondió, proporcionalmente, con un mayor reconocimiento del antígeno con respecto al scFv presente en el EP luego de 4 h de inducción, el cual presentó menor cantidad de fragmento (Fig. 30A, carril 1) y superior reconocimiento del IFN inmovilizado. Evidentemente, la condición nativa y funcionalidad de los anticuerpos secretados es afectada por las condiciones del entorno como, por ejemplo, la presencia de proteasas liberadas al medio en forma concomitante con la pérdida de viabilidad del cultivo.

La producción de scFv funcionales en EP se ha reportado como localización celular óptima para la producción de los mismos (Plückthum, 1992). El EP presenta menor contenido de proteasas que el citoplasma, permite la correcta formación de puentes

disulfuro debido al ambiente oxidativo y presencia de chaperonas moleculares y, adicionalmente, exhibe menor contenido de proteínas contaminantes lo que favorece el proceso de purificación (Choi y Lee, 2004). Sin embargo, la producción de scFv funcionales en el EP fue igualmente afectada por el tiempo de inducción de la expresión. En la Fig. 30A se evidencia similar masa de scFv en los extractos EP obtenidos de cultivos inducidos durante 4 h y ON (carriles 1 y 3) con una señal de reconocimiento del antígeno 4 veces inferior para la condición de mayor tiempo de inducción. Posiblemente, al incrementarse el tiempo de inducción podrían manifestarse procesos de inactivación por proteasas, desnaturalización o agregación, entre otros fenómenos, responsables de la pérdida de actividad de los fragmentos.

7. Producción y purificación de los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2

Con el objeto de caracterizar los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2 desde el punto de vista de su afinidad y capacidad neutralizante de la actividad biológica del hIFN- α 2b, fue necesaria una etapa de producción en mayor escala y posterior purificación de dichos fragmentos. En función de lo anteriormente mencionado, se seleccionó la estrategia de producción consistente en inducción de la expresión con IPTG durante 4 h, de manera que los fragmentos recombinantes solubles y funcionales se acumulen en el espacio periplásmico de las células HB2151. Posteriormente a la inducción se obtuvo el extracto periplásmico que constituyó la muestra cruda a purificar por cromatografía de inmunoafinidad empleando un mAb anti-*E-tag* acoplado a una matriz de *Sepharose* HP (GE Healthcare).

En la Fig. 31 se muestra un cromatograma típico obtenido durante la purificación del scFv CA5E6 (presente en espacio periplásmico), monitoreado por lecturas espectrofotométricas a $\lambda = 280$ nm y mediante ELISA específico indirecto.

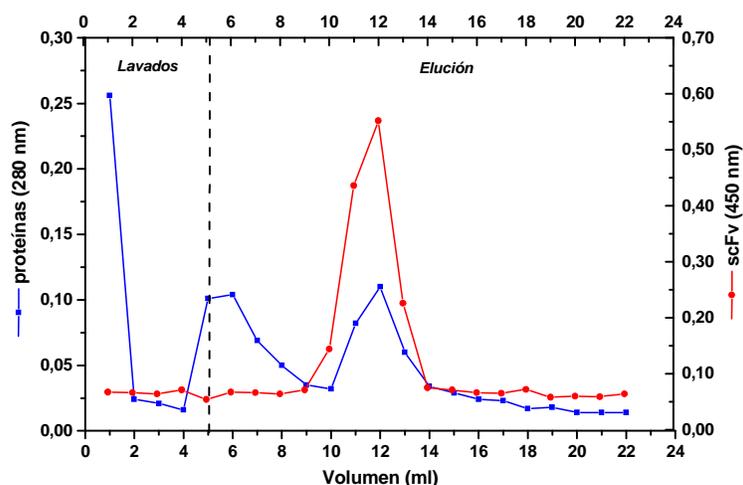


Fig. 31: Purificación de los fragmentos scFv mediante cromatografía de inmunoafinidad.

En eje de ordenadas se graficó, por un lado la absorbancia medida a una $\lambda=280$ nm para cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso cromatográfico (eje de abscisas). Paralelamente, se graficó la absorbancia a una $\lambda=450$ nm, correspondiente a la determinación funcional de los fragmentos mediante técnica de ELISA específico indirecto. La línea de puntos separa la etapa correspondiente a los lavados con solución de fosfatos 20 mM pH 7 de la etapa de elución con solución de glicina de pH 3.

La pureza del producto de la elución ácida correspondiente a la purificación de los scFv a partir de los extractos periplásmicos fue evaluada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 32). Previo a dicho análisis las fracciones que conformaron el pico de elución se mezclaron, concentraron y diafiltraron contra PBS.

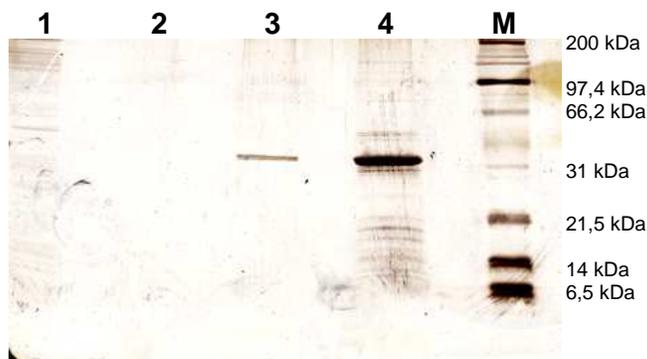


Fig. 32: Evaluación de la purificación del fragmento scFv CA5E6 mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Carriles: (1) Flowthrough, (2) lavados, (3) elución, (4) elución concentrada, (M) marcadores de masa molecular.

La determinación del porcentaje de pureza se realizó mediante densitometría de bandas luego de digitalizar las imágenes de los geles, obteniéndose un valor superior al 80% en todas las experiencias realizadas. Sólo se observaron escasas proteínas contaminantes, en su mayoría de baja masa molecular. La pureza lograda fue considerada adecuada para las siguientes etapas de caracterización de los fragmentos, procediendo previamente a la determinación de la concentración mediante espectrofotometría y corrección de la misma mediante el factor de purificación.

8. Determinación de la constante de afinidad de los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2

La especificidad y afinidad de un anticuerpo determinan su calidad en cuanto a la interacción y reconocimiento antigénico. Ambos parámetros dependen de la estructura del sitio de contacto del anticuerpo (paratope) con el antígeno. A nivel molecular, la topografía superficial y los arreglos de las interacciones no covalentes que se establecen entre antígeno y anticuerpo definen la especificidad; mientras que el tipo y la contribución energética de tales interacciones son los factores que establecen su afinidad.

El procesamiento llevado a cabo para preparar fragmentos scFv a partir de sus inmunoglobulinas parentales puede generar modificaciones en el arreglo estructural o conformacional del sitio de reconocimiento antigénico que afecten la especificidad y/o afinidad de los mismos. En particular, la especificidad de los fragmentos frente al IFN fue confirmada para ambos fragmentos (scFv CA5E6 y CB27H2). Por lo tanto, con el fin de evaluar si las nuevas moléculas presentaron modificaciones a nivel de la energía de interacción con su antígeno específico, se llevaron a cabo ensayos para medir la constante de afinidad de cada fragmento.

Se realizaron las representaciones de Scatchard y se calculó la constante de afinidad a partir de la pendiente de la regresión lineal establecida con los datos experimentales procesados por triplicado. Debido a la característica univalente de los fragmentos con respecto al antígeno se utilizó el método de Friguet y col. (1985) sin la modificación de Stevens (1987), graficando v/a versus v . En la Fig. 33 se muestran las representaciones gráficas correspondientes a la interacción de los fragmentos CA5E6 y CB27H2 con la molécula de rhIFN- α 2b soluble.

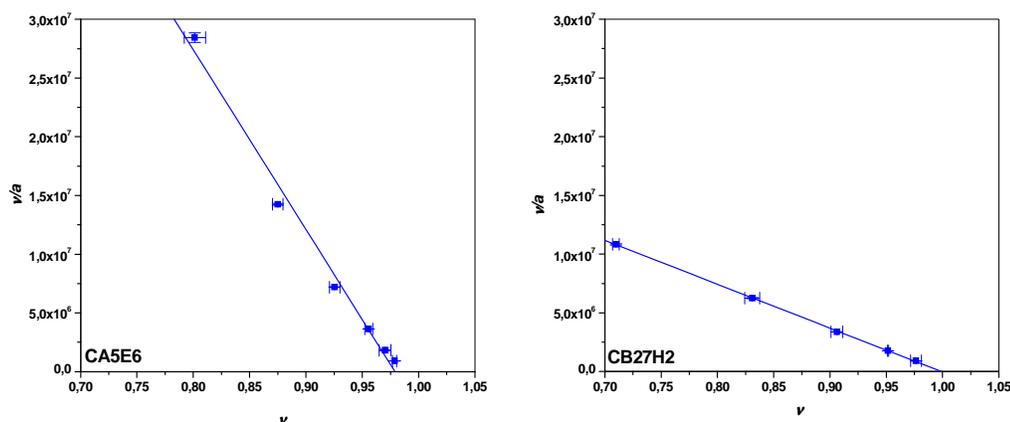


Fig. 33: Representación de Scatchard para la determinación de la constante de afinidad del complejo scFv purificado-rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA.

En eje de ordenadas se representó el cociente entre la función de unión (v) y la concentración de antígeno libre (a) en el equilibrio para cada concentración total de antígeno ensayada. En eje de abscisas se representó la función de unión. La constante de afinidad, calculada a partir del valor de la pendiente de la regresión lineal de los datos experimentales, fue evaluada en presencia de concentraciones decrecientes de la citoquina. Las barras de error indican las desviaciones estándares de las determinaciones ($n = 3$).

En la Tabla XII se comparan las constantes de afinidad obtenidas para los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2 con las correspondientes a los mAbs originales. En el caso del scFv CA5E6 no se observó una disminución significativa de la afinidad a la molécula nativa de rhIFN- α 2b con respecto al mAb completo. Por otro lado, el fragmento CB27H2 presentó una disminución drástica (aproximadamente 30 veces) en su afinidad comparándolo con su correspondiente mAb. En este último caso, la pérdida de las regiones constantes afectaría la conformación que adopta el sitio de unión al epítipo, exhibiendo, el *linker* flexible, incapaz de aportar la estabilización adicional que requieren los fragmentos Fv con el fin de restaurar la afinidad del paratope original. Este fenómeno indicaría que los dominios V_H y V_L de este anticuerpo no serían estables individualmente y tampoco se estabilizarían mutuamente como para reproducir el sitio de unión antigénica original (si bien

quedó demostrado que la especificidad por el antígeno se mantiene, de modo que no cabe duda de que el paratope se reconstituye parcialmente). En general, la mayoría de los diferentes péptidos empleados para construir fragmentos scFv rinden anticuerpos recombinantes funcionalmente competentes, lo que constituye un resultado sorprendente considerando la gran distancia relativa existente entre la región N- y C-terminal de cada Fv (V_H y V_L). Datos estructurales obtenidos por RMN muestran que los aminoácidos en el *linker* son muy flexibles. A pesar de ello, en la literatura se reportan diversos casos de inserción de tales péptidos con reducción significativa en la afinidad por el antígeno (Breitling y Dübel, 1999) de la misma manera que lo observado con el scFv CB27H2.

Contrariamente, en el fragmento scFv CA5E6 la estabilización de las regiones variables *per se* asistida adicionalmente por el mencionado *linker* resultó eficiente para retener en cierta medida la afinidad del anticuerpo de origen.

Tabla XII: Constantes de afinidad de los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2 y de los mAbs correspondientes.

	mAb ($10^8 M^{-1}$)	scFv ($10^8 M^{-1}$)
CA5E6	$2,20 \pm 0,20$	$1,50 \pm 0,40$
CB27H2	$11,00 \pm 2,00$	$0,37 \pm 0,07$

Frecuentemente se ha sostenido que los fragmentos recombinantes en la forma scFv resultan menos estables y con menor afinidad por el antígeno con respecto al mAb completo e, incluso, al fragmento Fab correspondiente, sin que medien en la mayoría de los casos experimentos rigurosos que avalen tal comparación. En definitiva, dichas propiedades no pueden predecirse, siendo muy dependientes de las secuencias aminoacídicas de cada fragmento. Sin embargo, algunos autores (por ejemplo Padiolleau-Lefevre y col., 2007), teniendo en cuenta el hecho de que ambas construcciones contienen el sitio de unión al antígeno completo, afirman que la afinidad de los fragmentos monoméricos scFv y Fab sería idéntica si se cumplen ciertas suposiciones: que no se produzca reorientación de los dominios V_H y V_L , que el clonado de ADNc de dichas cadenas reproduzca fielmente la secuencia del mAb parental y que las condiciones de expresión y renaturalización sean las adecuadas para la obtención del scFv en su estado nativo (correctamente plegado). Estudios recientes avalan la idea de que la estabilidad global del fragmento monomérico, ya sea como scFv o Fab, depende fundamentalmente de la estabilidad intrínseca de los

dominios variables y del efecto estabilizador que puedan ejercer dichos dominios mutuamente (Jäger y Plückthun, 1999; Röthlisberger y col., 2005). Aplicando estas ideas en el presente trabajo de Tesis, si se considera que los fragmentos recombinantes CA5E6 y CB27H2 fueron obtenidos siguiendo estrictamente el mismo procedimiento (específicamente ambos se expresaron en forma soluble en el espacio periplásmico sin necesidad de etapas posteriores de renaturalización que pudieran introducir diferencias en cuanto a la conformación nativa de cada proteína), es posible reforzar la hipótesis anteriormente planteada para explicar la pérdida notoria de afinidad por parte del scFv CB27H2 con respecto al mAb completo. Es decir, aquella especulación que planteaba problemas de estabilidad de los dominios variables individuales del anticuerpo que no pudieron ser contrarrestados por la presencia del péptido *linker*.

9. Neutralización de la actividad biológica antiviral *in vitro* de diferentes subtipos de hIFN- α en presencia de los fragmentos recombinantes CA5E6 y CB27H2.

En las enfermedades que se correlacionan con un incremento en la expresión de interferón alfa endógeno frecuentemente se ha detectado una población heterogénea de subtipos de esta citoquina (Huang et al., 1995). En el desarrollo de tecnologías que involucren la obtención de anticuerpos recombinantes potencialmente aptos para el tratamiento de dichas patologías, esta heterogeneidad de subtipos implica la necesidad de contar con anticuerpos capaces de neutralizar la mayoría, si no todas, las variantes del hIFN- α . Este trabajo contempló el diseño de una estrategia para la obtención de mAbs murinos que involucró el uso de rhIFN- α 2b como inmunógeno debido, principalmente, a la disponibilidad de esta citoquina en la cantidad y la pureza necesarias para el proceso de inmunización de los animales. Aún considerando el hecho de que los mAbs fueron generados utilizando únicamente una variante del hIFN- α , se planteó la posibilidad de estudiar la capacidad neutralizante de la actividad biológica anti-viral de un grupo heterogéneo de subtipos de esta citoquina por parte de los scFv CA5E6 y CB27H2, mediante ensayos *in vitro* similares a los utilizados en la caracterización del panel de mAbs. Dicho grupo heterogéneo quedó representado por una mezcla de interferones alfa producidos por leucocitos de sangre periférica (IFN leucocitario) y por una colección de subtipos de IFN- α producido por células Namalwa inducidos por el virus Sendai (IFN linfoblástico).

Desarrollando el mismo protocolo empleado para el estudio del panel de mAbs, en primer lugar se seleccionó la concentración de citoquina que fue capaz de generar, aproximadamente un 50% del máximo efecto protector producido por cada variante de hIFN- α . En la Fig. 34 se pueden observar las curvas correspondientes al ensayo desarrollado para valorar la actividad biológica de los IFNs leucocitario y linfoblástico mediante la evaluación del efecto antiviral de los mismos en el sistema células MDBK/ virus VSV. De la misma forma se procedió con el IFN- α 2a e IFN- α 2b (previamente evaluado en la sección 5). De esta manera se trabajó con una concentración constante de cada citoquina ($2 \text{ UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ de todos los hIFN- α ensayados) frente a concentraciones variables de anticuerpos.

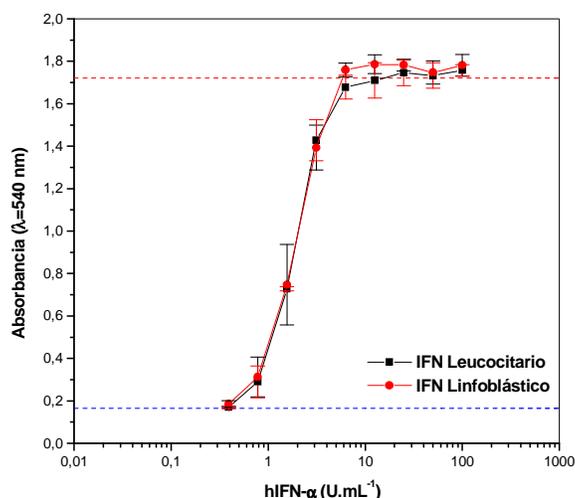


Fig. 34: Valoración de la actividad biológica antiviral in vitro de IFNs.

La actividad biológica fue evaluada mediante la inhibición del efecto citopático producido por el virus VSV sobre células MDBK.

La línea horizontal roja indica el valor promedio de absorbancia correspondiente al control de crecimiento celular en ausencia de virus e IFN. La línea horizontal azul indica el valor promedio de absorbancia del control de máximo efecto citopático producido en ausencia de IFN.

Las barras de error indican las D.S. de las determinaciones realizadas por triplicado.

Para analizar el efecto producido por acción de los scFv sobre la actividad biológica de los IFNs, se calculó la actividad antiviral porcentual con respecto al máximo efecto protector (actividad máxima) ejercido por las citoquinas en ausencia de anticuerpos. La determinación del porcentaje de actividad anti-viral en presencia de sucesivas diluciones de cada scFv fue calculado mediante la ecuación 23 (ver sección 5).

En la Fig. 35 se muestra el efecto neutralizante de la actividad antiviral de los distintos tipos de hIFN- α ensayados por parte de los scFv CA5E6 y CB27H2.

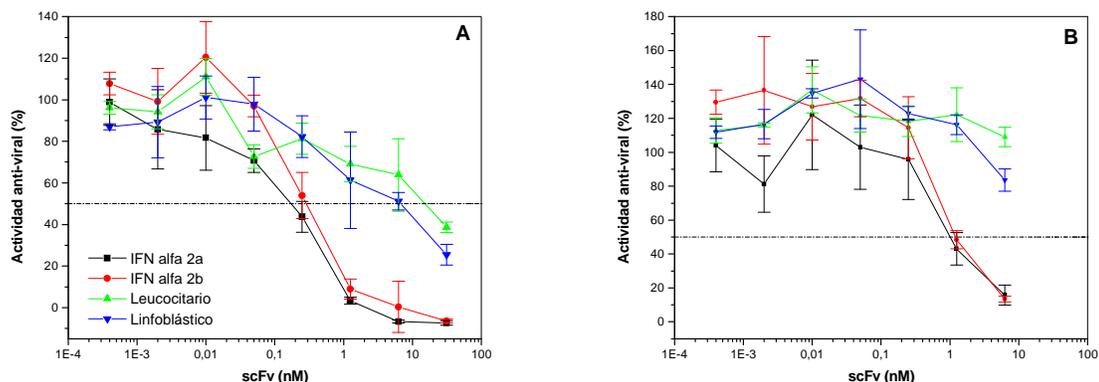


Fig. 35: Neutralización de la actividad biológica antiviral *in vitro* de los IFNs por acción de los scFVs.

En eje de ordenadas se representó el porcentaje de actividad antiviral desarrollada por los IFNs en función de concentraciones crecientes de los fragmentos scFv (eje de abscisas). Las barras de error indican las D.S. de las determinaciones realizadas por triplicado. Se evaluó la actividad neutralizante de los scFv: **(A)** CA5E6 y **(B)** CB27H2. La línea horizontal indica el 50% de la máxima actividad biológica anti-viral *in vitro* desarrollada en presencia de $2 \text{ UI} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cada uno de los IFNs.

Tal como se resume en la Tabla XIII, el fragmento recombinante CA5E6 demostró capacidad para neutralizar, en grado diverso, la actividad biológica antiviral de todos los hIFN- α ensayados, incluidas las especies comprendidas en los denominados IFN leucocitario y linfoblástico. Si bien para estos grupos heterogéneos la capacidad neutralizante del scFv CA5E6 resultó sensiblemente menor que la inhibición de la actividad antiviral correspondiente al rhIFN- α 2b (citoquina que se utilizó como inmunógeno para la obtención del panel de mAbs), es posible que dicho anticuerpo recombinante reconozca, con diferente afinidad, un área molecular compartida por la mayoría de los tipos de IFN- α presentes en las preparaciones y, de esa manera, reduzca la actividad biológica global.

Por otra parte, el scFv CB27H2 en las concentraciones máximas ensayadas resultó incapaz de neutralizar la acción antiviral de los IFN leucocitario y linfoblástico. Cabe destacar un factor que resulta importante en este análisis, referido al hecho de que los mAbs CA5E6 y CB27H2 reconocerían un área molecular común presente en el rhIFN- α 2b según lo observado en los ensayos de competición efectuados para el mapeo de epitopes de la citoquina (grupo IIB, Fig. 16). Por lo tanto, dichos estudios indicarían que el scFv CB27H2 debería reconocer y neutralizar los subtipos de IFN presentes en las mezclas heterogéneas ensayadas de manera análoga al fragmento CA5E6. La divergencia observada, entonces, se explicaría fundamentalmente por la disminución drástica de la afinidad del scFv comparado con el mAb CB27H2 completo (Tabla XII). Esta afirmación puede sostenerse

teniendo en cuenta, además, que la actividad antiviral del rhIFN- α 2b resultó considerablemente menos afectada en presencia del scFv CB27H2 de lo que sucedió cuando la citoquina se incubó con el scFv CA5E6 (capacidades neutralizantes de 3,75 nM y 0,4 nM, respectivamente). Este resultado es coherente considerando la relación existente entre la afinidad de un anticuerpo y su capacidad neutralizante, como fue discutido anteriormente en la caracterización del panel de mAbs.

Tabla XIII: Capacidad neutralizante de la actividad biológica anti-viral *in vitro* de diferentes variedades de IFN- α por parte de los scFv CA5E6 y CB27H2.

	IFN- α 2a	IFN- α 2b	IFN leucocitario	IFN linfoblástico
CA5E6 (nM)	0,21 \pm 0,10	0,40 \pm 0,07	25 \pm 8	12 \pm 8
CB27H2 (nM)	3,12 \pm 1,25	3,75 \pm 0,75	-	-

10. Maduración de la afinidad del scFv CA5E6

El empleo de anticuerpos monoclonales como entidades terapéuticas ha adquirido en las últimas décadas gran interés y aceptación clínica, tal como lo demuestra el incremento en su aprobación para uso humano, y la gran diversidad de ensayos clínicos en ejecución (Holliger y Hudson, 2005).

Para recomendar el uso de un anticuerpo en una dada enfermedad debe existir una correlación entre la misma y el antígeno que describe la especificidad del anticuerpo, el cual debe contribuir significativamente a la patología. Es por ello que la existencia de una correlación comprobada entre la expresión incrementada de diferentes subtipos de IFN- α en diversas enfermedades autoinmunes, justifica la selección del fragmento scFv CA5E6 como potencial candidato terapéutico. Con tal objetivo, y en la búsqueda de mejorar sus propiedades biológicas, se planteó una estrategia orientada a incrementar su capacidad de interacción con la citoquina.

Una vez seleccionado el scFv CA5E6 para continuar con el objetivo de obtener un anticuerpo recombinante de uso terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas al incremento del IFN- α endógeno, se planteó la estrategia incrementar su capacidad de unión a la citoquina.

Formalmente, al considerar el complejo antígeno-anticuerpo, la afinidad de un anticuerpo determina la cantidad de antígeno libre en el equilibrio. Por lo tanto, si se pretende bloquear una proteína soluble (en este caso IFN- α), la magnitud de la constante de afinidad debe ser elevada para lograr una disminución significativa de la concentración de la citoquina libre biológicamente activa. Si bien el fragmento CA5E6 mantuvo en cierta medida las características de unión al antígeno del mAb parental, su constante de afinidad no resultaría suficiente teniendo en cuenta el potencial uso terapéutico del anticuerpo recombinante en desarrollo. Por otro lado, nuestro laboratorio planea en el futuro someter dicho anticuerpo a un proceso de humanización y, eventualmente, de regeneración a un mAb completo (en un marco de secuencias constantes humanas), procedimientos que implican, según la mayoría de las experiencias publicadas, una reducción de hasta 10 veces en la constante de afinidad (Wark y Hudson, 2006). Teniendo en cuenta lo expuesto, se planteó la necesidad de optimizar la intensidad de la interacción entre el anticuerpo y la citoquina en esta etapa del desarrollo.

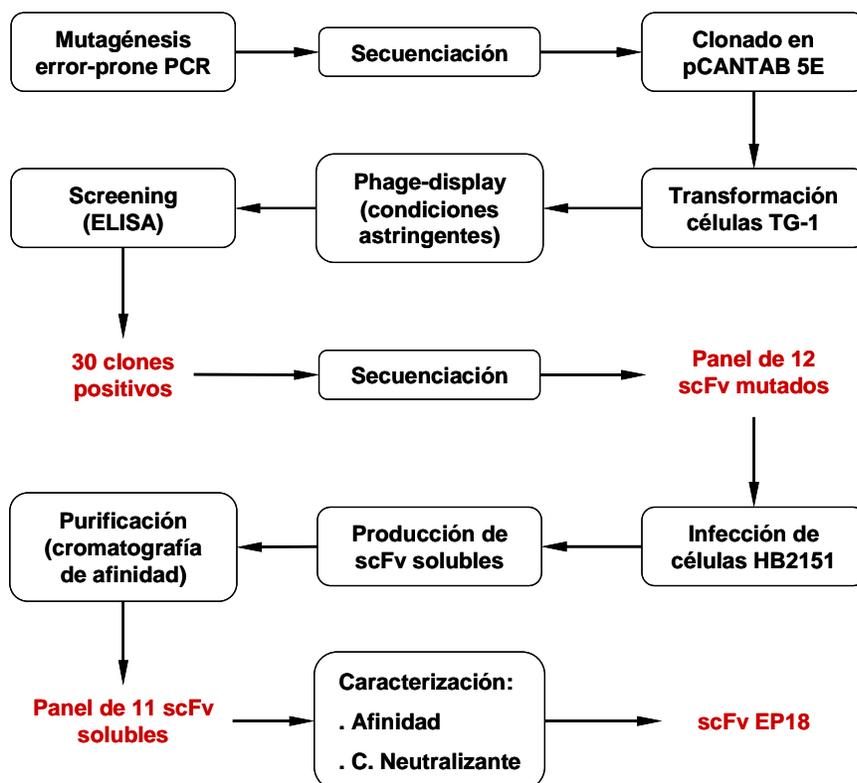


Fig. 36: Esquema general de la estrategia utilizada para la maduración de la afinidad del scFv CA5E6.

El gen que codifica para el fragmento scFv se sometió a un proceso de mutagénesis al azar. Los fragmentos resultantes fueron seleccionados mediante técnica de *phage-display* modificada. Finalmente, se procesó el nuevo panel de scFv solubles caracterizándolo desde el punto de vista de su afinidad y capacidad neutralizante.

La estrategia seleccionada para la maduración de la afinidad se basó en la generación de mutaciones al azar en la secuencia del scFv CA5E6 (mediante *error-prone* PCR), para luego seleccionar aquellos fragmentos resultantes con características de unión mejoradas mediante una variante de la técnica de *phage-display*. El procedimiento de selección se fundamentó en el uso de condiciones astringentes: una menor concentración de rhIFN- α 2b inmovilizado en la fase sólida y el empleo de pH ácido durante las incubaciones. En la Fig. 36 se esquematiza el proceso general de maduración de la afinidad aplicado al fragmento scFv CA5E6.

10.1. Mutagénesis del scFv CA5E6 mediante *error-prone* PCR

Actualmente, existen diversas metodologías para introducir mutaciones en una determinada secuencia proteica en general y, en particular, para llevar a cabo procesos de mejoramiento de la afinidad de anticuerpos. Los procedimientos de mutagénesis *in vitro* tales como *error-prone* PCR, ADN *shuffling* y mutagénesis sitio-dirigida, entre otros, constituyen los métodos más utilizados y ampliamente aceptados para maduración de afinidad de anticuerpos (Wark y Hudson, 2006). En el presente trabajo se utilizó una técnica de mutagénesis al azar sobre la secuencia nucleotídica del scFv CA5E6 que consistió en aumentar la tasa de error de la enzima *Taq Polimerasa* en la PCR mediante el agregado de iones Mn^{2+} en la mezcla de reacción (*error-prone* PCR).

En una primera instancia se llevó a cabo una experiencia que consistió en amplificar mediante técnica de PCR la misma masa de ADN correspondiente al scFv CA5E6 variando la concentración de $MnCl_2$, para evaluar la frecuencia de mutación inducida. En la Fig. 37 se muestran geles de agarosa con los productos de las amplificaciones realizadas en ausencia de Mn^{2+} y en presencia de concentraciones crecientes de dicho catión (0,075; 0,15; 0,3 y 0,6 mM). En estos geles fue notorio que, más allá del incremento en la tasa de mutación esperada, la introducción de Mn^{2+} generó una disminución en la eficiencia de la PCR en términos de la cantidad de ADN amplificado.

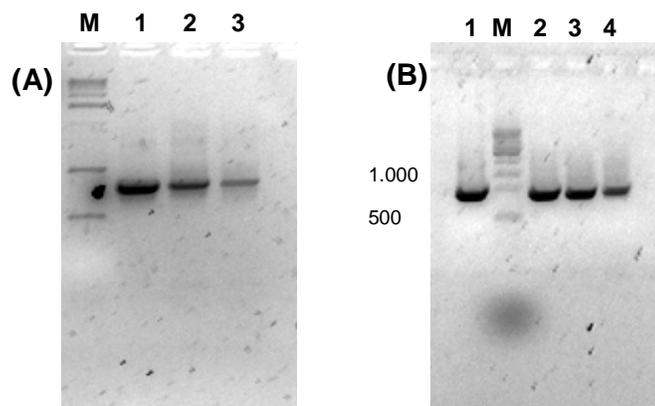


Fig. 37: Evaluación del uso de diferentes concentraciones de MnCl_2 en la técnica de *error-prone PCR*.

Gel A: (M) Marcadores de tamaño molecular (pb), (1) sin agregado de Mn^{2+} , (2) Mn^{2+} 0,3 mM, (3) Mn^{2+} 0,6 mM.

Gel B: (M) Marcadores de tamaño molecular (pb), (1) sin agregado de Mn^{2+} , (2) Mn^{2+} 0,075 mM, (3) Mn^{2+} 0,15 mM, (4) Mn^{2+} 0,3 mM.

Los productos de las amplificaciones realizadas en las distintas condiciones de reacción fueron ligados a un vector de clonado para productos de PCR (pGEM-T easy™) y se transformaron células de *E. coli* DH5 α . A partir de aquellos clones que fueron considerados portadores del plásmido con inserto (750 pb) luego de la digestión enzimática correspondiente, se realizaron preparaciones de ADN plasmídico con el objeto de secuenciar los productos amplificados. Analizando directamente las secuencias de aminoácidos deducidas, se observó que la utilización de Mn^{2+} en la mayor concentración ensayada (0,6 mM) se tradujo en una frecuencia de mutación muy elevada, promediando alrededor de 20 sustituciones aminoacídicas. Adicionalmente, para esta condición se observó en tres de las secuencias obtenidas la existencia de varios codones indicadores de la finalización de la traducción (*STOP*) y de corrimiento del marco de lectura. Por otro lado, para las secuencias obtenidas utilizando concentraciones intermedias del mencionado ión (0,3 mM y 0,15 mM), el número de mutaciones disminuyó, como era esperable, a una cantidad de 9 y 3 aminoácidos sustituidos, respectivamente. Estos valores son ligeramente superiores a los reportados en trabajos publicados que se basan en los procedimientos desarrollados por Cadwell y Joyce (1992) para inducir bajas tasas de mutación, y por Fromant y col. (1995) para tasas de conversión más elevadas, que involucran el uso de Mn^{2+} para disminuir la fidelidad de la enzima Polimerasa. Finalmente, para la menor concentración de ión Mn^{2+} involucrada (0,075 mM) la frecuencia de mutación resultó despreciable, observándose sólo una secuencia modificada (con dos aminoácidos

permutados) de las 9 analizadas. Los resultados hasta aquí expuestos se resumen en la Tabla XIV.

Tabla XIV: Análisis de las secuencias de los productos amplificados en las distintas condiciones de reacción efectuadas con el objetivo de introducir mutaciones en el gen del scFv CA5E6.

MnCl ₂ (mM)	Secuencias		Aminoácidos mutados	
	analizadas	mutadas	por secuencia	promedio
0,6	5	5	23, 16 y ^{sa}	19,5 ^{sb}
0,3	6	6	4, 5, 8, 11, 11 y 15	9
0,15	4	4	1, 2, 3 y 6	3
0,075	9	1	2	0,22

^{sa} Las 3 secuencias restantes presentaron varios codones *STOP* y corrimiento del marco de lectura.

^{sb} Se consideraron sólo las dos secuencias con el número de mutaciones definido. Teniendo en cuenta las secuencias restantes el promedio resultaría más elevado.

A partir de la información relativa a la cantidad de mutaciones de aminoácidos efectivamente producida y la frecuencia de mutación en las distintas condiciones, se decidió procesar el producto amplificado utilizando MnCl₂ en una concentración 0,15 mM, es decir, la condición que generó una media de tres sustituciones aminoacídicas por secuencia. Dicha elección se justifica teniendo en cuenta ciertas presunciones. En primer lugar, se supone que la gran mayoría de los clones pertenecientes a bibliotecas sometidas a altas tasas de mutación resultarían no funcionales debido a la acumulación de un gran número de sustituciones aminoacídicas, aislándose escasos clones positivos (Daugherty y col., 2000). Considerando además que el tamaño de las bibliotecas que se generan y pueden ser sometidas a un *screening*, mediante los procedimientos comúnmente empleados, suele ser pequeño (menor a 10⁵ clones), es probable que aquellas proteínas mutadas con características mejoradas están poco representadas en el conjunto de clones que permanecen funcionales tras un proceso de mutación con elevada frecuencia de mutaciones. Por otro lado, y abonando a una conjetura tal vez de menor validez práctica, se puede argumentar que la evolución natural de las proteínas involucra una acumulación lenta y gradual de modificaciones genéticas. Cabe destacar, sin embargo, que algunos autores registraron resultados más satisfactorios empleando frecuencias de mutación elevadas. Daugherty y col. (2000) analizaron cuantitativamente el efecto de la tasa de mutación por

error-prone PCR sobre la cantidad de clones que permanecen funcionales, y sobre la probabilidad de aislar mutantes con características mejoradas a partir de un anticuerpo scFv. Estos autores encontraron que, para la condición de mayor número de mutaciones por gen, la biblioteca obtenida sólo presentaba un 0,17% de clones funcionales con respecto al número total representado, en comparación con un valor de 40% correspondiente a la biblioteca sometida a la menor tasa de mutación. Sin embargo, los scFv mutantes con una afinidad significativamente superior al anticuerpo *wild type* se encontraban representados entre esa fracción activa muy reducida de la biblioteca mayormente mutada. Este hecho reforzó la hipótesis de dichos autores, quienes afirmaron que es posible, en la práctica, desarrollar una estrategia de mutación al azar empleando tasas de mutación elevadas con el objetivo de llevar a cabo la maduración de la afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes.

10.2. Selección y amplificación de los fragmentos mutantes mediante técnica de *phage-display*

Siguiendo esencialmente las etapas indicadas en Materiales y Métodos, se preparó una biblioteca de fagos recombinantes a partir del producto de *error-prone* PCR obtenido empleando MnCl_2 0,15 mM.

Dicha biblioteca de fagos recombinantes fue sometida a tres rondas de selección y amplificación, inmovilizando en la fase sólida 100 ng de rhIFN- α 2b en las dos primeras y 10 ng de la citoquina en la última ronda. El valor del *OUTPUT* aumentó de $2,5 \cdot 10^4$ ufc.ml⁻¹ en la primera ronda a $1,0 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹ en la segunda, manteniéndose constante tras la última incubación con el antígeno. En esta instancia, realizó un *screening* de scFv solubles mediante ELISA específico indirecto, resultando positivos 60 clones de un total de 94 ensayados. Con el objeto de enriquecer la biblioteca con aquellos scFv que hubieran mejorado su capacidad de unión, y ante el número elevado de clones productores resultantes del proceso de *panning* inicial, se planteó la estrategia de realizar una presión de selección durante la incubación de fagos con el antígeno inmovilizado en la fase sólida, introduciendo variaciones en la composición de la fase líquida utilizada como solución de lavado. De esta manera, los fagos se presentaron al rhIFN- α 2b en diferentes condiciones de pH, desde 5 hasta 2 o con la adición de NaCl en una concentración de 1 M (para bloquear las interacciones electrostáticas) y diluidos en PBS como control del ensayo. La selección de

la condición astringente ácida se basó en trabajos desarrollados previamente en nuestro laboratorio (Ceaglio y col., 2008) que demostraron que el rhIFN- α 2b sólo podía ser cuantitativamente eluido de una matriz de inmovilización (acoplada con el mAb CA5E6) utilizando una solución de glicina 0,1 M pH 2. Es decir, la estrategia de selección se basó en eluir a pH ácido todo aquel fago recombinante que exprese el fragmento scFv CA5E6 *wild type* en su superficie, mientras permanezcan unidos al antígeno aquellos que resistan tal condición y podrían exhibir un incremento en la afinidad debido a las mutaciones incorporadas.

Luego de incubar durante 30 min en las distintas condiciones, se continuó con la técnica habitual. Finalmente, se determinó el valor de *OUTPUT* plaqueando las células TG-1 re-infectadas por los fagos que permanecieron unidos al antígeno inmovilizado en la fase sólida luego de los lavados.

Tabla XV: Panning de la biblioteca scFv CA5E6 mutada empleando diversas condiciones de incubación para el proceso de selección y amplificación.

Condición de incubación	OUTPUT (10^5 ufc.ml ⁻¹)
PBS (control)	1,91
NaCl 1 M	7,00
pH 5	4,75
pH 4	4,71
pH 3	2,13
pH 2	0,25

Como se resume en la Tabla XV sólo se observó un descenso significativo en el valor del *OUTPUT* al incubar los fagos recombinantes en una condición extremadamente ácida (pH 2), resultando de $0,25 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹ frente a un control de incubación en PBS de $1,91 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹. Para las restantes condiciones de pH ensayadas los valores del *OUTPUT* no disminuyeron, registrándose incluso un aumento en los mismos. Por otra parte, cuando se realizó la presentación de dichos fagos ante el antígeno en presencia de NaCl 1 M, la interacción con las proteínas inmovilizadas se vio favorecida según lo sugiere el aumento apreciable del valor de *OUTPUT* correspondiente a esta condición ($7,00 \cdot 10^5$ ufc.ml⁻¹). Probablemente, la existencia de una fuerza iónica elevada favorecería la interacción de tipo

hidrofóbica, en cuyo caso podrían incrementarse las interacciones de naturaleza inespecífica entre la superficie del fago y las proteínas adsorbidas a la placa (rhIFN- α 2b y proteínas de la solución de bloqueo).

La biblioteca de fagos recombinantes resultante del proceso de *panning* efectuado a pH 2 se sometió a un *screening* mediante ELISA específico indirecto. En esta oportunidad, el número de clones positivos resultó de 30 sobre un total de 94 ensayados (la mitad del valor obtenido para la biblioteca antes de efectuar la incubación a pH ácido).

A partir de cultivos de los clones de células TG-1, se obtuvieron muestras de ADN plasmídico para determinar las secuencias nucleotídicas. Como resultado (Tabla XVI), de las 30 muestras procesadas se determinó la existencia de 12 secuencias diferentes con un número variable de de mutaciones nucleotídicas que se tradujeron en la sustitución de 1 a 4 aminoácidos. Adicionalmente, 15 clones no sufrieron mutaciones (secuencias *wild type*), dos clones presentaron la misma mutación (mutación recurrente) y otra secuencia no pudo ser determinada. Finalmente, un gen sufrió una mutación que generó un codón *amber stop*. Este fragmento pudo ser expresado en células TG-1 (cepa supresora) y detectado como clon positivo en el ensayo de *screening*; sin embargo su producción como scFv soluble en células HB2151 no generaría un fragmento funcional dado que dicho codón es reconocido como señal de finalización de la síntesis proteica y, por consiguiente, fue descartado del estudio.

Tabla XVI: Secuenciación de los clones específicos correspondientes a la biblioteca de scFv mutada sometida a ensayo de *panning* en condiciones ácidas (pH 2).

Secuencias con mutaciones	12
Secuencias <i>wild type</i>	15
Secuencia mutada recurrente	1
Secuencia indeterminada	1
Secuencia con codón <i>amber stop</i>	1
TOTAL	30

Siguiendo el protocolo establecido, se utilizaron los fagos recombinantes producidos a partir de los 12 clones de células TG-1 (que demostraron mutaciones en el gen del scFv CA5E6) para infectar células HB2151, con el objeto de obtener los correspondientes anticuerpos solubles. De esta manera, luego de evaluar la productividad mediante ELISA

específico indirecto, se obtuvieron 11 clones de células HB2151 productores de scFv solubles. En consecuencia, un fragmento correspondiente al grupo inicial que reconoció al rhIFN- α 2b cuando se expresó como proteína de fusión con la g3p del fago M13, no conservó su capacidad de reconocimiento del antígeno en condiciones solubles, o bien no se logró aislar un clon de células HB2151 con la productividad necesaria como para identificar al correspondiente scFv soluble mediante el método utilizado.

10.3. Caracterización del panel de fragmentos scFv mutantes

Con el objeto de obtener la masa necesaria de proteína para la caracterización de los scFv mutados, se realizaron cultivos en mayor escala como se detalló anteriormente para los scFv CA5E6 y CB27H2. Seguidamente, cada fragmento mutado fue purificado por cromatografía de afinidad a partir de los correspondientes extractos periplásmicos. En la Fig. 38 se muestra, a manera de ejemplo, la pureza de algunos de los scFv procesados evaluada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.

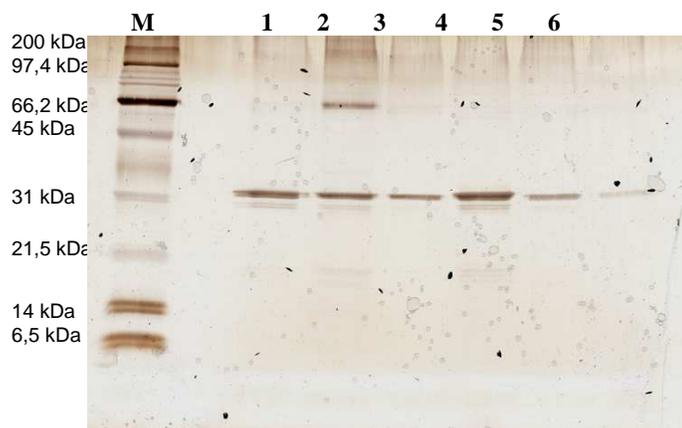


Fig. 38: Evaluación de la purificación de los scFv mutados mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Carriles: (M) marcadores de masa molecular; fragmentos scFv mutados: (1) EP6, (2) EP 11, (3) EP 20, (4) EP 34, (5) EP35 y (6) EP49.

Todas las purificaciones rindieron fragmentos con el mismo grado de pureza (superior al 85%) que fue considerada adecuada para continuar con las etapas siguientes de la caracterización. En el caso del clon EP11, se observó una banda contaminante de peso molecular correspondiente a la forma dimérica del scFv, que aparentemente mantuvo su

integridad aún en las condiciones reductoras en las que se lleva a cabo el ensayo. Esta banda se tuvo en cuenta en la determinación de la concentración de dicho fragmento mediante la lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm.

Luego de la purificación, los scFv mutados fueron estudiados desde el punto de vista de su afinidad por el rhIFN- α 2b. Se llevó a cabo la determinación de la constante de afinidad, como se mencionó en detalle en el estudio del panel de mAbs y en la caracterización de los scFv CA5E6 y CB27H2.

En la Tabla XVII se relacionan la constante de afinidad y el número y tipo de mutaciones correspondientes a cada clon mutante. Más allá del hecho de que todos los scFv mutantes (presentados en la superficie del fago M13) fueron capaces de unir el rhIFN- α 2b inmovilizado en la fase sólida en bajas concentraciones y en presencia de un entorno desfavorable producido por el pH ácido utilizado en las incubaciones, el panel de fragmentos mutados presentó un amplio rango de afinidades. La mayoría de los fragmentos mutados exhibieron constantes de afinidad que no demostraron diferencias estadísticamente significativas con el mAb original. Es decir, sus valores oscilaron entre $1,0 \cdot 10^8$ y $1,7 \cdot 10^8$ M^{-1} . Por otro lado, mientras que los scFv EP18 y EP33 mostraron un incremento en su constante de afinidad ($3,50 \cdot 10^8$ M^{-1} y $3,20 \cdot 10^8$ M^{-1} ; respectivamente), un único fragmento sufrió un descenso significativo en el valor de dicho parámetro. Tal es el caso del scFv EP12, el clon con el mayor número de mutaciones puntuales (4 sustituciones aminoacídicas), cuya constante de afinidad disminuyó 4 veces hasta un valor de $0,37 \cdot 10^8$ M^{-1} , siempre en relación al valor correspondiente al scFv CA5E6 ($1,50 \cdot 10^8$ M^{-1}).

Por lo tanto, una ronda de selección a pH 2 permitió cumplir con el objetivo de reducir el número de clones positivos correspondientes al scFv *wild type* y rescatar 2 clones con afinidades incrementadas (2 a 2,5 veces). Gran parte de los clones que conservaron capacidad de interacción con rhIFN- α 2b a pH 2 demostraron constantes de asociación similares al fragmento original CA5E6. Dado que las condiciones de determinación de dichas constantes (pH 7) son diferentes a las del proceso de selección (pH 2), es probable que las interacciones con el antígeno por parte de tales scFv mutados pudieron ser estabilizadas a pH ácido pero conservaron o incluso disminuyeron (EP12) su energía durante la cuantificación de la constante de afinidad a pH fisiológico.

Tabla XVII: Descripción del panel de fragmentos mutados derivados del scFv CA5E6.

Clon	# mutaciones	Cambio ^a	Posición ^b	Región	K _a (10 ⁸ M ⁻¹)
EP5	2	S88P	88	Fw3 V _H	0,92 ± 0,09
		T51A	189	CDR2 V _L	
EP6	1	R40G	40	Fw2 V _H	1,01 ± 0,01
EP11	2	V34M	34	CDR3 V _H	1,43 ± 0,07
		S56G	194	CDR2 V _L	
EP12	4	I78V	78	Fw3 V _H	0,37 ± 0,09
		T107A	107	CDR3 V _H	
		S122P	122	Fw4 V _H	
		D70E	208	Fw3 V _L	
EP18	1	T58A	58	CDR2 V _H	3,50 ± 0,10
EP20	1	I48V	186	Fw2 V _L	1,40 ± 0,10
EP33	2	E42G	42	Fw2 V _H	3,20 ± 0,30
		M11V	149	Fw1 V _L	
EP34	3	V104L	104	CDR3 V _H	1,13 ± 0,04
		G129D	129	Linker	
		S12T	150	Fw1 V _L	
EP35	1	E10V	10	Fw1 V _H	1,23 ± 0,02
EP36	2	R40G	40	Fw2 V _H	1,50 ± 0,10
		S56R	194	CDR2 V _L	
EP49	1	K24R	24	Fw1 V _H	1,70 ± 0,01

^a Numeración individual de las cadenas variables según Chotia y col. (1987)

^b Numeración continua incluyendo el *linker*. CDR, *complementary determining regions*; Fw, *framework*.

En general, las mutaciones se centraron tanto en regiones CDR (35%) como en regiones FR (75%). Para aquellos clones en los cuales se observaron cambios significativos en la afinidad (EP12 y EP33) las mutaciones se orientaron fundamentalmente a las regiones FR, con excepción de EP18 donde se produjo una única mutación en la región CDR.

Si bien se postula que las modificaciones en las regiones CDRs son las de mayor impacto en el mejoramiento de la afinidad de los anticuerpos, recientemente se ha sugerido que las mutaciones ocurridas en los *frameworks* producen, por sí mismas o en conjunción con modificaciones en las zonas de contacto con el antígeno, un aumento en la magnitud de dicho parámetro. Así, el estudio realizado por Daugherty y col. (2000) demostró que las sustituciones ocurridas en regiones distantes al sitio de unión prevalecían en los anticuerpos mutantes con características mejoradas. Por otro lado, las mutaciones en las regiones *framework* tienen, adicionalmente, incidencia en el nivel de expresión y estabilidad de anticuerpos recombinantes producidos en bacterias. En este sentido, se ha demostrado que dichos cambios contribuyen a la generación de moléculas con una estabilidad funcional mejorada, de forma complementaria a la optimización de afinidad (Riaño-Umbarila y col., 2005). Estos resultados ilustran que las sustituciones aminoacídicas alejadas de los sitios de unión propiamente dicho pueden ejercer profundos efectos en la afinidad y resaltan la utilidad de la mutagénesis realizada al azar para la maduración de la afinidad. En el

presente trabajo, los dos scFv mutantes que mostraron un aumento significativo en su constante de afinidad presentaron sustituciones aminoácidas diferentes en su secuencia. Por un lado, el clon EP18 expresó un scFv con una única mutación en el CDR2 de la cadena pesada, mientras que en el caso del clon EP33, el fragmento producido presentó dos mutaciones puntuales en el Fw1 de la cadena liviana y en el Fw2 de la cadena pesada, respectivamente. A pesar de estas divergencias, ambos scFv mutantes mostraron un incremento similar en su constante de afinidad, hecho que se adscribe a la idea de que el mejoramiento de la afinidad funcional de los anticuerpos resulta de mecanismos diversos y poco predecibles.

A continuación, se estudió la capacidad neutralizante de la actividad biológica anti-viral *in vitro* del hIFN- α por parte de los scFv EP18 y EP33. Sólo se utilizó el rhIFN- α 2b para determinar si se producía una variación significativa de la capacidad neutralizante como consecuencia del aumento de la magnitud de la constante de afinidad de dichos scFv mutantes. Si bien ambos fragmentos presentaron características de unión al antígeno similares, el scFv EP18 demostró una capacidad neutralizante levemente superior al fragmento CA5E6 “*wild type*” (0,20 nM y 0,40 nM, respectivamente), mientras que fue necesaria una mayor concentración del scFv EP33 (1,00 nM) para neutralizar la misma masa de rhIFN- α 2b. Las divergencias entre los valores obtenidos para los dos scFv mutados podrían atribuirse a diferencias en la estabilidad funcional de los fragmentos en las condiciones desarrolladas para determinar la actividad neutralizante de tales moléculas. Es por ello que la mejora en la afinidad no constituyó un parámetro directamente extrapolable al incremento de la actividad neutralizante del scFv EP33. Es probable que las mutaciones ocurridas en las regiones Fw de este fragmento afecten otras propiedades como su estabilidad, factor de gran importancia a considerar para la producción de tales moléculas (Breitling y Dübel, 1999). En el caso del scFv EP18, se consideró relevante el parámetro de la afinidad, considerando que la capacidad neutralizante *in vitro* se mantuvo en relación al mAb CA5E6 completo resultando incluso superior.

La magnitud de la constante de afinidad del scFv EP18 (tras la estrategia planteada para optimizar dicho parámetro) resultó ligeramente elevada en comparación con la correspondiente al fragmento CA5E6 original, lográndose un incremento de 2,3 veces (de $1,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ hasta $3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Sin embargo, se consideró importante este resultado teniendo en cuenta que otros autores lograron resultados similares con esta estrategia (Saviranta y col., 1998) y que se produjo en el marco de la primera etapa de un proceso más

amplio, con el objeto de desarrollar anticuerpos recombinantes para uso terapéutico humano. En este sentido, en la mayoría de los trabajos publicados relacionados con el mejoramiento de la afinidad de fragmentos recombinantes de anticuerpos, y que involucran la utilización de la técnica de *error-prone* PCR, se realizan varias rondas de maduración de la afinidad, seguidas por diferentes estrategias de selección de aquellos mutantes con características mejoradas, proceso que en general recibe el nombre de “evolución dirigida”. Aún más, en dichos procesos se combinan otras estrategias de maduración de la afinidad al azar, tales como *DNA shuffling* (Boder y col., 2000) y *chain shuffling* (Schier y col., 1996), o bien aproximaciones más racionales, como la combinación de secuencias con mutaciones puntuales obtenidas por *error-prone* PCR en un solo fragmento recombinante (Riaño-Umbarila y col., 2005), para citar algunos ejemplos significativos.

Por otro lado, al evaluar el fragmento scFv EP18 en su capacidad neutralizante de la actividad biológica de la mezcla heterogénea de IFN- α s (IFN leucocitario y linfoblástico) no se visualizó un incremento con respecto a la actividad exhibida por el scFv CA5E6. Probablemente, la moderada mejora en la afinidad no contribuyó significativamente a la visualización de un incremento, o bien, la presencia de la correspondiente mutación en el CDR2 mejoró la interacción con algunas variedades y la disminuyó con otras, lo que *a priori* podría haber contribuido a preservar la capacidad neutralizante ya observada.

Indudablemente, es necesario continuar con la estrategia de maduración de la afinidad de los fragmentos recombinantes. Por ejemplo, utilizando el scFv EP18, seleccionado en esta etapa del proceso, como punto de partida para otra ronda de *error-prone* PCR, manteniendo las condiciones aquí establecidas o introduciendo modificaciones en parámetros tales como la tasa de mutación empleada o incorporando un proceso de selección de aquellos fragmentos con mayor afinidad por la citoquina soluble en concentraciones subnanomolares (Chames y Hoogemboom, 2004), como se discutió anteriormente.

En el presente trabajo de tesis se obtuvo un fragmento recombinante a partir de un mAb (CA5E6) seleccionado por sus características de unión con el rhIFN- α 2b, que fue capaz de inhibir la acción anti-viral de un conjunto heterogéneo de hIFN- α s, optimizándose su afinidad hasta el punto, en una primera instancia, de incrementar su valor al de la afinidad correspondiente al mAb completo original ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del scFv EP18 frente a $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del mAb CA5E6).

11. Neutralización de la actividad biológica antiproliferativa *in vivo* del rhIFN- α 2b por acción del mAb CA5E6

Para completar la etapa preliminar, que involucra parte de este trabajo de Tesis en la búsqueda de un anticuerpo con propiedades neutralizantes del exceso de IFN-alfa endógeno producido en determinadas patologías humanas, se realizó un ensayo exploratorio o de concepto para valorar tal actividad *in vivo*.

Con ese fin, empleando una estrategia que involucró el uso de células PC-3 tumorales humanas (de origen prostático) y ratones *nude* atímicos se evaluó la actividad neutralizante *in vivo* del anticuerpo original mAb CA5E6. En una primera instancia se estudiaron las condiciones óptimas de ejecución del ensayo, analizando la actividad antitumoral del rhIFN- α 2b mediante el estudio de su capacidad para disminuir el crecimiento de tumores sólidos implantados en dichos ratones inmunocomprometidos. Para ello, dos días posteriores a la implantación de las células tumorales, los animales fueron divididos en dos grupos: uno recibió tratamiento con 33.000 UI de rhIFN- α 2b tres veces por semana y el otro recibió con la misma frecuencia un placebo constituido por solución diluyente de IFN (grupo control). En la Fig. 39A se comparan los volúmenes de los tumores desarrollados por los ratones de ambos grupos, medidos semanalmente. El tratamiento con IFN produjo una disminución en la velocidad de crecimiento tumoral en comparación con los animales del grupo control. De esta manera, el volumen de los tumores de los ratones sometidos a terapia con la citoquina se mantuvo por debajo de los valores obtenidos para los ratones tratados con placebo durante todo el tratamiento, acrecentándose las diferencias al finalizar el mismo. Así, luego de 4 semanas de terapia, los tumores del grupo tratado con la citoquina exhibieron un volumen promedio del 45,5% con respecto al control ($0,5 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ versus $1,1 \pm 0,3 \text{ cm}^3$, respectivamente, $p = 0,035$).

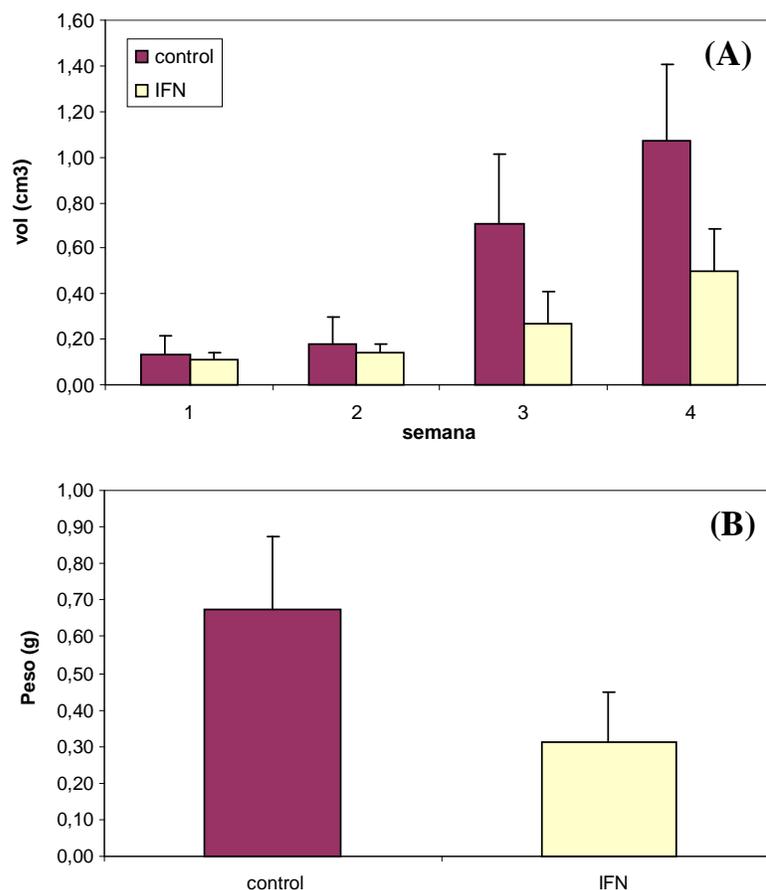


Fig. 39: Actividad biológica antiproliferativa *in vivo* de rhIFN- α 2b sobre tumores sólidos de células PC-3 generados en ratones *nude*.

- A. Siete días posteriores al inicio del tratamiento comenzó la medición semanal del volumen de los tumores, asumiendo una geometría elíptica de los mismos y aplicando la ecuación 17. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del promedio de cada grupo: control (n = 3) e IFN (n = 6).
- B. Luego de 4 semanas de tratamiento se extrajeron y pesaron los tumores desarrollados. Las barras de error corresponden a la D.S. del promedio de cada grupo: control (n = 3) e IFN (n = 6).

Luego de cuatro semanas de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos para la determinación de su peso. La Fig. 39B muestra los pesos promediados de los tumores de los animales correspondientes a los dos grupos estudiados (0,67 g para el grupo control y 0,31 g para el grupo de animales tratados con la citoquina). Mediante la aplicación del test *t* de Student para dos grupos con igual varianza (hecho que se comprobó mediante la prueba F), se determinó la existencia de diferencias significativas entre las medias de los dos tratamientos ($p = 0,007$), confirmándose la actividad antiproliferativa del rhIFN- α 2b sobre el crecimiento de las células tumorales humanas PC-3.

Por otro lado, se establecieron las condiciones adecuadas del ensayo para estudiar el efecto neutralizante del mAb CA5E6 sobre la actividad antitumoral de la citoquina.

La opción de utilizar en este ensayo el anticuerpo completo original en lugar del scFv EP18 derivado (de mayor afinidad) se basó fundamentalmente en el hecho de que los fragmentos de cadena única presentan una vida media *in vivo* muy reducida (Haunschild y col., 1995). Esta característica puede resultar ventajosa cuando se utilizan dichos fragmentos recombinantes conjugados con toxinas o isótopos radiactivos en el tratamiento y localización de tumores. En el caso de la neutralización de moléculas solubles, presentes en circulación, una velocidad de *clearance* plasmático elevada podría comprometer la interacción del anticuerpo con su antígeno, desplazando incluso el equilibrio de unión hacia las especies libres. A pesar de que la neutralización se realizó preincubando la citoquina con el anticuerpo *in vitro*, los equilibrios que se producen en el organismo podrían conducir a la rápida eliminación del fragmento scFv. De esta manera, la citoquina no se mantendría neutralizada. De acuerdo con esta idea, se decidió estudiar la habilidad del mAb completo para neutralizar la actividad biológica *in vivo* del rhIFN- α 2b, considerando que su región variable (constituyendo una conformación molecular del tipo scFv) demostró capacidad de neutralización *in vitro* comparable a la del anticuerpo parental. Cabe destacar aquí que dicha región podría utilizarse para generar un nuevo anticuerpo completo, por la adición de cadenas constantes humanas, tal como se proyecta en etapas posteriores a este trabajo de tesis, y como parte del proceso global de obtención de anticuerpos recombinantes anti-hIFN- α .

En este ensayo, ratones *nude* que previamente habían sido inoculados con las células tumorales PC-3 se dividieron en tres grupos de ocho animales que fueron sometidos a distintos tratamientos. Por un lado, a un grupo se le suministraron 33.000 UI de rhIFN- α 2b. Un segundo grupo fue tratado con la misma dosis de rhIFN- α 2b previamente incubado con el mAb CA5E6 en una proporción molar de 1:10 (IFN:mAb) y, por último, un tercer grupo (control) fue inyectado sólo con la solución diluyente utilizada en los tratamientos anteriores. Todos los grupos fueron tratados con tres dosis semanales de cada solución durante 5 semanas.

En la Fig. 40 se grafican los volúmenes tumorales promedios obtenidos para cada grupo como resultado de las mediciones semanales. En este caso, los ratones correspondientes al grupo tratado con rhIFN- α 2b desarrollaron, en promedio, tumores de

menor tamaño en comparación con los tumores correspondientes al grupo control. Por otro lado, los animales tratados con la citoquina previamente incubada con el mAb CA5E6 desarrollaron tumores de dimensiones similares a los del grupo control, observándose así un fenómeno de neutralización de la acción antitumoral del rhIFN- α 2b por parte del mAb ensayado.

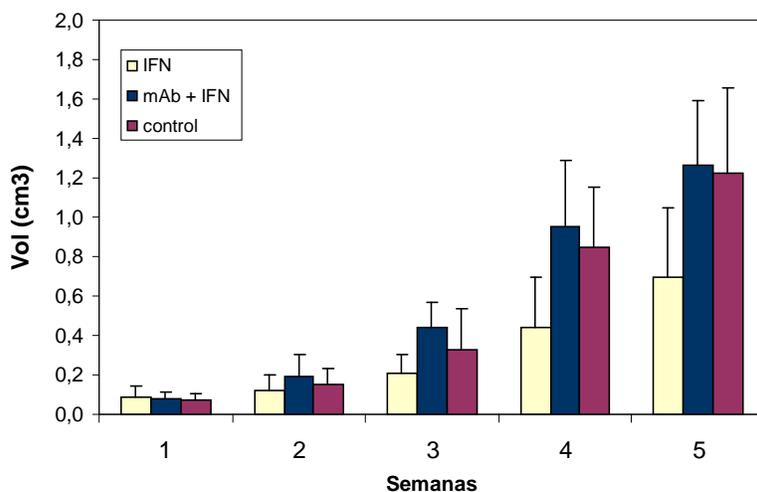


Fig. 40: Evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad antitumoral *in vivo* del IFN por acción del mAb CA5E6 .

Se graficó la evolución del volumen tumoral en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento. El volumen de los mismos se midió semanalmente, asumiendo una geometría elíptica y aplicando la ecuación 17. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del promedio de cada grupo (n = 8).

Para evaluar de manera más precisa el efecto de los distintos tratamientos sobre la velocidad de crecimiento de los tumores, se utilizaron los datos de los volúmenes promedio de cada grupo determinados durante las tres últimas semanas, momento a partir del cual comenzaron a visualizarse diferencias significativas en la proliferación neoplástica. Estos valores se graficaron y se ajustaron a una recta, cuya pendiente representa la velocidad promedio de crecimiento de los tumores en cada grupo (Fig. 41).

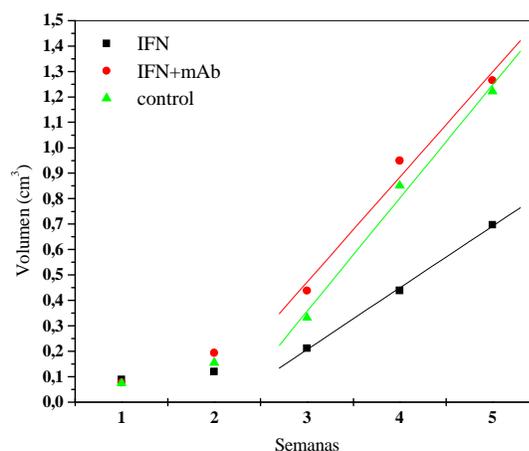


Fig. 41: Velocidad de crecimiento de los tumores de células PC-3 desarrollados por ratones *nude* sometidos a distintos tratamientos.

Se calculó la velocidad de crecimiento de los tumores a partir de la regresión lineal de las mediciones efectuadas durante las últimas 3 semanas del ensayo.

De esta manera, se confirmaron los resultados previos, estableciendo que los tumores desarrollados por los animales tratados con IFN crecieron con una velocidad menor que los correspondientes a los ratones control ($0,24 \pm 0,01 \text{ cm}^3 \cdot \text{sem}^{-1}$ y $0,44 \pm 0,04 \text{ cm}^3 \cdot \text{sem}^{-1}$, respectivamente). Paralelamente, se observó que los ratones tratados con la citoquina incubada con el mAb CA5E6 no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de crecimiento tumoral con respecto al grupo control ($0,41 \pm 0,06 \text{ cm}^3 \cdot \text{sem}^{-1}$ y $0,44 \pm 0,04 \text{ cm}^3 \cdot \text{sem}^{-1}$, respectivamente). Asimismo, la velocidad de crecimiento tumoral del grupo tratado con el mAb fue significativamente superior (1,7 veces) a la correspondiente a los ratones tratados sólo con rhIFN- $\alpha 2b$. Los resultados se resumen en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII: Velocidades de crecimiento de los tumores de células PC-3 desarrollados por los ratones *nude* sometidos a distintos tratamientos.

Grupo	Vel. crecimiento del tumor ($\text{cm}^3 \cdot \text{sem}^{-1}$)
IFN	$0,24 \pm 0,01$
IFN+mAb	$0,41 \pm 0,06$
Control	$0,44 \pm 0,04$

Luego de la quinta semana de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos para la determinación de su peso (Fig. 43). En la Fig. 42 se presenta una fotografía de los tumores extraídos a partir de cada grupo, donde se advierte a simple vista la diferencia de tamaños alcanzado luego de 5 semanas de tratamiento. En forma macroscópica, se puede observar que la disminución del crecimiento tumoral fue acompañada por una reducción de la vascularización del carcinoma en los ratones que recibieron la terapia con IFN. Los efectos antitumorales del IFN- α no sólo se atribuyen a su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales de diferentes orígenes histológicos, sino también a sus efectos antiangiogénicos. El crecimiento progresivo y la metástasis de tumores malignos depende de una neovascularización adecuada, cuyo alcance se encuentra determinado por el balance entre las moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas liberadas por las células cancerígenas y las células adyacentes del huésped (Folkman y Shing, 1992). Se ha demostrado que el IFN- α disminuye la expresión de metaloproteínas de matriz-9 (MMP-9, *matriz metalloproteinase-9*), el factor de crecimiento endotelio vacular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e IL-8, reduciendo así la formación de vasos sanguíneos y contribuyendo a la inhibición del desarrollo tumoral (Slaton y col., 1999; Solórzano y col., 2003).



Fig. 42. Tumores de células humanas PC-3 extraídos de los animales sometidos a los distintos tratamientos.

Los tumores se desarrollaron en el flanco trasero izquierdo de los ratones inmunocomprometidos. Luego de cinco semanas de tratamiento los tumores se extrajeron quirúrgicamente luego de sacrificar los animales. Macroscópicamente se observa el mayor tamaño de los tumores correspondiente a los ratones que recibieron la terapia con mAb en comparación con los tratados con IFN solamente.

Los tumores correspondientes a cada grupo fueron pesados individualmente y los valores obtenidos se promediaron para obtener un valor representativo de cada tratamiento.

La Fig. 43 muestra los pesos promedios de los tumores correspondientes a cada grupo. El conjunto de los datos obtenidos se procesó estadísticamente por análisis de la varianza (ANOVA), que arrojó como resultado la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p = 0,027$).

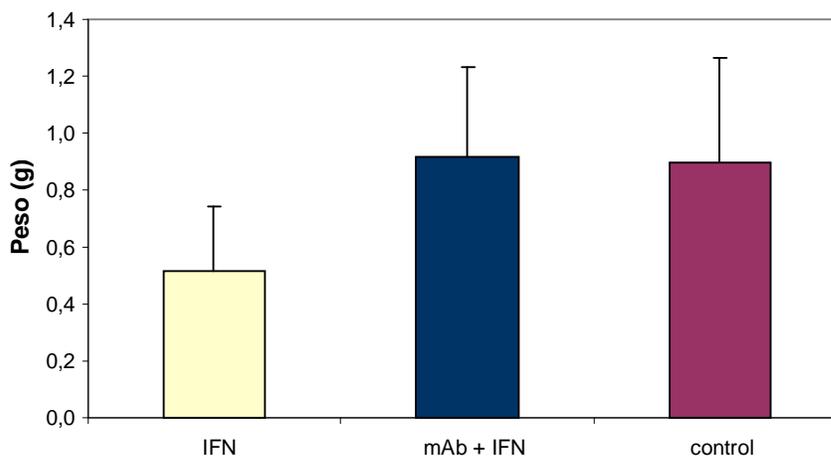


Fig. 43: Peso promedio de los tumores extraídos de los ratones *nude* sometidos a diferentes tratamientos.

Luego de 5 semanas de tratamiento se extrajeron y pesaron los tumores desarrollados. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del promedio de cada grupo ($n = 8$).

Los grupos correspondientes a los tratamientos con rhIFN- α 2b y con esta citoquina en presencia del mAb CA5E6 fueron analizados con el objeto de determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre el peso de los tumores desarrollados (0,51 g y 0,91 g, respectivamente). Mediante el uso del test t de Student para grupos con varianza diferente, hecho que se determinó previamente mediante la prueba F, se comprobó la existencia de una diferencia significativa entre los dos tratamientos con un valor de $p = 0,011$. Por otro lado, en este ensayo se confirmó la diferencia entre el tratamiento con IFN y el tratamiento control en cuanto a la disminución del peso promedio de los tumores (0,51 g y 0,81 g, respectivamente). Así, aplicando nuevamente el test t de Student, la diferencia entre estos grupos resultó estadísticamente significativa, con un valor de $p = 0,02$. Asimismo, no se observó diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de animales tratados con el mAb ($p = 0,3$) confirmando el bloqueo de la actividad biológica del IFN. Por lo tanto, se puede concluir que el mAb CA5E6 fue capaz de neutralizar la acción antiproliferativa de la citoquina en un sistema *in vivo*, proyectando el potencial terapéutico de esta inmunoglobulina.

CONCLUSIONES

Los procesos de hibridación llevados a cabo rindieron 55 líneas de hibridomas productoras de anticuerpos anti-rhIFN- α 2b. Se clonaron 22 líneas de hibridomas, seleccionándose 50 clones, 11 de los cuales fueron amplificados *in vivo* para la producción de mAbs en líquido ascítico. El panel de mAbs quedó constituido por las inmunoglobulinas producidas por los hibridomas CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB13A7, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3 y CB33B3. Cada mAb fue purificado por cromatografía de afinidad a proteína A, obteniéndose con el grado de pureza adecuado para llevar a cabo los posteriores ensayos planteados.

Todos los mAbs demostraron capacidad de reconocimiento específico de rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida, con títulos diferentes dependiendo de la concentración de inmunoglobulinas y de la afinidad aparente de los mismos. De la misma manera, todos los mAbs exhibieron capacidad para reconocer a la citoquina en su estado nativo, observándose un rango de afinidades que osciló entre $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $1,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Con el objeto de describir la especificidad de los epitopes reconocidos por cada mAb, estableciendo una ubicación relativa de los mismos en la molécula del rhIFN- α 2b, se desarrollaron ensayos de competición entre pares de mAbs. Se comparó la habilidad recíproca de cada mAb biotinilado para inhibir la interacción de los restantes anticuerpos con la citoquina inmovilizada en fase sólida. La capacidad de competición cruzada total, parcial o la ausencia de la misma y, en algunos casos, la propiedad mejoradora de determinados anticuerpos, permitieron delimitar 5 áreas relativamente diferentes de la molécula del rhIFN- α 2b reconocidas por los 11 mAbs del panel. El área I mapeada por el mAb CA1A3; el área II reconocida por los anticuerpos CA2G7, CA5E6, CB15D7, CB27H2, CB29D3 y CB33B3; la región III identificada por los mAbs CA8B7 y CB24D5 y la región IV mapeada por los mAbs CA9C3 y CB13A7. Pequeñas diferencias en sus perfiles competitivos fueron observadas a nivel de la región II, lo que indicaría el reconocimiento de epitopes diferentes situados en un área molecular común. Estas variaciones permitieron subdividir la región II en dos áreas: IIA (mapeada por CB15D7, CB29D3 y CB33B3) y IIB (mapeada por CA2G7, CA5E6 y CB27H2).

Cada inmunoglobulina constituye una entidad diferente, y a pesar de que grupos de anticuerpos presentaron similar especificidad por el epítopo identificado, existirían mínimas variaciones estructurales responsables de alteraciones a nivel del reconocimiento antigénico. Dichas variaciones dificultaron el agrupamiento de los mismos durante el mapeo de epítopos de la citoquina, manifestándose en forma más notoria al analizar otras propiedades de los anticuerpos como, por ejemplo, la capacidad de reconocimiento de la molécula parcialmente desnaturalizada o las propiedades neutralizantes de la actividad biológica del IFN. Así, anticuerpos que fueron agrupados en áreas moleculares comunes mediante el método competitivo, evidenciaron comportamientos diferentes cuando se analizaron otras propiedades de los mismos. De todas maneras, el mencionado método permitió clasificar a los anticuerpos según su capacidad para reconocer 4 áreas relativamente diferentes entre sí (I, II, III y IV) identificándose, para un área en particular, variaciones en el comportamiento de los mAbs que la mapearon. Estas variaciones son inherentes a la naturaleza de los anticuerpos.

Con el objeto de seleccionar mAbs apropiados para desarrollar y optimizar metodologías inmunoquímicas útiles para la detección y cuantificación del rhIFN- α 2b, se llevaron a cabo ensayos de *Western-Blot*, *Dot-Blot* y *ELISA sandwich*. En todos los casos analizados, los mAbs que mapearon las regiones I y II de la molécula, salvo algunas excepciones, demostraron utilidad para llevar a cabo cualquiera de los métodos inmunoquímicos planteados. En particular, el anticuerpo CB27H2 presenta propiedades que determinaron su elección como anticuerpo apto para ser utilizados en todos los métodos mencionados, demostrando la mayor señal inmunorreactiva mediante técnica de *Western-Blot*, la mayor capacidad de detección de la citoquina mediante técnica de *Dot-Blot* y elevada capacidad de detección de la citoquina nativa empleando técnica de *ELISA sandwich* con fines cuantitativos.

Adicionalmente, trabajos posteriores en nuestro laboratorio permitieron seleccionar 4 mAbs que reconocen áreas moleculares diferentes de la citoquina no glicosilada (CA1A3, CB15D7, CA5E6 y CA9C3) con el fin de disponer de sistemas adecuados para cuantificar nuevas variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b (Ceaglio y col., 2008). El panel de mAbs obtenido en este trabajo de Tesis permitió seleccionar anticuerpos capaces de reconocer epítopos de las variantes glicosiladas del IFN que no resultan modificados por la presencia de carbohidratos, exhibiendo la misma afinidad por sus epítopos homólogos presentes en la citoquina no glicosilada. Esta propiedad permitió el diseño de un sistema de cuantificación

basado en el mAb CA5E6 que demostró la misma respuesta frente a concentraciones similares de analito (variante glicosilada) o sustancia de referencia (IFN no glicosilado).

Los ensayos de neutralización de la actividad biológica *in vitro* del rhIFN- α 2b demostraron que los mAbs CB27H2, CA1A3, CB15D7, CA2G7, CA5E6 y CB29D3 exhiben, en forma equivalente, capacidad para inhibir la actividad biológica antiviral del rhIFN- α 2b, resultando los anticuerpos CA1A3 y CB27H2 los que demostraron mayor acción neutralizante. Los mAbs CB15D7, CA2G7, CA5E6 y CB29D3 neutralizaron en diferente medida la actividad antiviral de la citoquina, observándose en general un mayor grado de neutralización cuando la afinidad de los mAbs fue mayor. De todas maneras, la capacidad para inhibir la actividad biológica *in vitro* de la citoquina por parte de los mAbs CA1A3, CB27H2, CA2G7, CA5E6, CB15D7, CB29D3, indicaría la importancia de las regiones moleculares I y II como áreas próximas o incluidas en los dominios del rhIFN- α 2b involucrados en la interacción con su receptor.

Por otro lado, los anticuerpos estudiados demostraron acción neutralizante de la actividad biológica *in vitro* del IFN- α 2b pero no así del IFN- β . Este hecho adquiere una importancia relevante dado que ciertas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso y la esclerosis múltiple correlacionan con los niveles de expresión de IFN- α , pero no de IFN- β . En el caso de la esclerosis múltiple, el IFN- β es la droga de elección para su tratamiento. Sin embargo, debieron suspenderse ensayos clínicos con IFN- α debido a que los pacientes progresaban rápidamente en su enfermedad. Dado que los anticuerpos estudiados neutralizan la actividad del IFN- α 2b dejando intacta la actividad del IFN- β , su empleo para el tratamiento de las patologías mencionadas permitiría retener en forma significativa la actividad antiviral de esta última citoquina.

Finalmente, teniendo en cuenta la habilidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* del IFN- α 2b, la capacidad para mapear diferentes áreas moleculares de la citoquina y el valor de sus constantes de afinidad, los mAbs CA1A3, CA5E6, CB15D7 y CB27H2 fueron seleccionados para la preparación de fragmentos recombinantes scFv.

La estrategia de obtención de fragmentos scFv recombinantes a partir de hibridomas productores de mAbs involucró la extracción del ARN total de dichas células, la purificación del ARN mensajero correspondiente y el clonado de las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y de la cadena liviana (V_L) de forma individual. Una vez obtenidos, los

fragmentos de ADN de cada cadena se ensamblaron mediante un *linker* flexible para constituir los fragmentos scFv. Luego de llevar a cabo el procedimiento de *phage-display* sólo fue posible seleccionar clones productores de scFvs con capacidad de reconocimiento específico del rhIFN- α 2b correspondientes a los mAbs CA5E6 y CB27H2.

A partir de la información obtenida del análisis de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las regiones variables de los mAbs, se encontró que la región V_H del mAb CA1A3 presentaba elevada homología (97,5%) con una cadena aberrante no funcional derivada de ciertas células de mieloma utilizadas en los procesos de fusión (como la línea MOPC-21 de la cual deriva el mieloma NS0 que se empleó en el presente trabajo de Tesis). Estas cadenas aberrantes podrían ser silenciadas o segregadas durante el proceso de estabilización de un hibridoma emergente y por lo tanto, como ocurre generalmente en la mayoría de los hibridomas, no expresarse. En otros casos, como en el hibridoma CA1A3, las cadenas aberrantes podrían diluir ampliamente la secuencia de las regiones variables correctas, dificultando la posibilidad de obtener anticuerpos funcionales (Kreber y col., 1997).

Con respecto al fragmento CB15D7, los oligonucleótidos empleados para ensamblar las cadenas V_H y V_L en un fragmento único rindieron en todos los casos ensayados un producto de tamaño inferior al esperado. Por otro lado, la secuenciación individual de cada región variable del anticuerpo evidenció un elevado grado de homología con las correspondientes al mAb CB27H2, confirmando el similar comportamiento inmunoquímico de ambos anticuerpos en los ensayos de mapeo de epitopes.

Los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2 fueron producidos en forma soluble en el espacio periplásmico de la bacteria *E. coli* HB2151. A partir de los extractos periplásmicos correspondientes fue posible purificar dichos scFv mediante cromatografía de afinidad, obteniéndose un grado de pureza adecuado para las siguientes etapas de caracterización de los fragmentos recombinantes.

El procesamiento llevado a cabo para preparar fragmentos scFv a partir de sus inmunoglobulinas parentales puede generar modificaciones en el arreglo estructural o conformacional del sitio de reconocimiento antigénico que afecten la especificidad y/o afinidad de los mismos. En particular, la especificidad de los fragmentos frente al IFN fue confirmada para ambos anticuerpos recombinantes (scFv CA5E6 y CB27H2). Por lo tanto,

con el fin de evaluar si las nuevas moléculas presentaron modificaciones a nivel de la energía de interacción con su antígeno específico, se llevaron a cabo ensayos para medir la constante de afinidad de cada fragmento. En el caso del scFv CA5E6 no se observó una disminución significativa de la afinidad con respecto al mAb completo ($1,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Por otro lado, el fragmento CB27H2 presentó una disminución notable en su afinidad comparándolo con su correspondiente mAb ($0,37 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $11,00 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). En este caso, la pérdida de las regiones constantes afectaría la conformación adoptada por el sitio de unión al epítopo, no pudiendo aportar, el *linker* flexible, una estabilización adicional. Contrariamente, en el fragmento scFv CA5E6 la estabilización de las regiones variables asistida por el mencionado *linker* resultó eficiente para retener en gran medida la afinidad del anticuerpo de origen.

Aun considerando el hecho de que los mAbs fueron generados utilizando únicamente una variante del hIFN- α , se planteó la posibilidad de estudiar la capacidad neutralizante de la actividad biológica antiviral de un grupo heterogéneo de subtipos de esta citoquina por parte de los scFv CA5E6 y CB27H2. El fragmento CA5E6 demostró capacidad para neutralizar, en grado diverso, la actividad biológica antiviral de todos los hIFN- α ensayados, incluidas las especies comprendidas en los denominados IFN leucocitario y linfoblástico. Si bien en estos últimos casos la capacidad neutralizante resultó sensiblemente menor que la inhibición de la actividad antiviral correspondiente al rhIFN- α 2b, es posible que dicho anticuerpo recombinante reconozca, con diferente afinidad, un área molecular compartida por la mayoría de los tipos de IFN- α presentes en las preparaciones y, de esa manera, reduzca la actividad biológica global. Por otra parte, el scFv CB27H2, en las concentraciones máximas ensayadas, resultó incapaz de neutralizar la acción antiviral de los IFN leucocitario y linfoblástico. Cabe destacar que los mAbs CA5E6 y CB27H2 reconocerían un área molecular común presente en el rhIFN- α 2b. Por lo tanto, el scFv CB27H2 debería reconocer y neutralizar los subtipos de IFN presentes en las mezclas heterogéneas ensayadas de manera análoga al fragmento CA5E6. La divergencia observada, entonces, se explicaría fundamentalmente por la disminución drástica de la afinidad del scFv comparado con el mAb CB27H2 completo. Esta afirmación puede sostenerse teniendo en cuenta, además, que la actividad antiviral del rhIFN- α 2b resultó considerablemente menos afectada en presencia del scFv CB27H2 con respecto a lo sucedido cuando la citoquina se incubó con el scFv CA5E6.

La existencia de una correlación comprobada entre la expresión incrementada de diferentes subtipos de IFN- α con diversas enfermedades autoinmunes, justifica la selección del fragmento scFv CA5E6 como potencial candidato terapéutico. Con tal objetivo, y en la búsqueda de mejorar sus propiedades biológicas, se planteó una estrategia orientada a incrementar su capacidad de interacción con la citoquina. Dicho procedimiento se basó en la generación de mutaciones al azar en la secuencia del scFv CA5E6 para luego seleccionar aquellos fragmentos resultantes con características de unión mejoradas mediante una variante de la técnica de *phage-display*. Mediante esta metodología se obtuvo un panel de 11 scFv solubles con un número de mutaciones que varió entre 1 y 4 sustituciones aminoacídicas (scFvs EP5, EP6, EP11, EP12, EP18, EP20, EP33, EP34, EP35, EP36 Y EP49) . Estos fragmentos recombinantes fueron purificados y caracterizados en relación a sus constantes de afinidad. La mayoría de los fragmentos mutados exhibieron constantes de afinidad que no demostraron diferencias significativas con el anticuerpo original (valores entre $1,0 \cdot 10^8$ y $1,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Por otro lado, los scFv EP18 y EP33 mostraron un incremento en su constante de afinidad ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $3,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; respectivamente), y el scFv EP12, el clon con el mayor número de mutaciones puntuales, exhibió la menor constante de afinidad ($0,37 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$).

Se estudió la capacidad neutralizante de la actividad biológica anti-viral *in vitro* del hIFN- α por parte de los scFv EP18 y EP33. Sólo se utilizó el rhIFN- α 2b para determinar si se producía una variación significativa de la capacidad neutralizante como consecuencia del aumento de la magnitud de la constante de afinidad de dichos scFv mutantes. Si bien ambos fragmentos presentaron características de unión al antígeno similares, el scFv EP18 demostró una capacidad neutralizante levemente superior al fragmento CA5E6 “*wild type*” (0,20 nM y 0,40 nM, respectivamente), mientras que fue necesaria una mayor concentración del scFv EP33 (1,00 nM) para neutralizar la misma masa de rhIFN- α 2b. Por otro lado, al evaluar el fragmento scFv EP18 en su capacidad neutralizante de la actividad biológica de la mezcla heterogénea de IFN- α s (IFN leucocitario y linfoblástico) no se observó un incremento con respecto a la actividad exhibida por el scFv CA5E6.

En el presente trabajo de Tesis se obtuvo un fragmento recombinante a partir de un mAb (CA5E6) seleccionado por sus características de unión con el rhIFN- α 2b que fue capaz de inhibir la acción antiviral de un conjunto heterogéneo de hIFN- α s, optimizándose su afinidad hasta el punto, en una primera instancia, de incrementar el valor de la correspondiente al mAb completo original ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del scFv EP18 frente a $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$

del mAb CA5E6). Indudablemente, es necesario continuar con la estrategia de maduración de la afinidad de los fragmentos recombinantes. Por ejemplo, utilizando el scFv EP18 como punto de partida para otra ronda de *error-prone* PCR, manteniendo las condiciones aquí establecidas o introduciendo modificaciones en parámetros tales como la tasa de mutación empleada o incorporando un proceso de selección de aquellos fragmentos con mayor afinidad por la citoquina soluble en concentraciones subnanomolares (Chames y Hoogemboom, 2004).

Para completar la etapa preliminar en la búsqueda de un anticuerpo con propiedades neutralizantes del exceso de IFN-alfa endógeno producido en determinadas patologías humanas, se realizó un ensayo exploratorio o de concepto para valorar la actividad *in vivo* de la citoquina. Dicha experiencia se basó en el uso de células PC-3 tumorales humanas (de origen prostático) y ratones *nude* atímicos, analizando la actividad antitumoral del rhIFN- α 2b mediante el estudio de su capacidad para disminuir el crecimiento de tumores sólidos implantados en dichos ratones inmunocomprometidos. Posteriormente, se evaluó la actividad neutralizante *in vivo* de dicha actividad antitumoral por parte del anticuerpo original mAb CA5E6 utilizando dicho procedimiento.

En el primer ensayo se comprobó la actividad antiproliferativa del rhIFN- α 2b sobre el crecimiento de las células tumorales humanas PC-3 al encontrarse una diferencia significativa ($p = 0,007$) entre los pesos promedio de los tumores desarrollados por los ratones sin tratar con rhIFN- α 2b frente a la medida resultante en los ratones que se sometieron al tratamiento con la citoquina (0,67 g y 0,31 g, respectivamente).

En la siguiente experiencia se observó que los grupos de ratones correspondientes a los tratamientos con rhIFN- α 2b y con esta citoquina en presencia del mAb CA5E6 exhibieron una diferencia significativa ($p = 0,011$) entre los pesos promedios de los tumores correspondientes a los dos tratamientos (0,39 g y 0,92 g, respectivamente). Asimismo, no se observó diferencia significativa ($p = 0,3$) entre el grupo control (sin rhIFN- α 2b) y el grupo de animales tratados con el mAb CA5E6, confirmando el bloqueo de la actividad biológica del IFN.

Por lo tanto, es posible concluir que el mAb CA5E6 fue capaz de neutralizar la acción antiproliferativa de la citoquina en un sistema *in vivo*, proyectando el potencial terapéutico de esta inmunoglobulina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolf, G.R. (1990) *Monoclonal antibodies and enzyme immunoassay specific for human interferon $\omega 1$: evidence that IFN- $\omega 1$ is a component of human leukocyte IFN*. *Virology* 175: 410-417.
- Adolf, G.R.; Kalsner, I.; Ahorn, H.; Maurer-Fogy, I. y Cantell, K. (1991) *Natural human interferon- α_2 is O-glycosylated*. *Biol. Chem.* 276: 511-518.
- Allen, G.; Fantes, K.H. (1980) *A family of structural genes for human lymphoblastoid (leukocyte-type) interferon*. *Nature* 287: 408-411.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J. y Sthrel, K. (1987) *Current Protocols In Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Barbas, C.F. III y Burton, D.R. (1996) *Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies*. *Trends Biotechnol.* 14: 230-234.
- Batteux, F.; Palmer, P.; Daeron, M.; Weill, B. y Lebon, P. (1999) *Fc γ RII (CD32)-dependent induction of interferon-alpha by serum from patients with lupus erythematosus*. *Eur. Cytokine Netw.* 10: 4: 509-514.
- Bayer, E.A.; Skultesky, E. y Wilchek, M. (1979) *The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry*. *Method Enzymol.* 62: 308-315.
- Bekisz, J.; Schmeisser, H.; Hernández, J.; Goldman, N.; Zoon, K. (2004) *Human interferons alpha, beta and omega*. *Growth factors* 22 (4): 243-251.
- Berdichevsky, Y.; Ben-Zeev, E.; Lamed, R. y Benhar, I. (1999) *Phage display of a cellulose binding domain from Clostridium thermocellum and its application as a tool for antibody engineering*. *J. Immunol. Methods.* 228: 151-162.
- Better, M.; Chang, C.P.; Robinson, R.R. y Horwitz, A.H. (1988) *Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment*. *Science* 240: 1041-1043.
- Breitling, F. y Dübel, S. (1999) *Recombinant Antibodies*. Dübel, D. (ed.). John Wiley & Sons Inc.
- Bino, T.; Madar, Z.; Gertler, A.; Rosenberg, H.; (1982) *The kidney is the main site of interferon degradation*. *J. Interferon Res.* 2 (29): 301-308.
- Boder, E.T.; Midelfort, K.S. y Wittrup, K.D. (2000) *Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10701-10705.
- Butler, M. (1988) *Processes with animal cell and tissue cultures*. En: *Biotechnology*. Rehm, H. J. y Reed, G. (eds.) Vol. 6b. *Special Microbial Processes*. VCH Publisher. Weinheim, Alemania, pág. 252-316.

- Cadwell, R.C. y Joyce, G. F. (1992) *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. PCR Methods Appl. 2: 28-33.
- Campbell, M.J., Zelenetz, A.D.; Levy S. y Levy R. (1992) *Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire*. Mol. Immunol. 29 (2): 193-203.
- Capon, D.J.; Shepard, H. M. y Goeddel, D.V. (1985) *Two distinct families of human and bovine interferon- α genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides*. Mol. Cell. Biol. 5: 768-779.
- Carbone, C. y Maschi, F. (2006) *El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia*. Qviva 5 (1): 19-23.
- Carter, P.; Kelley, R.F.; Rodrigues, M.L.; Scedecor, B.; Covarrubias, M.; Velligan, M.D.; Wong, W.L.T.; Rowland, A.M.; Kotts, C.E.; Carver, M.E.; Yang, M.; Bourell, J.H.; Shepard, H.M. y Henner, D. (1992) *High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment*. Bio/Technology 10: 163-167.
- Chames, P. Y Hoogenboom, H.R. (2004) *“Tecnología de presentación de anticuerpos en la superficie de fagos”*. En: *Combinatoria Molecular*. Nelson Santiago Vispo (ed.). Elfos Scientea. 161-178.
- Chakrabarti, D.; Hultgren, B. y Stewart, T.A. (1996) *IFN-alpha induces autoimmune T cells through the induction of intracellular adhesion molecule-1 and B7.2*. J. Immunol. 157: 522-528.
- Chothia, C. y Lesk, A.M. (1987) *Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*. J. Mol. Biol. 196: 901-917.
- Chung, C.T.; Niemela, S.L. y Miller, R.H. (1989) *One-step preparation of competent Escherichia coli: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 2172-2175.
- Chuntarapai, A.; Gibbs, V.; Lu, J.; Ow, A.; Marsters, S.; Ashkenazi, A.; De Vos, A.; Jin Kim, K. (1999) *Determination of residues involved in ligand binding and signal transmission in the human IFN- α receptor 2*. J. Immunol. 163: 766-773.
- Choi, J.H.; Lee, S.Y. (2004) *Secretory and extracellular production of recombinant protein using Escherichia coli*. Applied Micro. Biotech. 64 (5): 625-635.
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y. y Hsu, L. (1972) *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 69, 2110-2114.
- Daugherty, P.; Chen, G.; Iverson, B. y Georgiou, G. (2000). *Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 2029-2034.
- De Maeyer, E. y De Maeyer-Guignard, J. (1988). *Interferons and Other Regulatory Cytokines*. John Wiley and Sons, New York.

- De Maeyer, E. y De Maeyer-Guignard, J. (1994). *Interferons*. En: *The cytokine handbook*, 2nd ed. (Ed. Thompson, A.W.). Academic Press Limited, San Diego, EE.UU., cap. 15, p. 265-288.
- DeStefano, E.; Friedman, R.M; Friedman-Kien, A.E.; Goedert, J. J.; Henriksen, D.; Preble, O.T.; Sonnabend, J.A. y Vilcek, J. (1982) *Acid-labile human leukocyte interferon in homosexual men with Kaposi's sarcoma and lymphadenopathy*. J. Infect. Dis. 146: 451-459.
- Diamond, A.G.; Butcher, G.W. y Howard, J.C. (1984) *Localized conformational changes induced in a class I major histocompatibility antigen by the binding of monoclonal antibodies*. J. Immunol. 132: 1169-1175.
- Donnelly, R.J. (1994) *The type I ($\alpha/\beta/\omega/\tau$) interferon family*. En: Guidebook to cytokines and their receptors. Nicola, N. A. (ed.). A Sambrook and Tooze Publication, Oxford, pág. 111-114.
- Edelman, G.M.; Cunningham, B.A.; Gall, W.E.; Gottlieb, P.D.; Rutishauser, U. y Waxdal, M.J. (1969) *The covalent structure of an entire gamma immunoglobulin molecule*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 78-85.
- Ehrlich, P.H.; Moyle, W.R.; Moustafa, Z.A. y Canfield, R.E. (1982) *Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen*. J. Immunol. 128: 2709-2713.
- Ey, P.L.; Prowse, S.J. y Jenkin, C. R. (1978) *Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A Sepharose*. Biochemistry 15: 429-436.
- Familletti, P.C.; Rubinstein, S. y Pestka, S. (1981) *A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for interferon*. Method Enzymol. 78: 387- 394.
- Finter, N.B. (1991) *Why are there many subtypes of alpha-interferons*. J. Interferon Res. Special Issue, pág 185-194.
- Folkman, J.; Shing, Y. (1992) *Angiogenesis*. J. Biol. Chem. 267 (16): 10931-10934.
- Foster, G.R. y Finter N.B. (1998) *Are all type I human interferons equivalent?*. J. Viral Hepatitis 5: 143-152.
- Foulis, A.K.; Farquharson M.A. y Meager, A. (1987) *Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus*. Lancet 2: 1423-1427.
- Freshney, R. (1994) *The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature*. En: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, Inc., New York, EE.UU., pág. 71-103.
- Friguet, B.; Chaffotte, A.F.; Djavadi-Ohanian, L. y Goldberg, M.E. (1985) *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Immunol. Methods 77: 305-319.
- Friguet, B.; Djavadi-Ohanian, L. y Goldberg, M.E. (1989) *Immunochemical analysis of protein conformation*. En: Protein Structure. A Practical Approach. Creighton, T. E. (ed.) IRL Press. Oxford. Gran Bretaña, pág. 287-310.

- Fromant, M.; Blanquet, S. y Plateau, P. (1995) *Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction*. Anal. Biochem. 224: 347-353.
- Galfrè, G. y Milstein C. (1981) *Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures*. Method. Enzymol. 73: 3-46
- Gill, S.C. y von Hippel P.H. (1989) *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Analytical Biochem. 182: 319-326.
- Glockshuber, R.; Malia, M.; Pfitzinger, I. y Plückthun, A. (1990). *A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments*. Biochemistry 29: 1362-1367.
- Goeddel, D.V.; Yelverton, E.; Ullrich, A.; Heyneker, H.L.; Miozzari, G.; Holmes, W.; Seeburg, P.H.; Dull, T.; May, L.; Stebbing, N.; Crea, R.; Maeda, S.; McCandliss, R.; Sloma, A.; Tabor, J.M.; Gross, M.; Familetti, P.C.; Pestka, S. (1980) *Human leukocyte interferon produced in E. Coli is biologically active*. Nature 287 (2) 411-416.
- Goldbaum, F.A. y Fossati, C.A. (1996) *Hibridomas y anticuerpos monoclonales*. En: Inmunología e Inmunquímica. Fundamentos. Margni, A. (ed.). Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires. Argentina, pág. 781-797.
- Gram, H.; Marconi, L.A.; Barbas. C.F. III; Collet, T.A.; Lerner, R.A. y Kang, A.S. (1992) *In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580.
- Gresser, I. (1984) *Role of interferon in resistance to viral infection in vivo*. En: Interferon, vol. 2: interferons and the immune system. Vilcek, J. y De Meayer, E. (eds.). Elsevier, Amsterdam, pág. 221-247.
- Griffiths, A.D.; Williams, S.C.; Hartley, O.; Tomlinson, I.M.; Waterhouse, P.; Crosby, W.L.; Kontermann, R.E.; Jones, P.T.; Low, N.M. y Allinson, T.J. (1994) *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires*. EMBO J. 13: 3245-3260.
- Griffiths, A.D. y Duncan, A.R. (1998) *Strategies for selection of antibodies by phage display*. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 102-108.
- Griffiths, B. (1986) *Scaling-up of animal cell cultures*. En: Animal Cell Culture. Freshney, R. (ed.). IRL Press. Oxford, Washintong DC, EE.UU., pág. 33-69.
- Groopman, J.F. y Scadden, D.T. (1989) *Interferon therapy for Kaposi's sarcoma associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Ann. Intern. Med. 10: 335-337
- Gutterman, I.U. (1994) *Cytokine therapeutics: lesson from interferon α* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1198-1205.
- Hale, G. (2006) *Therapeutic antibodies – Delivering the promise?* Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 633-639.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. EE.UU.
- Harris, L.J.; Larson, S.B.; Hasel, K.W. y McPherson, A. (1997) *Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody*. Biochemistry 36: 1581-1597.

Hartshorn, K.L.; Neumeyer, D.; Vodt, M.W.; Schooley, R.T. y Hirsh, M.S. (1987) *Activity of interferon alpha, beta and gamma against human immunodeficiency virus replication in vitro*. AIDS Res. Human Retrov. 3: 125-133.

Hasegawa, T. (1996) *History and evolution of culture maintenance and preservation techniques*. En: *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Hunter-Cevera, J., Belt, A. (eds.). Academic Press Inc. San Diego, EE.UU.15-27.

Haunschild, J.; Faro, H.; Pack, P. y Plückthun, A. (1995) *Pharmacokinetic properties of bivalent miniantibodies and comparison to other immunoglobulin forms*. Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals. 8: 111-128.

Hayflick, L. (1961) *The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation*. Exp. Cell. Res. 23: 14-20.

Holliger, P.; Hudson, P.J. (2005) *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nat. Biotechnol. 23 (9): 1126-1136.

Holmes, N.J., Parham, P. (1983) *Enhancement of monoclonal antibodies against HLA-A2 is due to antibody bivalency*. J. Biol. Chem. 258: 1580-1586.

Hoogenboom, H.R.; Griffiths, A.D.; Johnson, K.S.; Chiswell, D.J.; Hudson, P. y Winter, G. (1991) *Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains*. Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137.

Hoogenboom, H.R. (1997) *Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies*. Trends Biotechnol. 46: 524-532.

Hoogenboom, H.R.; de Bruine, A.P.; Hufton, S.E.; Hoet, R.M.; Arends, J.W. y Roovers, R.C. (1998) *Antibody phage display technology and its application*. Immunotechnology. 4: 1-20.

Huang, X.; Luang, J.; Goddard, A.; Foulis, A.; James, R.F.; Lernmark, A.; Pujol-Borrell, R.; Rabinovitch, A.; Somoza, N. y Stewart, T.A. (1995) *Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes*. Diabetes 44: 658-664.

Huston, J.S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M.S.; Novotny, J.; Margolies, M.N.; Ridge, R.J.; Bruccoleri, R.E.; Haber, E. y Crea, R. (1988) *Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-dioxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883.

Huston, J.S.; George, A.J.; Tai, M.S.; McCartney, J.E.; Jin, D.; Segal, D.M.; Keck, P. y Oppermann, H. (1995) *Single-chain Fv design and production by preparative folding*. Antibody engineering. Borrebaeck, C. A. (ed.). Oxford University Press, New York. 185-228.

Jackson, R.H.; McCafferty, J.; Johnson, K.S.; Pope, A.R.; Roberts, A.J.; Chiswell, D.J.; Clackson, T.P.; Griffiths, A.D.; Hoogenboom, H.R. y Winter, G. (1992) *Selection of variants of antibodies and other protein molecules using display on the surface of bacteriophage fd*. En: *Protein Engineering: A Practical Approach*. Rees, A.S.; Sternberg, M.J.E. y Wetzel, R. (Eds.). pp. 277-301, IRL Press, Oxford.

Jäger, M. y Plückthun, A. (1999). *Domain interactions in antibody Fv and scFv fragments: effects on unfolding kinetics and equilibria*. FEBS Lett. 462: 307-312.

Kabat, E.A.; Wu, T.T.; Perry, H.M.; Gottesman, K.S. y Foeller, C. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. 5th ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD.

Kaighn, M.E.; Narayan, K.S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.F. y Jones, L.W. (1979) *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest. Urol. 17 (1): 16-23.

Klaus, W.; Gsell, B.; Labhardt, A.M.; Wipf, B. y Senn, H. (1997) *The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution*. J. Mol. Biol. 274: 661-675.

Knappik, A.; Krebber, C. y Plückthun, A. (1993) *The effect of folding catalysts on the in vivo folding process of different antibody fragments expressed in Escherichia coli*. Biotechnology 11: 77-83.

Knappik, A.; Ge, L.; Honegger, A.; Pack, P.; Fischer, M.; Wellenhofer, G.; Hoess, A.; Wölle, J.; Plückthun, A. y Virnekäs, B. (2000) *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides*. J. Mol. Biol. 296: 57-86.

Knight, E. (1976) *Interferon: purification and initial characterisation from diploid cell*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 520-523.

Köhler, G. y Milstein, C. (1975) *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256: 495-497.

Kontsek, P. (1994) *Human type I interferons: structure and function*. Acta Virol. 38: 345-360.

Kramer, A.; Biggar, R.J.; Hampl, H.; Friedman, R.M.; Fuchs, D.; Wachter, D. y Goedert, J.J. (1992) *Immunologic markers of progression to acquired immunodeficiency syndrome are time-dependent and illness-specific*. Am. J. Epidemiol. 136: 71-80.

Krebber, A.; Bornhauser, S.; Burmester, J.; Honegger, A.; Willuda, J.; Bosshard, H.R. y Plückthun, A. (1997) *Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system*. J. Immunol. Methods. 201: 35-55.

Krim, M. (1980) *Towards tumor therapy with interferons, part I. Interferons: production and properties*. Blood 55 (5): 711-721.

Kunzi, M.; Pitha, P. (2003) *Interferon targeted genes in host defense*. Autoimmunity 36 (8): 457-461.

Kuroki, M. (1996) *A simple solid-phase competition assay with labeled antigen*. En: Methods in Molecular Biology, vol 66: Epitope Mapping Protocols. Morris, G. E. (ed.). Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. EE.UU., p. 47-53.

Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄*. Nature 227: 680-685.

Lane, H.C.; Davey, V.; Kovacs, J.A.; Feinberg, J.; Metcalf, J.A.; Herpin, B.; Walker, R. Deyton, L.; Davey, R. T. y Falloon, J. (1990) *Interferon alpha in patients with asymptomatic*

human immunodeficiency virus (HIV) infection a randomized, placebo-controlled trial. Ann. Intern. Med. 112: 805-811.

Larrick, J.W.; Danielsson, L.; Brenner, C.A.; Abrahamson, M. ; Fry, K.E.; Borrebaeck, C.A.K. (1989) *Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction.* BBRC 160 (3): 1250-1256.

Lefevre, F.; Guillomot, M.; D'Andrea, S.; Battegay, S.; La Bonnardiere, C. (1998) *Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family.* Biochimie 80: 779-788.

Levis, S.C.; Saavedra, M.C.; Ceccoli, C.; Falcoff, E.; Feuillade, M.R.; Enria, D.A.; Maiztegui, J. I. y Falcoff R. (1984) *Endogenous interferon in Argentine hemorrhagic fever* J. Infect. Dis. 149 : 428-433.

Lewerenz, M.; Mogensen, K.E. y Uzé, G. (1998) *Shared receptor components but distinct complexes for α and β interferons.* J. Mol. Biol. 282: 585-599.

Locarnini, S. (2000) *A virological perspective on the need for vaccination* J. Viral. Hepatitis 7:5-6.

Lonberg, N. (2005) *Human antibodies from transgenic animals.* Nat. Biotechnol. 23: 1117-1125.

Low, N.M.; Holliger, P.H. y Winter, G. (1996) *Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain.* J. Mol. Biol. 260: 359-368.

Lu, J.; Chuntharapai, A.; Beck, J.; Bass, S.; Ow, A.; De Vos, A.M.; Gibbs, V.; Jin Kim, K. (1998) *Structure-function study of the extracellular domain of the human IFN- α receptor (hIFNAR1) using blocking monoclonal antibodies: the role of domains 1 and 2.* J. Immunol. 160: 1782-1788.

Madin, S.H. y Darby, N.B.Jr. (1958) *Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98: 574-576.

Mandel, M. y Higa, A. (1970) *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.* J. Mol. Biol. 53, 159-162.

Margni, R. (1996) *Anticuerpos.* En: Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos. Margni, R. (ed.) Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. Argentina. 75-130.

Marks, J.D.; Hoogenboom, H.R.; Bonnert, T.P.; McCafferty, J.; Griffiths, A.D. y Winter, G. (1991) *By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.* J. Mol. Biol. 222: 581-597.

McCafferty, J.; Griffiths, A.D.; Winter, G. y Chiswell, F.J. (1990) *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains.* Nature 348: 552-554.

Meager, A. (1998) *Interferons alfa, beta and omega.* En: Cytokines. Mire-Sluis, A. R. y Thorpe, R. (eds.). Academic Press, London, pág. 361-389.

- Meager, A. (2001) *Biological assay for interferons*. J. Immunol. Methods 261: 21-36.
- Merten, O.W. (1990) *Production and use of non-therapeutic monoclonal antibodies*. En: Animal Cell Biotechnology. Vol. 4. Spier, R. E., Griffiths, J. B. (eds.). Academic Press. Londres. Gran Bretaña, p. 257-315.
- Meulenberg, J.J.M.; van Nieuwstadt, A.P.; van Essen-Zandbergen, A.; Bos-de Ruitjer, J.N.A., Langeveld, J.P.M. y Meloen, R.H. (1998) *Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies*. Virology 252: 106-114.
- Miller, R.A.; Maloney, D.G. y Warnke, R. (1982) *Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody*. N. Engl. J. Med. 306: 517-522.
- Morrison, S.L.; Johnson, M.J.; Herzenberg, L.A. y Oi, V.T. (1984) *Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6851-6855.
- Nagata, S.; Mantei, N. y Weissman, C. (1980) *The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon α* . Nature 287: 401-408.
- Nestle, F.O.; Conrad, C.; Tun-Kyi, A.; Homey, B.; Gombert, M.; Boyman, O.; Burg, G.; Liu, Y.J. y Gilliet, M. (2005) *Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production*. J. Exp. Med. 4;202(1):135-43.
- Nyman, T.A.; Tölö, H.; Parkkinen, J.; Kalkkinen, N. (1998a) *Identification of nine interferon- α subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leukocytes*. Biochem. J. 329: 295-302.
- Nyman, T.A.; Kalkkinen, N.; Tölö, H. y Helin, J. (1998b) *Structural characterisation of N-linked oligosaccharides derived from interferon- α 2b and interferon- α 14c produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes*. Eur. J. Biochem. 253: 485-493
- Oggero Eberhardt, M.R.; Frank, R.; Kratje, R. y Etcheverrigaray, M. (2003) *Identification of two potential receptor-binding sites of hGM-CSF*. Braz. J. Chem. Eng. 20(1): 15-20.
- Orlandi, R.; Güssow, D.H.; Jones, P.T. y Winter, G. (1989) *Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837.
- Orum, H.; Andersen, P.S.; Oster, V.; Johansen, L.K.; Riise, E.; Bjørnvad, M.; Svendsen, I. y Engberg, J. (1993) *Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage*. Nucleic Acids Res. 21(19): 4491-4498.
- Pack, P.; Kujau, M.; Schoroeckh, V.; Knupfer, U.; Wenderoth, R.; Riesenberger, D. y Plückthun, A. (1993) *Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high density fermentation of Escherichia coli*. Biotechnology (N Y) 11: 1271-1277.
- Pan, Y.; Kytola, S.; Farnebo, F.; Wang, N.; Lui, W.O.; Nupponen, N.; Isola, J.; Visakorpi, T.; Bergerheim, U.S. y Larsson, C. (1999) *Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping*. Cytogenet. Cell Genet. 87 (3-4): 225-232.

- Pantelouris, E.M. (1971) Observations on the immunobiology of "nude" mice. *Immunology* 20: 247-252.
- Peleg-Shulman, T.; Tsubery, H.; Mironchik, M.; Fridkin, M.; Schreiber, G.; Shechter, Y. (2004) Reversible PEGylation: a novel technology to release native interferon $\alpha 2$ over a prolonged time period. *J. Med. Chem.* 47: 4897-4904.
- Pentocorvo, G. (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. *Somat. Cell. Genet.* 1: 397-400.
- Pestka, S. (1982) The human interferons – from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between and beyond. *Arch Biochem Biophys* 221: 1-37.
- Pestka, S.; Kelder, B.; Familetti, P.C.; Moschera, J.; Crowl, R. (1983) Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast and immune interferons. *J. Biol. Chem.* 258 (16): 9706-9709.
- Piebler, J.; Roisman, L.C. y Schreuber, G. (2000) New structural and functional aspects of the type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface. *J. Biol. Chem.* 274: 51: 40425-40433.
- Plückthun, A. (1992) Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding. En: *Immunological Reviews* 130. Möller, G (ed.). Munksgaard, Copenague. 151-188.
- Plückthun, A.; Krebber, A.; Krebber, C.; Horn, U.; Knüpfer, U.; Wenderoth, R.; Nieba, L.; Proba, K. y Riesenber, D. (1996) Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation. En: *Antibody engineering. A practical approach*. McCafferty, J., Hoogenboom, H.R. y Chiswells, D.J. (eds.) IRL, Oxford, p. 203-252.
- Plückthun, A., Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 178: 497-515.
- Rader, C. y Barbas III C. (1997). Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr. Opin. Biotech.* 8: 503-508.
- Radhakrishnan, R.; Walter, L.J.; Hurza, A.; Reichert, P.; Trotta, P.P.; Nagabhunshan, T.L. y Walter, M.R. (1996) Zinc mediated dimer of human interferon- α_{2b} revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4: 1453-1463.
- Reichert, J.; Rosensweig, C.; Faden, L. y Dewitz, M. (2005) Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* 23: 1073-1078.
- Riaño-Umbarila, L.; Juárez-González, V. R.; Olamendi-Portugal, T.; Ortiz-León, M.; Domingo Possani, L. y Becerril. B. (2005) A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272: 2591-2601.
- Riechmann, L.; Clark, M.R.; Waldmann, H. y Winter, G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-327.

Roisman, L.C.; Piehler, J.; Trosset, J.; Scheraga, H.A.; Schreiber, G. (2001) *Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constrains form double-mutant cycles and flexible docking*. PNAS 98 (23): 13231-13236.

Röthlisberger, D.; Honegger, A. y Plückthun, A. (2005). *Domain Interactions in the Fab Fragment: A Comparative Evaluation of the Single-chain Fv and Fab Format Engineered with Variable Domains of Different Stability*. J. Mol. Biol. 347: 773-789.

Rubinstein, M.; Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Miller, R.S.; Waldman; A.A.; Pestla, S. (1979) *Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity and initial characterization*. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (2): 640-644.

Russel-Harde, D.; Haigeng, P.; Betts, M.; Harkins, R.N.; Perez, H.D.; Croze, E. (1995) *Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons*. J. Biol. Chem. 270 (44): 26033-26036.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1990) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Saviranta, P.; Pajunen, M.; Jauria, P.; Karp, M.; Pettersson, K.; Mäntsälä, P. y Lövgren, T. (1998) *Engineering the steroid-specificity of an anti-17beta-estradiol Fab by random mutagenesis and competitive phage panning*. Protein Eng. 11 (2): 143-152.

Scatchard, G. (1949) *The attractions of proteins for small molecules and ions*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672.

Schier, R.; Bye, J.; Apell, G., McCall, A.; Adams, G.P.; Malmqvist, M.; Weiner, L.M. y Marks, J.D. (1996) *Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv Using affinity-driven selection*. J. Mol. Biol. 255: 28-43.

Schroff, R.W.; Foon, K.A.; Beatty, S.M.; Oldham, R.K. y Morgan Jr., A.C. (1985) *Human anti-murine responses in patients receiving monoclonal antibody therapy*. Cancer Res. 45: 879-885.

Seligman, S.J. (1994) *Influence of solid-phase antigen in competition enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on calculated antigen-antibody dissociation constants*. J. Immunol. Methods 168: 101-110.

Sen, G.C.; Lengyel, P. (1992) *The interferon system. A birs's eye view of its biochemistry*. J. Biol.Chem. 267: 5017-5020.

Sheets, M.D.; Amersdorfer, P.; Finnern, R.; Sargent, P.; Lindqvist, E.; Schier, R.; Hemingsen, G.; Wong, C.; Gerhart, J.C. y Marks, J.D. (1998) *Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to proteins antigens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6157-6162.

Skerra, A.; Pfitzinger, I. y Plückthun, A. (1991) *The functional expression of antibody Fv fragments in E. coli: improved vectors and a generally applicable purification technique*. Bio/Technology 9: 273-278.

Skerra A. y Plückthun A. (1988) *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science 240: 1038-41.

- Slaton, J.W.; Perrotte, P.; Inoue, K.; Dinney, C.P.N; Fidler, I.J. (1999) *Interferon- α -mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent of optimization of biological dose and schedule*. Clin. Cancer Res. 5: 2726-2734.
- Solorzano, C.C.; Hwang, R.; Baker, C.H.; Bucana, C.D.; Pisters, P.W.; Evans, D.B.; Killion, J.J.; Fidler, I.J. (2003) *Administration of optimal biological dose and schedule of interferon α combined with gemcitabine induces apoptosis in tumor-associated endothelial cells and reduces growth of human pancreatic carcinoma implanted orthotopically in nude mice*. Clin. Cancer Res. 9: 1858:1867.
- Song, X.R.; Torphy, T.J.; Griswold, D.E. Shealy, D. (2002) *Coming of age: anti-cytokine therapies*. Mol. Interv.
- Sotoca Momblona, J.M (1999) *Cuarenta años de interferones*. Farm. Hosp.. 23 (4): 205-213.
- Stevens, F. J. (1987) *Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody*. Mol. Immunol. 24: 1055-1060.
- Sugiyama, K.; Ahorn, H.; Maurer-Fogy, I.; Voss, T. (1993) *Expression of human interferon- α 2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosilation and protein heterogeneities*. Eur. J. Biochem. 217: 921-927.
- Tomayko, M.M. y Reynolds, C.P. (1989) *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. Cancer Chemother. Pharmacol. 24 (3): 148-154.
- Tomlinson, I.M.; Cox, J.P.; Gherardi, E.; Lesk, A.M. y Chotia, C. (1995) *The structural repertoire of the human V kappa domain*. EMBO J. 14: 4628-4638.
- Tzartos, S.J. (1996) *Epitope mapping by antibody competition. Methodology and evaluation of the validity of the technique*. En: Methods in Molecular Biology, Vol. 66: Epitope Mapping Protocols. Morris, G. E. (ed.). Humana Press Inc. Totowa. New Jersey. EE.UU., p. 55-66.
- Uzé, G.; Lutfalla, G. y Mogensen, K.E. (1994) *Receptors for the alfa and beta interferon family*. En: Guidebook to cytokines and their receptors. Nicola, N. A. (ed.). A Sambrook and Tooze Publication, Oxford, p. 115-118.
- Vilcek, J.; Sen, G.C. (1996) *Interferons and other cytokines*. En: *Fields Virology, Vol. 2* (Eds.: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M.). Lippincott Williams and Wilkins, Boston, EE.UU., cap. 13, p. 375-399.
- Ward, E.S.; Clark, M.A.; Lees, J. y Hawkins, N.J. (1989) *Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*. Nature 341: 544-546.
- Wark, K. y Hudson, P. (2006) *Latest technologies for the enhancement of antibody affinity*. Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 657-670.
- Weissman C. y Weber, H. (1986) *The interferon genes*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 33: 251-300.
- Whitlock, C. y Muller-Sieburg, C. (1990) *Long-term B lymphoid cultures from murine bone marrow. Establishment and cloning by using stromal cell line AC 6.21*. En: Methods in

Molecular Biology. Animal Cell Culture. Pollard, J., Walker, J. (eds.), The Humana Press Inc. Clifton, EE.UU., pág. 303-322.

Yamanaka, H.I.; Kirii Y. y Ohmoto H. (1995) *An improved phage display antibody cloning system using newly designed PCR primers optimized for Pfu DNA polymerase*. J Biochem. 117(6):1218-1227.

Zagury, D.; Lachgar, A.; Chams, V.; Fall, L.S.; Bernard, J.; Zagury, J.F.; Bizzini, B.; Gringeri, A.; Santagostino, E. y Rappaport, J. (1998) *Interferon α and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3851-3856.

Zagury, D.; Gallo, R.C. (2004) *Anti-cytokine Ab immune therapy: present status and perspectivas*. Drug Discov. Today 9 (2): 72-81

Zenclussen, M.L.; Oggero Eberhardt, M.R. y Kratje, R. (2002) *Caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-Eritropoyetina humana recombinante (rhEPO)*. Tesina de la Carrera de Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.

Zhang, K. y Kumar, R. (1994) *Interferon- α inhibits cyclin E and cyclin D-dependent CDK-2 kinase activity associated with RB protein and H2F in Daudi cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun 200: 522-528.

Zoon, K.; Millar, D.; Bekisz, J.; zur Nedden, D.; Enterline, J.C.; Nguyen, N.Y., Hu, R. (1992) *Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon- α* . J. Biol. Chem. 267 (21): 15210-15216.