



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Payés, Cristian José

Estudios funcionales y estructurales de un fragmento de anticuerpo inhibidor de entrada de mamarenavirus causantes de las fiebres hemorrágicas sudamericanas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Payés, C. J. (2018). *Estudios funcionales y estructurales de un fragmento de anticuerpo inhibidor de entrada de mamarenavirus causantes de las fiebres hemorrágicas sudamericanas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3936>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudios funcionales y estructurales de un fragmento de anticuerpo inhibidor de entrada de Mamarenavirus causantes de las Fiebres Hemorrágicas Sudamericanas

TESIS DOCTORAL

Cristian José Payés

cristianpayes@gmail.com

Resumen

Las Fiebres Hemorrágicas Sudamericanas (FHS) son una familia de graves enfermedades infecciosas que incluyen la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), Boliviana (FHB), Venezolana (FHV), Brasileña y de Chapare; y sus agentes etiológicos son los Mamarenavirus Junín (JUNV), Machupo (MACV), Guanarito (GTOV), Sabiá (SABV) y Chapare (CHAV), respectivamente. Debido a su alta infectividad y mortalidad, y su capacidad de propagarse de persona a persona constituyen una seria amenaza, por lo que son clasificados como agentes patógenos de Categoría A por el NIAID de los EE.UU. En la actualidad, existe vacuna solo contra la FHA (CANDID#1) y de todas las FHS, la única que tiene tratamiento eficaz es la FHA. Este tratamiento consiste en la inmunoterapia pasiva utilizando el plasma de pacientes convalecientes. Sin embargo, este tratamiento no muestra eficacia en pacientes con más de 8 días de evolución y plantea el riesgo de enfermedades transmitidas por transfusión. El objetivo general de esta tesis es avanzar en el desarrollo de un agente inhibidor de entrada de virus como potencial tratamiento para las FHS.

Debido a la peligrosidad de este grupo de enfermedades se han desarrollado modelos in vitro no patogénicos que mantienen algunas de sus propiedades y que permitan su manipulación en condiciones estándar de laboratorio con una mayor seguridad para el operador. En este trabajo se validó un modelo in vitro de pseudovirus utilizando plasma de pacientes convalecientes de FHA y pseudovirus decorados con el complejo GP1/GP2 de JUNV. Aquí se determinó una protección de más del 90% hasta diluciones 1:2.000 con el plasma de pacientes convalecientes de FHA de alto título. Luego, utilizando la misma estrategia pero con el complejo GP1/GP2 de MACV, CHAV, GTOV y SABV, se estudió la posible reactividad cruzada del plasma de pacientes convalecientes de FHA. En contraste con lo observado con JUNV, solo se obtuvo una disminución significativa de la

internalización de pseudovirus de MACV y GTOV en presencia de la mayor concentración de plasma evaluada. Mientras que para SABV y CHAV no se observó respuesta significativa en las diluciones ensayadas. Esto sugiere que el tratamiento con plasma de pacientes convalecientes de FHA no beneficiaría a las personas infectadas con las otras FHS.

Previamente hemos demostrado que el anticuerpo monoclonal ch128.1 contra hTfR1 tiene actividad polivalente, ya que es capaz de bloquear en más de 90% la internalización de pseudovirus de JUNV, MACV, CHAV, GTOV y SABV. Sin embargo, ch128.1 tiene isotipo IgG3 humano, y un inhibidor de entrada de virus dirigido a un target ubicuo como hTfR1 con este isotipo induciría una potente actividad efectora del sistema inmune que pueden dañar a células sanas que expresan hTfR1. Por lo tanto, se realizaron anticuerpos recombinantes con la región variable del anticuerpo ch128.1, de forma completa o como cadena simple de regiones variables (scFv) con el fin de obtener proteínas sin actividad efectora y que mantengan la especificidad contra el hTfR1. Debido a que no fue posible producir con alto rendimiento y pureza un scFv, se realizó el tratamiento con papaína del anticuerpo ch128.1 con IgG1 y se purificaron los fragmentos Fab (Fab128.1). Se evaluó la capacidad de esta molécula monovalente de unirse a hTfR1 y también de bloquear la internalización de pseudovirus de todas las FHS. Se observó que, al igual que el anticuerpo bivalente ch128.1, el fragmento monovalente Fab128.1 fue capaz de bloquear la entrada de todos los Mamarenavirus patógenos. Por lo tanto, sería factible producir una molécula monovalente del anticuerpo ch128.1 como una terapia dirigida para las FHS, sin actividad efectora y a un menor costo de producción comparado con un anticuerpo completo.

La determinación de la base estructural de la especificidad anticuerpo-antígeno es crucial para comprender el mecanismo de reconocimiento inmune y el diseño racional de biofármacos. Por lo tanto, se resolvió la estructura atómica de las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) del anticuerpo ch128.1 por cristalografía de rayos X del Fab128.1 y luego se utilizó la estructura resuelta y herramientas bioinformáticas, para modelar la interacción del anticuerpo con el hTfR1 *in silico*. De esa forma se propone un mecanismo molecular que explicaría el efecto sobre el boqueo de la internalización de pseudovirus de las FHS. Este mecanismo consistiría en una competencia por el sitio de unión del anticuerpo ch128.1 y las GP1 virales sobre el hTfR1, producto del solapamiento de 11 residuos.

Estos estudios de estructura-función proveen evidencia que permitirían establecer los mecanismos moleculares responsables de la actividad de un anticuerpo inhibidor de entrada de virus y contribuirán al diseño racional de nuevos biofármacos dirigidos hacia el hTfR1 como una estrategia novedosa que contribuya al tratamiento de todas las FHS.

Palabras Clave: Fiebres Hemorrágicas Sudamericanas, Anticuerpo, Fab, inmunoterapia, inhibidor de entrada de virus.



*Universidad Nacional de Quilmes
Departamento de Posgrado*

“Estudios funcionales y estructurales de un fragmento de anticuerpo inhibidor de entrada de Mamarenavirus causantes de las Fiebres Hemorrágicas Sudamericanas”

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencia Y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes.

Lic. Cristian José Payés

Director: Dr. Gustavo Helguera

Co-director: Dr. Paulo Maffia

Consejero de posgrado: Dr. Marcelo Argüelles

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)



2018

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo y la ayuda de muchas personas a lo largo de estos años. Por eso estoy enormemente agradecido.

- A mi director el Dr. Gustavo Helguera por sus enseñanzas a lo largo de todos estos años.
- A mi co-director el Dr. Paulo Maffia por toda su enseñanza, consejos y buena onda.
- Al Dr. José Rodríguez, de la Universidad de California en los Ángeles (UCLA) por abrirme las puertas de su laboratorio en EE.UU., por todo lo que me enseñó, toda la buena onda y todo el esfuerzo junto con el Dr. Gustavo Helguera, para que yo pudiera viajar.
- Al Dr. Manuel Penichet y la Dra. Tracy Daniels-Wells de UCLA.
- Al Dr. Jonathan Abraham de la Escuela de Medicina de Harvard, EE.UU, por sus enseñanzas y los muy buenos momentos compartidos.
- A la Dra. Sandra Cordo y la Dra. Nélide Candurra del FCEyN, UBA
- A la Dra. Delia Enría, Dra. Ana Briggiler y Dra. Silvana Levis, del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas.
- A mi consejero de posgrado el Dr. Marcelo Argüelles de la Universidad Nacional de Quilmes, por toda la buena onda y la predisposición para ayudarme en todo momento.
- Al IBYME por la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones, un extraordinario lugar para trabajar.
- A todos mis amigos/becarios del IBYME por toda la buena onda y la ayuda en todo momento. A la Dra. Mercedes Goin y a todo los chicos del laboratorio Denver Farma por toda la ayuda.
- A la Dra. Liliana Semorile y a todo el Laboratorio de Microbiología Molecular de la UNQ, Barby, Danay, Lucre, Naty, Melina y Victoria, que me acompañaron durante mi primer año de doctorado.
- Al CONICET, a las Fundaciones Bunge y Born, Rene Barón y Williams de Argentina, y al Departamento de Química y Bioquímica de la UCLA, por el apoyo económico.
- A mis padres, Rosita y Nino, y mis hermanos Gastón y Leandro por el apoyo en todo momento. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A la nona María y mi abuela Olga. Mi tío Héctor, la tía Moni y mis primos Gonzalo y Belén.
- A todos mis amigos! en especial a los de toda la vida, Nico, Seba, Fer, Gustavo y Eze.
- A Laura, mi novia, por todo el aguante incondicional de siempre y acompañarme paso a paso y día a día.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
INDICE.....	5
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. LAS FIEBRES HEMORRÁGICAS SUDAMERICANAS (FHS).....	13
1.1.1. <i>Antecedentes históricos de las FHS.....</i>	15
1.1.2. <i>Incidencia de las FHS.....</i>	15
1.1.3. <i>Modo de infección de las FHS.....</i>	17
1.1.4. <i>Síntomas de las FHS.....</i>	18
1.1.5. <i>Tratamiento para las FHS.....</i>	20
1.1.6. <i>Estructura de los Mamarenavirus causantes de las FHS</i>	21
1.1.7. <i>Ciclo de vida de los Mamarenavirus patogénicos.....</i>	23
1.2. EL RECEPTOR DE TRANSFERRINA 1 HUMANO (hTfR1) Y SU ROL EN LA ENTRADA DE LOS MAMARENAVIRUS DE LAS FHS.....	24
1.3. EL ANTICUERPO MONOCLONAL QUIMÉRICO CH128.1 Y LAS FHS.....	29
1.4. LA ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS ANTICUERPOS	30
1.4.1. <i>Variabilidad de los anticuerpos</i>	31
1.4.2. <i>Clases y subclases de anticuerpos</i>	32
1.4.3. <i>Actividades efectoras de los anticuerpos.....</i>	34
1.4.4. <i>Los anticuerpos estructuralmente modificados.....</i>	36
1.4.4.1. <i>Fragmentos de anticuerpos: Fabs y scFv monovalentes, bivalentes, y multivalentes.....</i>	36
1.5. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X.....	39
1.5.1. <i>Cristales de proteínas</i>	40
1.5.2. <i>Difracción de rayos X</i>	42
1.5.3. <i>Fuentes de rayos X.....</i>	42
1.5.4. <i>Detector de rayos X.....</i>	43
1.5.5. <i>Medición y procesamiento de datos.....</i>	44
1.5.6. <i>Determinación de la estructura</i>	45
1.5.7. <i>Reemplazo molecular</i>	46
1.5.8. <i>Refinamiento de la estructura</i>	46
1.5.9. <i>Validación del modelo</i>	47

1.6. MODELADO COMPUTACIONAL DEL ACOPLAMIENTO PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	48
1.6.1. <i>ClusPro</i>	48
1.6.2. <i>Rosetta SnugDock</i>	51
1.6.2.1. Acoplamiento Anticuerpo-Antígeno.....	51
1.6.2.2. Advertencias, desafíos y trampas.....	52
2. OBJETIVOS.....	54
OBJETIVO GENERAL	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	54
3. MATERIALES Y METODOS.....	55
3.1. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	56
3.2. INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN DE PSEUDOVIRUS DECORADOS CON GP1/GP2 DE FHS, EN CÉLULAS HUMANAS IN VITRO	56
3.2.1. <i>Generación del modelo de pseudovirus</i>	56
3.2.2. <i>Ensayo de internalización de pseudovirus en presencia de plasma de pacientes convalecientes de FHA y anticuerpos específicos</i>	57
3.3. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS.....	59
3.3.1. <i>Comparación de secuencias de las glicoproteínas GP1 de todos los Mamarenavirus patogénicos</i>	59
3.3.2. <i>Secuencias de región variable del anticuerpo ch128.1 Fv2014 vs Fv2016</i>	60
3.3.3. <i>Secuencia Fv2016 vs secuencia obtenida de la estructura del Fab128.1</i>	60
3.3.4. <i>hTfR1 de humano vs mTfR1</i>	60
3.4. PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	61
3.4.1. <i>Optimización de codones</i>	61
3.4.2. <i>Transformación de células</i>	61
3.4.2.1. Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> competentes para shock térmico.....	61
3.4.2.2. Transformación de bacterias por shock térmico	61
3.4.2.3. Preparación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes	62
3.4.2.4. Transformación de bacterias por electroporación	62
3.4.3. <i>Expansión y purificación de ADN plasmídico (miniprep)</i>	62
3.4.4. <i>Electroforesis de ácidos nucleicos</i>	63
3.4.5. <i>Electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE</i>	63
3.4.5.1. Geles preparados en el laboratorio	63
3.4.5.2. Geles pre-empacados.....	63
3.4.6. <i>Lisis bacteriana por sonicación</i>	64

3.4.7. Estudio del punto isoelectrico (pI) de las proteínas recombinantes con región variable del AcM ch128.1	64
3.5. PRODUCCIÓN DE sTfR1 HUMANO.....	64
3.5.1. Purificación del sTfR1.....	64
3.5.1.1. Cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)	64
3.5.1.2. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).....	65
3.6. ANTICUERPOS CON LA REGIÓN VARIABLE DEL ACM CH128.1.....	65
3.6.1. Desarrollo de un anticuerpo completo con isotipo IgG4 con la región variable del AcM ch128.1 (ch128.1g4) en células de mamífero.....	65
3.6.1.1. Diseño de los vectores para la expresión del anticuerpo ch128.1g4.....	65
3.6.1.2. Transfección de los vectores en células CHO-K1 y generación de transfectomas.....	66
3.6.1.3. Selección de células resistentes y generación de clones por dilución terminal	66
3.6.2. ELISA sándwich para IgGs.....	67
3.6.3. Desarrollo de fragmentos de anticuerpos de cadena simple con la región variable del AcM ch128.1 en E. coli (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016).....	68
3.6.3.1. Diseño de los vectores de expresión en E. coli	68
3.6.3.2. Transformación, cultivo e inducción de las proteínas recombinantes con la región variable del AcM ch128.1 en E. coli	69
3.6.3.3. Detección de clones transformados con el vector para la expresión del scFv128.1-2014 por colony PCR.....	69
3.6.3.4. Purificación de las proteínas recombinantes con la región variable del AcM ch128.1 en E. coli	70
3.6.4. ELISA sándwich competitivo (scFv128.1-2014).....	71
3.7. OBTENCIÓN DE FAB128.1 MEDIANTE DIGESTIÓN CON PAPAÍNA DEL ACM CH128.1	72
3.7.1. Purificación del Fab128.1 por SEC	72
3.8. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ACM CONTRA hTfR1.....	72
3.8.1. Especificidad contra sTfR1 humano por ELISA sándwich.....	73
3.8.2. Especificidad contra hTfR1 en células por Citometría de flujo.....	73
3.8.3. Determinación del complejo Fab128.1-hTfR1 por SEC	74
3.9. ESTUDIO COMPUTACIONAL DE CRISTALIZABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	74
3.10. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X DEL FAB128.1.....	74
3.11. MODELADO DEL ACOPLAMIENTO DEL FAB128.1 CON EL DOMINIO APICAL DEL hTfR1.....	76
4. RESULTADOS	77

4.1. EVALUACIÓN EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE PSEUDOVIRUS DE LA ACTIVIDAD DEL PLASMA DE PACIENTES CONVALECIENTES DE FHA SOBRE LA INFECCIÓN DE LOS MAMARENAVIRUS DE LAS FHS.....	78
4.1.1. <i>Estudio de secuencia de las glicoproteínas GP1 de los Mamarenavirus de las FHS</i>	82
4.1.2. <i>Correlación entre el efecto de bloqueo de la internalización y la identidad de secuencia de las GP1 de los Mamarenavirus patógenos</i>	82
4.2. GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL DERIVADO DEL ANTICUERPO CH128.1 CON ESCASA O NULA ACTIVIDAD EFECTORA COMO TERAPIA DIRIGIDA CONTRA LAS FHS.....	84
4.2.1. <i>Desarrollo de un anticuerpo completo con isotipo IgG4 con la región variable del AcM ch128.1 (ch128.1g4) en células de mamífero.....</i>	84
4.2.2. <i>Producción de fragmentos scFv con la región variable de ch128.1</i>	87
4.2.3. <i>Obtención de sTfR1 humano.....</i>	88
4.2.4. <i>Desarrollo de scFv128.1-2014 contra el hTfR1 en E. coli</i>	90
4.2.5. <i>Estudio del pl de las proteínas recombinantes con región variable del AcM ch128.1 ...</i>	95
4.2.6. <i>Desarrollo de scFv128.1-2016 en E. coli</i>	97
4.2.7. <i>Desarrollo de la proteína de fusión MBP-scFv128.1-2016 en E. coli.....</i>	103
4.2.8. <i>Purificación del fragmento Fab del anticuerpo ch128.1 (Fab128.1) mediante digestión con papaína</i>	107
4.2.9. <i>Bloqueo de la entrada de pseudovirus de los Mamarenavirus causantes de las FHS en una línea celular humana</i>	112
4.3. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA REGIÓN VARIABLE DEL ANTICUERPO CH128.1 Y PROPUESTA DE UN MODELO DE SU UNIÓN CON EL hTfR1 QUE EXPLIQUE EL BLOQUEO DE LA ENTRADA DE LOS MAMARENAVIRUS DE LAS FHS	115
4.3.1. <i>Estudio de cristalizabilidad de las proteínas con región variable del anticuerpo ch128.1</i>	115
4.3.2. <i>Cristalografía de rayos X del Fab128.1</i>	116
4.3.3. <i>Modelado del acoplamiento Fab128.1 con el dominio apical del sTfR1 humano</i>	122
5. DISCUSION	131
6. CONCLUSIONES	144
REFERENCIAS	148

ABREVIATURAS

AcM: Anticuerpo monoclonal

AcNT: Anticuerpos neutralizantes

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATCC: *American Type Culture Collection*

BSA: Albumina sérica bovina

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento

CDRs: Regiones determinantes de la complementariedad

C_H: Región constante de la cadena pesada

CHAV: Virus Chapare

C_L: Región constante de la cadena liviana

DO: Densidad óptica

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

Fab: Fragmento de unión al antígeno

FHA: Fiebre Hemorrágica Argentina

FHB: Fiebre Hemorrágica Boliviana

FHS: Fiebres Hemorrágicas Sudamericanas

Fv: Fragmento variable

GFP: Proteína verde fluorescente

GTOV: Virus Guanarito

h: Horas

HFE: Hemocromatosis humana

hTfR1: Receptor de transferrina 1 humano

IEV: Inhibidor de entrada de virus

IPTG: Isopropil β -D-tiogalacto-piranosido

JUNV: Virus Junín

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

MACV: Virus Machupo

MBP: Proteína de unión a maltosa

mTfR1: Receptor de transferrina 1 de ratón

NIAID: Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos

ORF: Marco de lectura abierto

PBS: Solución amortiguadora de fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Banco de Datos de Proteínas

PEG: Polietilenglicol

RMSD: Desviación de la raíz media cuadrada

s: Segundos

SABV: Virus Sabiá

SBF: Suero bovino fetal

scFv: Fragmento variable simple cadena

SD: Desviación estándar

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño

SHM: Hipermutación somática

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

SSP: Péptido señal estable

sTfR1: receptor de transferrina 1 soluble

TEV: Proteasa del virus del tabaco (*Tobacco Etch Virus Protease*)

Tf: Transferrina

TfR1: Receptor de transferrina 1

V_H: Región variable de cadena pesada

V_L: Región variable de cadena liviana

vol. : Volúmenes de columna

Wt: Bacterias salvajes

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las Fiebres Hemorrágicas Sudamericanas (FHS)

Las FHS son un conjunto de enfermedades que tienen como agentes etiológicos virus que pertenecen a la familia *Arenaviridae*. Actualmente esta familia se encuentra dividida en los géneros *Mamarenavirus* y *Reptarenavirus*, por la capacidad de infectar a 33 especies de mamíferos y 3 de reptiles respectivamente [1]. A su vez, el género *Mamarenavirus* ha sido dividido tradicionalmente en base a características antigénicas y distribución geográfica en dos grupos posteriormente confirmados por datos de secuenciación genómica: Mamarenavirus del Viejo Mundo (Serocomplejo virus de la Coriomeningitis Linfocítica: Lassa (LASV)), endógenos del continente africano y Mamarenavirus del Nuevo Mundo (Serocomplejo virus Tacaribe, (TCRV)), endógenos del continente americano. Este último complejo está subdividido en cuatro grupos filogenéticos: clase A, que incluye virus no patogénicos, a excepción del virus Flexal (FLEV); clase B, que incluye a los Mamarenavirus patógenos para humanos: Virus Chapare (CHAV), Virus Guanarito (GTOV), Virus Junín (JUNV), Virus Machupo (MACV), Virus Sabiá (SABV) que causan las conocidas FHS, entre otros virus no patogénicos; clase C, compuesta por virus que hasta el momento no han reportado ser patógenos; y tentativamente clase D o A/B [1].

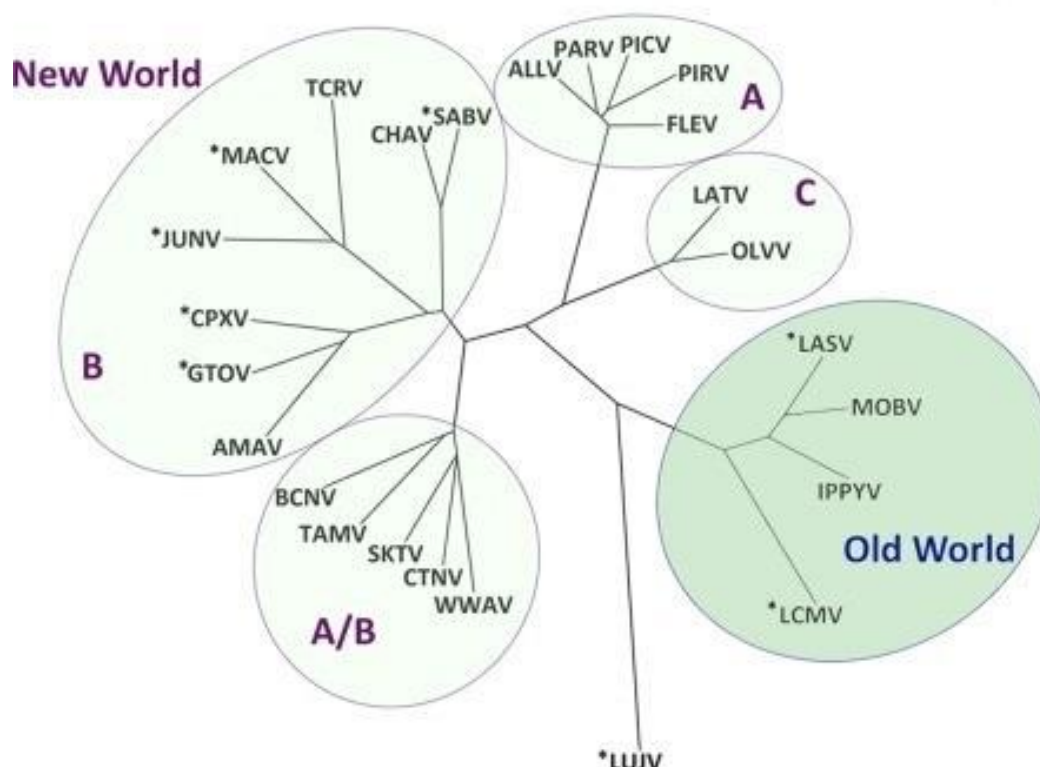


Figura 1. Árbol filogenético de los Mamarenavirus conocidos. En verde oscuro se pueden ver los Mamarenavirus del Viejo Mundo (*Old World*), en verde claro se muestran los Mamarenavirus del Nuevo

Mundo (*New World*). Dentro de los Mamarenavirus del Nuevo Mundo se clasifican en Mamarenavirus clase A, B, C y A/B o D. [2]

En la **TABLA 1** se muestran los Mamarenavirus del Nuevo Mundo clase B causantes de las FHS asociadas con muertes de pacientes infectados. Se excluyen de la misma a los FLEV y TCRV, ya que sólo se han reportado dos y un caso respectivamente, con síntomas febriles leves, todos ellos en trabajadores de laboratorio infectados durante su manipulación [3]. Los Mamarenavirus JUNV, MACV, GTOV, SABV y CHAV son los agentes etiológicos de las Fiebres Hemorrágicas Argentina (FHA), Boliviana (FHB), Venezolana (FHV), Brasileña y de Chapare, respectivamente. Sobre estos Mamarenavirus nos centraremos a lo largo de este trabajo de tesis.

TABLA 1.
Mamarenavirus del Nuevo Mundo causantes de las FHS.

Virus	Clase	Receptor utilizado	Patología	Distribución	Huésped principal	Primera descripción	Aislamiento del virus
Junín	B	hTfR1	Fiebre Hemorrágica Argentina	Argentina (Centro)	<i>Calomys musculus</i>	1955	1959
Machupo	B	hTfR1	Fiebre Hemorrágica Boliviana	Bolivia (Noreste)	<i>Calomys callosus</i>	1959	1963
Guanarito	B	hTfR1	Fiebre Hemorrágica Venezolana	Venezuela (Centro)	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	1989	1991
Sabiá	B	hTfR1	Fiebre Hemorrágica Brasileña	Brasil	Desconocido	1990	1990
Chapare	B	hTfR1	Fiebre Hemorrágica de Chapare	Bolivia	Desconocido	2003	2003

Las FHS pertenecen a la categoría de patógenos de Prioridad A según el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) de EE.UU. [4]. Esta clasificación se debe a que presentan: a) alta infectividad y mortalidad; b) potencial de transmisión de persona a persona; c) baja dosis infectiva y altamente infeccioso por diseminación en aerosol, con capacidad de generar grandes epidemias; d) vacunas efectivas no disponibles o disponibles en forma limitada; e) potencial de causar ansiedad en el público y en trabajadores de la salud; f) disponibilidad del patógeno; g) factibilidad de producción en gran escala; h) estabilidad ambiental; e i) investigación previa en su desarrollo como arma biológica [5]. Estudios con macacos demostraron que la exposición a JUNV en forma de aerosol es altamente infecciosa y letal, matando al 100% de los animales expuestos con síntomas similares a los observados en humanos [6]. En el caso de JUNV y MACV estos agentes han sido reportados como desarrollos de armas biológicas durante la Guerra Fría [7].

1.1.1. Antecedentes históricos de las FHS

Los primeros reportes de casos de FHS corresponden a pacientes con FHA, que fue descrita por primera vez en el año 1955 [8], bautizándose a su agente etiológico como JUNV por el lugar geográfico donde fue originalmente aislado en 1959 [8]. Desde su descubrimiento se han registrado brotes anuales de forma ininterrumpida en una región progresivamente mayor, llegando al estado actual en el que alrededor de 5 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer FHA [9]. Luego le sigue la FHB que fue identificada en el año 1959 en el noreste de Bolivia, cerca de la ciudad de San Joaquín, en el contexto de un brote que duró de 1959 a 1963 [10]. Su agente etiológico, el MACV fue aislado por primera vez en 1963 [11]. Siguiendo en orden cronológico, la FHV que fue reportada por primera vez como entidad clínica independiente en 1989 durante un brote ocurrido en el municipio de Guanarito, en el estado de Portuguesa en Venezuela [12]. El agente etiológico es el GTOV, identificado como un nuevo Arenavirus en 1991 [13]. Posteriormente se aisló SABV de pacientes infectados con la llamada Fiebre Hemorrágica Brasileña a partir de un caso fatal en San Pablo en 1990 [12]. Finalmente, el más actual de las FHS es la Fiebre Hemorrágica de Chapare que fue identificada a partir de un caso de fiebre hemorrágica en Bolivia durante el año 2003. Posteriormente se detectó y amplificó el genoma viral de la sangre del paciente, y se determinó que pertenecía a un miembro desconocido de la Clase B de los Mamarenavirus del Nuevo Mundo, bautizado como CHAV. Por lo tanto, existen dos arenavirus: el MACV y el CHAV, relacionados con casos de fiebres hemorrágicas virales en Bolivia [14] (**TABLA 1**).

1.1.2. Incidencia de las FHS

Como ya se mencionó anteriormente, de todas las FHS, la FHA es la más antigua y la cual presenta mayor incidencia y registro. Durante el período 2003-2016 se registraron un promedio de 153 casos de FHA y 15 muertos por año, es decir aproximadamente un 10% de mortalidad. En donde en los últimos años, en el período 2010-2016 se incrementaron los casos de forma considerable, registrándose en promedio 269 casos y 20 muertos por año, es decir, aproximadamente un 7% de mortalidad [15-25] (**Figura 2**).

La Fiebre Hemorrágica que le sigue a la FHA con respecto a la incidencia de la enfermedad es la FHB. La mortalidad es variable entre los distintos brotes, pero se estima en un 25% promedio. Por ejemplo, desde 2010 a 2013 se registraron un total de 131 casos y 10 muertes, mucho menos que los 470 casos y 172 muertos del brote de 1959-1962 [26].

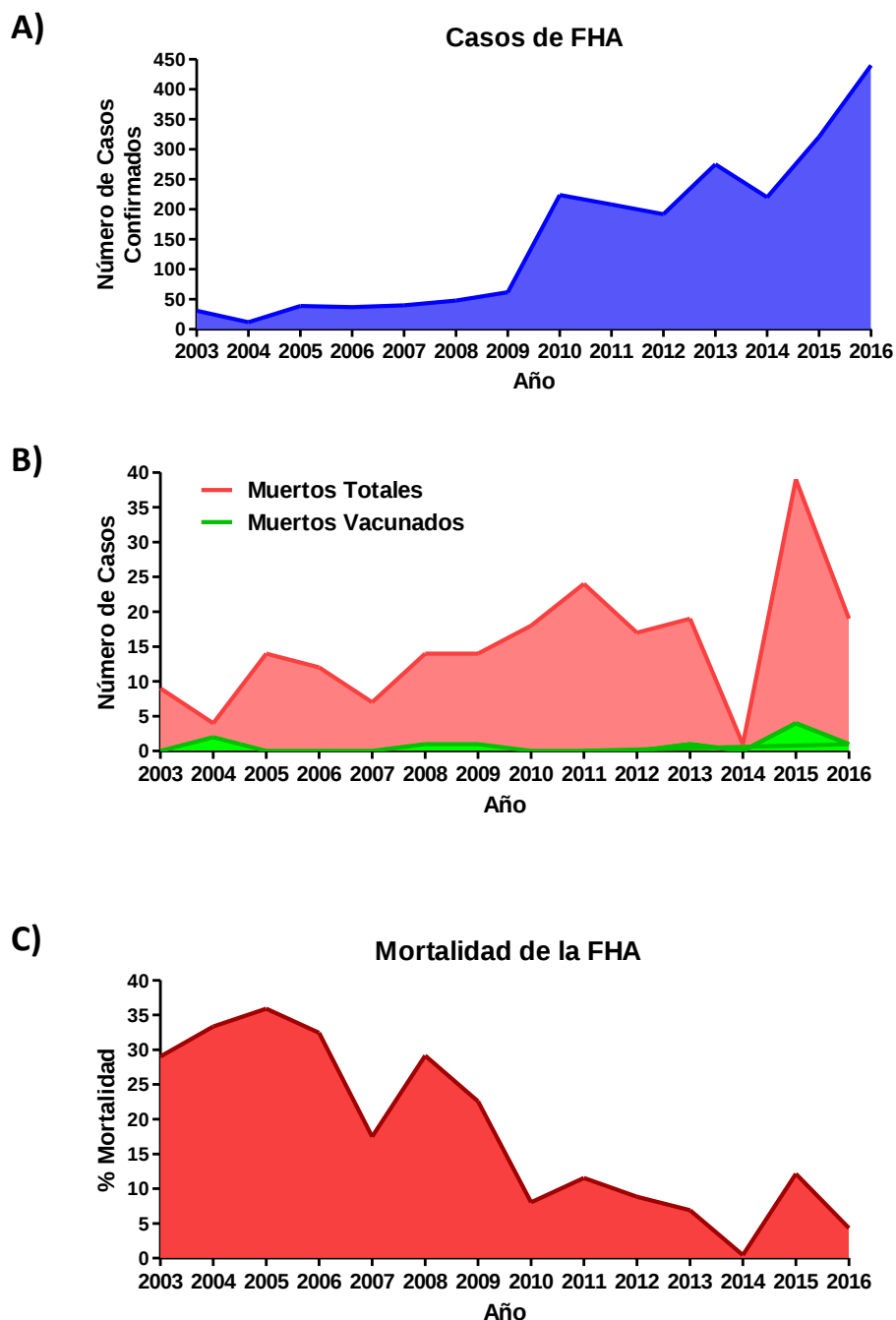


Figura 2. Datos epidemiológicos FHA. Se muestran los casos confirmados de FHA desde el 2003 al 2016 (A), los muertos totales y muertos vacunados (B) y el porcentaje de mortalidad (C) a lo largo del mismo período de tiempo. Los datos fueron tomados de los Informes realizados para las reuniones anuales del Programa Nacional de Control de la FHA [15-25].

Desde la emergencia de FHV en 1989 hasta octubre de 2010 se han registrado 728 casos con 171 muertes, lo que representa una letalidad de 23% en el periodo. Desde 2010 al 2012 se han registrado tres brotes epidémicos con un incremento en el número de casos en cada brote y disminución de los periodos inter-epidémicos [27].

De la Fiebre Hemorrágica Brasileña solo se han reportado cuatro casos desde su aislamiento a partir de un caso fatal en 1990 [12]. Se registraron dos casos no fatales, en trabajadores de laboratorio infectados al manipular el virus en 1992 y 1994, y un caso fatal adquirido en circunstancias naturales en 1999 [28]. Mientras que para la Fiebre Hemorrágica de Chapare se han confirmado solo dos casos producidos en 2003 y 2004 en donde ambos fueron fatales [14].

1.1.3. Modo de infección de las FHS

Cada uno de los Mamarenavirus causantes de enfermedades está asociado con una especie o un par de especies íntimamente relacionadas que constituyen su reservorio natural. Por esta razón, las infecciones con los Mamarenavirus de las FHS son zoonóticas en donde la transmisión a los seres humanos está mediada por el contacto con animales hospedadores. Los principales, de este conjunto de enfermedades, son roedores pertenecientes a la familia *Muridae*, subfamilia *Sigmodontinae*, específicos para cada uno de los virus [29]. El reservorio natural de JUNV es el roedor *Calomys musculus*, también conocido como “ratón maicero”, que presenta infección crónica asintomática con JUNV y es el principal huésped del virus. El reservorio natural de MACV es el roedor *Calomys callosus*. En este caso, es interesante notar que si bien el mismo se distribuye tanto en Bolivia, Brasil, Paraguay y Argentina; MACV es endémico solamente en una pequeña región de Bolivia, en la cual habita un determinado linaje monofilético del roedor. Mientras que el reservorio natural del GTOV es el roedor *Zygodontomys brevicauda*, o ratón de la caña de azúcar [13]. Para SABV y CHAV hasta el momento no se conoce su reservorio natural pero se cree que pueden ser roedores (**Figura 3**).

La mayor parte de los casos de FHS ocurren durante los períodos de cosecha en trabajadores masculinos, lo cual puede explicarse por las modificaciones ambientales realizadas por los seres humanos con fines agrícolas, que favorecen el contacto con los roedores o aerosoles de sus excreciones (saliva, orina, heces o sangre). Las mismas pueden ingresar al cuerpo mediante la piel, el tracto respiratorio (por inhalación) o por las mucosas gastrointestinales. No obstante, otra vía común de infección es la ingesta de comida contaminada con orina o heces de los animales, así como también el uso de instrumental médico contaminado [30]. Por lo tanto, la distribución geográfica de estos animales delimita los focos endémicos de cada enfermedad. La zona endémica de la FHA afecta el área central de la Pampa húmeda; la FHB y de Chapare la región norte de Bolivia; la Fiebre Hemorrágica Brasileña la zona sureste de Brasil; y la FHV la zona oeste de Venezuela (**Figura 4**).

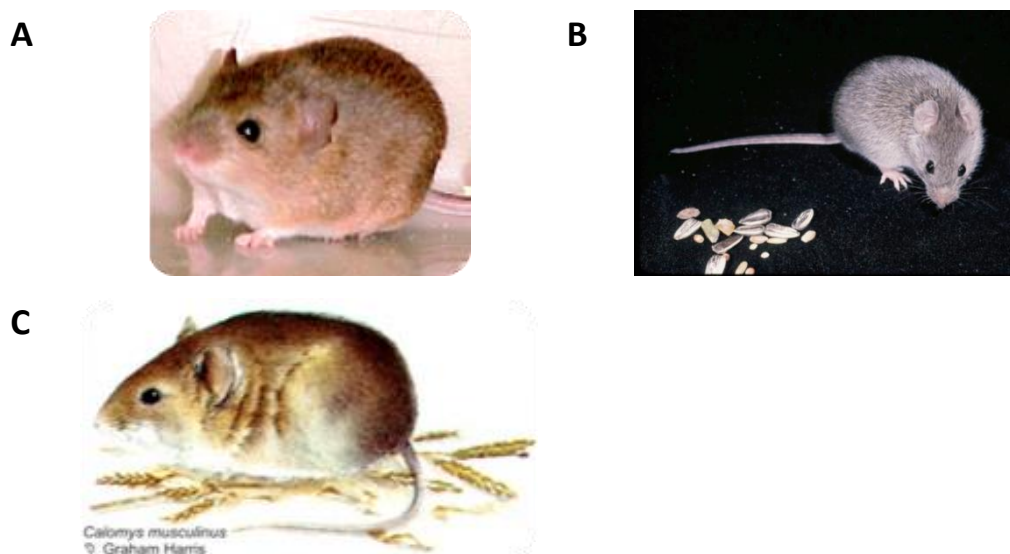


Figura 3. Reservorios naturales de los Mamarenavirus causantes de las FHS. A) MACV, *Calomys callosus* (Laucha Campestre). B) GTOV, *Zygodontomys brevicauda* (Ratón de la caña de azúcar). C) JUNV, *Calomys musculus* (Ratón Maicero).

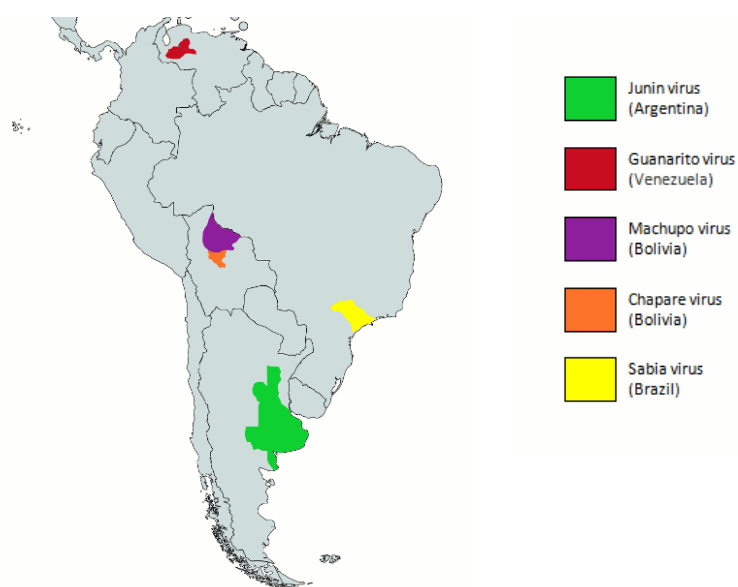


Figura 4. Distribución geográfica de los Mamarenavirus causantes de FHS. [31]

1.1.4. Síntomas de las FHS

La manifestación clínica de las FHS se encuadra dentro de los síntomas de una Fiebre Hemorrágica Viral, categoría compartida con enfermedades como el Dengue, la Fiebre Amarilla y el Ébola [32]. Particularmente, los Mamarenavirus del Nuevo Mundo suelen causar fiebre, hemorragias, leucopenia, trombocitopenia, edema, shock, petequias (alteración sanguínea), convulsiones, mialgia,

vómitos y artralgia. No obstante, los síntomas son muy variables entre los virus e incluso entre individuos con la misma enfermedad, con lo cual el diagnóstico clínico puede volverse una tarea dificultosa [33].

Los pacientes infectados por JUNV presentan un período de incubación asintomática de 4 a 21 días y una fase sintomática de 12 a 18 días [34] (**Figura 5**). En la primera etapa se pueden mostrar síntomas leves generalmente asociado a un síndrome de tipo gripal como fiebre, mialgia, hipotensión leve, conjuntivitis, hemorragia petequeial de los tejidos blandos, letargo e irritabilidad con poco compromiso hematológico y neurológico. Durante la siguiente etapa, alrededor del 75% de los pacientes comienza a mejorar, mientras que el otro 25% manifiesta hemorragias y desórdenes neurológicos, con fiebre persistente, sangrado gingival y petequias en la mucosa oral y región axilar. El compromiso del sistema nervioso central se manifiesta a través de hiporeflexia y confusión general, pero en casos severos puede derivar en areflexia, hipotonía muscular, ataxia, temblores, delirios, convulsiones y coma [35]. Sin tratamiento llevan a la muerte en un 15-30% de los casos [30]. La presentación clínica de la FHB es muy similar a la de la FHA, con un período de incubación de entre 3 y 16 días seguido de una fase prodrómica, tras la cual aproximadamente una tercera parte de los pacientes desarrolla síntomas severos como hipotensión, hemorragias, convulsiones y coma. La mortalidad es variable entre los distintos brotes, pero se estima en un 25% promedio [26]. Los otros Mamarenavirus del Nuevo Mundo también tienen una alta tasa de mortalidad y pueden causar una amplia gama de síntomas que van desde fiebre, dolor de garganta, dolor de cabeza, mialgias, náuseas, dolor abdominal, vómitos, diarrea, petequias conjuntival y/o de la mucosa, hasta los síntomas más graves como hemorragias, trombocitopenia, leucopenia, hematuria, temblores, edema pulmonar, dificultad respiratoria, y hemorragias gastrointestinales y necrosis. Los síntomas neurológicos como shock, coma y convulsiones son frecuentes en las infecciones con GTOV y MACV [36].

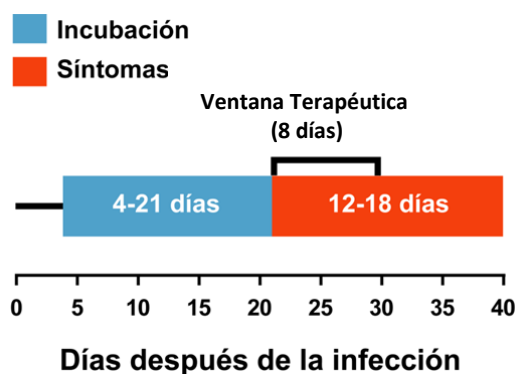


Figura 5. Evolución de las FHA en humanos infectados. La evolución de las FHA comprende una primer etapa asintomática de incubación que puede ir de los 4 a los 21 días y luego una etapa sintomática que puede ir de los 12 a los 18 días. Se muestra también la ventana terapéutica del JUNV, el único Mamarenavirus patógeno

para el cual existe tratamiento eficaz, que comprende hasta los 8 días luego de la aparición de los síntomas. Adaptado de [34].

1.1.5. Tratamiento para las FHS

Para el tratamiento de las FHS el uso de ribavirina (1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), un análogo nucleosídico, ha mostrado cierta eficacia, aunque se han reportado efectos secundarios como trombocitopenia y anemia, y en casos avanzados de FHA no reduce la mortalidad. Por lo tanto, aunque es la única terapia utilizada actualmente para el tratamiento de las FHS, su acción en humanos no es específica y presenta grandes desventajas en el uso terapéutico [9, 33].

Actualmente las opciones preventivas y terapéuticas contra las FHS se limitan principalmente al tratamiento de la FHA. Está disponible la vacuna a virus vivo llamado CANDID-1, la cual exhibe un alto grado de atenuación de la virulencia [37]. La vacuna mostró una eficacia de 95% y solo está aprobada para las áreas endémicas en Argentina. El tratamiento para la FHA consiste en la inmunoterapia pasiva con el plasma de pacientes convalecientes. Este plasma contiene anticuerpos policlonales dirigidos contra distintas partes del virus y otros factores que contribuyen a su inactivación. Sin embargo, el tratamiento con plasma exhibe limitaciones significativas: a) no muestra eficacia en pacientes con más de 8 días de evolución [38]; b) plantean el riesgo de enfermedades transmitidas por transfusión [39]; c) no es eficaz para los pacientes gravemente enfermos que progresan a una fase neurológica-hemorrágica [9]; y d) se plantean dificultades para mantener un *stock* adecuado de plasma inmune [9, 34].

Los esfuerzos de investigación más recientes se centran en el desarrollo de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra las glicoproteínas (**TABLA 2**) de JUNV, pero la variabilidad de estas proteínas lleva a que estos anticuerpos sólo sean eficaces contra JUNV, pero no contra MACV, CHAV, GTOV y SABV [34, 40]. Recientes estudios demostraron que esto podría deberse a que las glicoproteínas de los Mamarenavirus MACV y JUNV presentan diferencias en la accesibilidad al sitio de unión con el receptor de entrada, lo que resulta en una pobre reactividad cruzada de anticuerpos neutralizantes (AcNT) [41].

El anticuerpo GD01 mostró ser el más eficaz de sólo unos pocos anticuerpos que fueron estudiados sobre una lista de 28 anticuerpos que han demostrado algún nivel de neutralización para el virus JUNV [42] y que se encuentran dentro del banco de “Recursos de Investigación en Biodefensa e Infecciones Emergentes” (BEI *Resources*) de los EE.UU. [43]. BEI *Resources*, es la principal fuente de cultivos y reactivos de alta calidad para la investigación en microbiología y enfermedades infecciosas.

Los recursos de BEI pueden servir como un catalizador para los esfuerzos de investigación en todo el mundo y son proporcionados de forma gratuita a los investigadores registrados. En contraste, para MACV, CHAV, GTOV y SABV no hay ningún anticuerpo homólogo en dicho repositorio. Este escenario hace que nuevos abordajes con formas alternativas de tratamiento para las FHS sean urgentemente necesarios.

Hasta la fecha, solo un AcM recombinante ha sido aprobado para tratamiento de enfermedades infecciosas y otros ocho candidatos se encuentran en estudios clínicos. El AcM humanizado Synagis® (palivizumab), dirigido contra la proteína F del Virus Sincitial Respiratorio, es el único AcM contra una enfermedad viral aprobado por la FDA de los EE.UU. [44].

Nombre anticuerpo	Neutralizante para:	Isotipo	Anti	Origen	Modelo de prueba	Referencia
J199	JUNV	IgG1 humano, Kappa humano	GP1	Plantas (Nicotiana Benthamiana)	Formación de placas (<i>candid</i> <i>In vivo</i> en cobayos (Guinea Pig)	[34]
GD01	JUNV	Fab, IgG2a de ratón	GP1	Ratón (Hibridoma)	Formación de placas de P3406 (Cepa de JUNV)	[40, 42]

TABLA 2. Anticuerpos neutralizantes en estudio para el tratamiento de las FHS.

1.1.6. Estructura de los Mamarenavirus causantes de las FHS

Como ya se mencionó, las FHS son un conjunto de enfermedades que tienen como agentes etiológicos virus que pertenecen a la familia *Mamarenaviridae*. Esta familia constituye un importante grupo de virus envueltos de forma esférica, de entre 50 a 300 nm de diámetro [45-48]. El aspecto arenoso de las partículas en las secciones de microscopía electrónica les dio su nombre a estos virus (**Figura 6, A**). Los Mamarenavirus están compuestos por un genoma de ARN ambisentido distribuido en dos segmentos monocatenarios, denominados L (*large* o grande) y S (*small* o pequeña), una glicoproteína de envoltura (GP), una nucleoproteína estructural (NP) y una proteína de matriz de unión a zinc (Z) (**Figura 6, B**). [1]

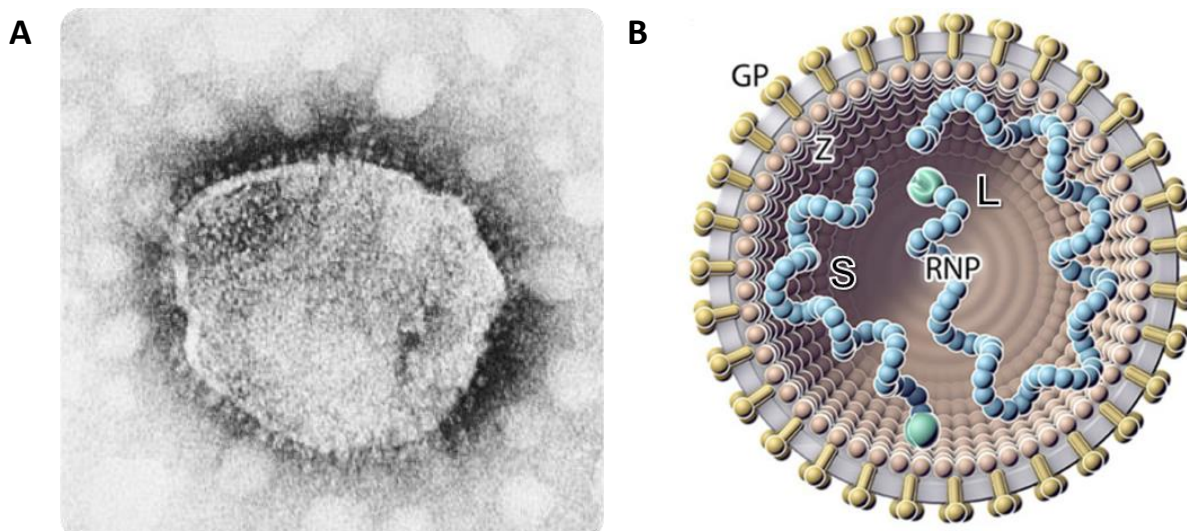


Figura 6. Estructura de los Mamarenavirus. A) Fotografía de microscopía electrónica donde se puede ver la apariencia arenosa que llevó al nombre de “arenavirus”. B) Estructura de los Mamarenavirus. GP: Glicoproteína, NP: nucleoproteína, Segmento de ARN L y S, proteína Z: proteína de matriz de unión a zinc. Adaptado de [1]

Cada segmento genómico de los Mamarenavirus codifican dos proteínas diferentes en dos marcos de lectura abiertos (ORF) no reversibles de polaridades opuestas [49]. El segmento L (≈ 7.200 nt) codifica una ARN polimerasa viral (L) dependiente de ARN y una proteína de matriz de unión a zinc (Z) [50]. El segmento S (≈ 3.500 nt) codifica una nucleoproteína (NP) y un precursor de la glicoproteína de la envoltura (GPC) [51-53]. Los dos ORFs en cada segmento están separados por una región intergénica no codificante (IGR) que podría formar una o más estructuras de horquilla energéticamente estables [49, 54]. El IGR funciona en la terminación de la transcripción dependiente de la estructura y en el ensamblaje del virus [55] (**Figura 7**).

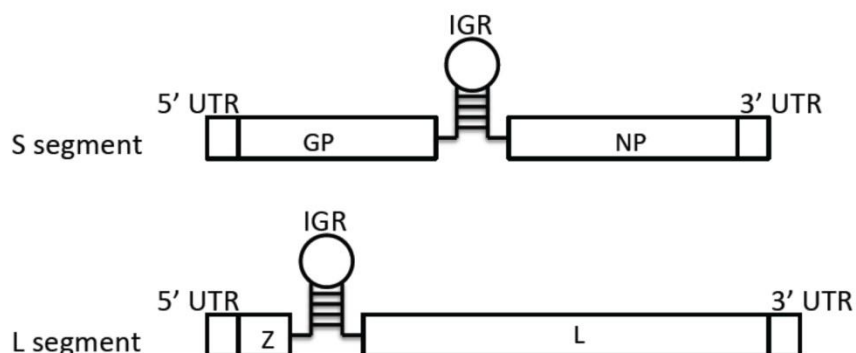


Figura 7. Estructura del genoma de los Mamarenavirus. El genoma de los Mamarenavirus se compone de dos segmentos: El segmento genómico L (grande) que codifica la proteína de la matriz Z y la proteína L polimerasa; y el segmento S (pequeño) que codifica la glicoproteína (GP) y la nucleoproteína (NP). Los genes codificados en cada segmento están separados por regiones intergénicas no codificantes (IGR). Los genomas lineales están flanqueados por las regiones 5' y 3' conservadas no traducidas (UTR). [56]

La proteína NP es la mayor progenie estructural de los mamíferos. Es un componente de las nucleocápsides, asociada con el ARN viral en forma de estructuras similares a perlas y es esencial para la transcripción y la replicación [57, 58]. Al igual que otras ARN polimerasas dependientes de ARN, L lleva a cabo dos procesos diferentes: la transcripción y la replicación [59-63]. La proteína Z de la matriz contiene un motivo RING que se une al zinc [50] y es la principal fuerza motriz para la gemación de los Mamarenavirus [57, 64, 65]. Las dos glicoproteínas de la envoltura viral, glicoproteína 1 (GP1) y glicoproteína 2 (GP2), se derivan de la escisión postraducciona del complejo GPC. Este complejo está constituido de las GP1 y GP2 (complejo GP1/GP2) junto con un péptido señal estable (SSP) que es cortado durante la síntesis de GPC y forma la espícula del virión que media la unión y la fusión con la membrana celular del huésped.

1.1.7. Ciclo de vida de los Mamarenavirus patogénicos

Durante la infección, los Mamarenavirus se unen a los receptores de la superficie celular y se internalizan por endocitosis [66-68]. Los Mamarenavirus del Viejo Mundo como es LASV, usan el receptor celular α -distinglicano (α DG) para infectar a las células [69] mientras que los Mamarenavirus del Nuevo Mundo no usan este receptor [70] sino que usan al hTfR1 [71]. La fusión con los endosomas tardíos es dependiente del pH. Cuando disminuye el pH en el endosoma el complejo de ribonucleoproteína viral (RNP) que contiene NP, L y ARN genómico viral del virión se libera en el citoplasma, donde el RNP dirige tanto la replicación del genoma de ARN como la transcripción de los genes virales [48]. Durante la replicación, L lee a través de la señal de terminación de la transcripción de IGR y genera ARN antígenómicos y genómicos sin protección [72]. Estos ARN contienen una única guanina libre en el extremo 5' [61, 73]. En consecuencia, la iniciación de la replicación podría implicar un mecanismo de deslizamiento de L en el ARN naciente [59]. La transcripción de ARNm de GPC y Z ocurre solo después de una ronda de replicación del virus, durante la cual se producen S y L. La poliproteína GPC se sintetiza en el lumen del retículo endoplasmático, donde es altamente N-glicosilada, y donde se piensa que oligomeriza antes del procesamiento proteolítico mediante la proteasa *subtilisina kexin-isozima-1 / sitio-1* (SKI-1 / S1P). La maduración proteolítica de GPC, así como su tráfico desde el retículo endoplasmático a la superficie celular, depende del SSP [73]. La gemación del virión se produce a partir de la membrana plasmática celular, proporcionando así la envoltura del virión [57, 64, 65, 74] (**Figura 8**).

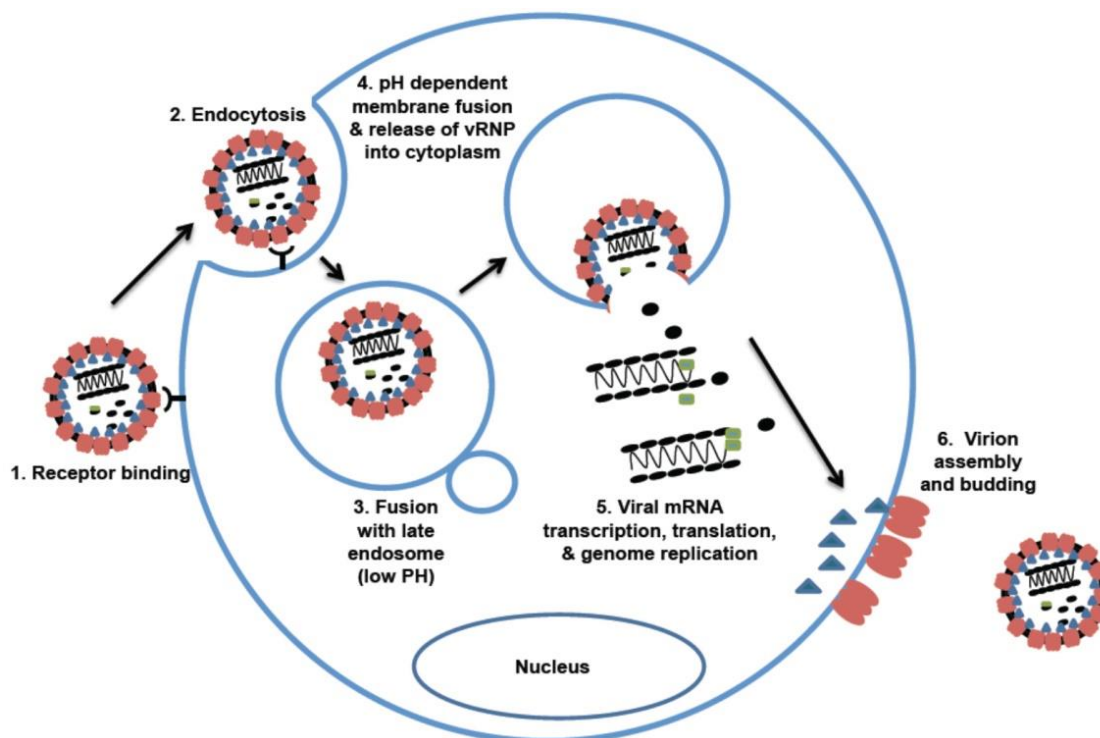


Figura 8. Ciclo de vida de los Mamarenavirus patogénicos. 1. La entrada a la célula está mediada por diferentes receptores celulares (α DG para Mamarenavirus del Viejo Mundo y clase C del Nuevo Mundo; hTfR1 para la clase B de Mamarenavirus del Nuevo Mundo). 2. La entrada del virus en las células está mediada por endocitosis independiente de clatrina para los Mamarenavirus del Viejo Mundo y dependiente de clatrina para los Mamarenavirus del Nuevo Mundo. 3. Ocurre la fusión del virus con el endosoma tardío. 4. La NP viral se libera en el citoplasma a través de un mecanismo de fusión de membrana dependiente del pH. 5. La replicación del genoma viral, la transcripción y la expresión de proteínas se producen estrictamente en el citoplasma. 6. El ensamblaje del virión y la gemación se producen en la membrana plasmática. [56]

1.2. El receptor de transferrina 1 humano (hTfR1) y su rol en la entrada de los Mamarenavirus de las FHS

Como un cofactor esencial para la vida, el hierro facilita varias reacciones enzimáticas críticas para la replicación del ADN y la respiración celular. Los procesos celulares que dependen del hierro incluyen la síntesis de nucleótidos y el transporte de electrones. Sin embargo, el hierro ferroso libre puede ser tóxico para los sistemas vivos [75]. Para evitar esta toxicidad, los organismos han desarrollado sistemas de transporte y almacenamiento de hierro tales como proteínas transportadoras (transferrina y ferritina), grupos hemo y *clusters* hierro-azufre [75]. La transferrina (Tf) se encuentra en la sangre de los mamíferos como una proteína de dos lóbulos [76]. En condiciones fisiológicas neutras, cada molécula de transferrina es capaz de unirse a dos átomos de hierro férrico. Tf libera su carga de hierro a pH bajo, observándose la liberación máxima cerca de pH 5 [77]. La evidencia definitiva del TfR1 (CD71) se encontró primero en reticulocitos de conejo [78] y

luego se confirmó en una variedad de especies y tipos de células, incluyendo placenta humana, fuente rica de hTfR1 [79, 80]. El hTfR1 es una proteína de la superficie celular que se une a Tf y facilita su endocitosis desde el plasma [76]. El receptor existe en la superficie de la célula como un receptor tipo II de glicoproteína homodimérico, y puede unir hasta dos moléculas de transferrina. El dominio extracelular de hTfR1 contiene tres subdominios: un dominio helicoidal, uno tipo proteasa y uno apical (**Figura 9**).

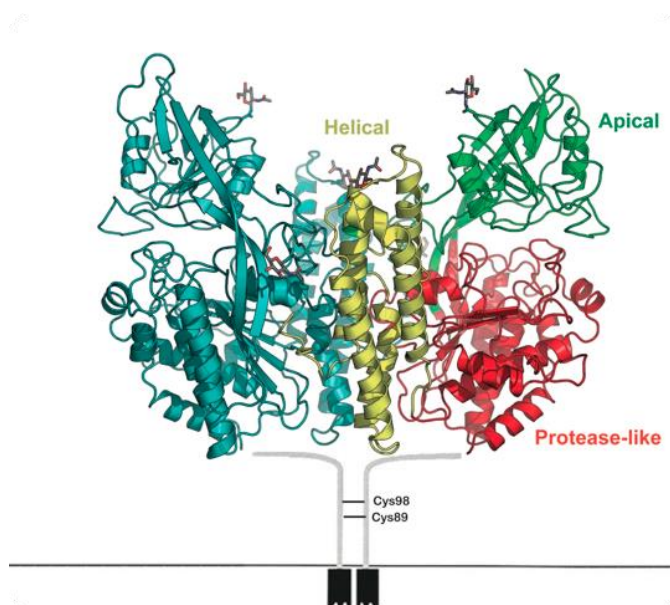


Figura 9. Receptor de transferrina humano. Esquema del homodímero de hTfR1 en la superficie celular que consiste de dos monómeros unidos por puentes disulfuro en las cisteínas 89 y 98. El hTfR1 contiene un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio grande extracelular. Este último consta de tres subdominios: apical (*Apical*, verde), helicoidal (*Helical*, amarillo) y dominio tipo proteasa (*Protease-like*, rojo).

hTfR1 está codificado por el gen TfRC que pertenece a familia del receptor de transferrina. La familia de receptores incluye a TfR2 el cual se deriva de antiguas carboxipeptidasas [81]. El homodímero de hTfR1 se mantiene unido por enlaces disulfuro y realiza endocitosis constitutivamente a través de la vía canónica mediada por clatrina. Una vez en los endosomas acidificados, un receptor que porta Tf cargado de hierro sufre una reorganización estructural que promueve la liberación de hierro de la Tf. Mientras tanto, la molécula de Tf libre de hierro permanece unida al receptor y se recicla a la superficie de la célula donde se libera a un pH neutro (**Figura 10**). El reciclaje del hTfR1 puede ocurrir cientos de veces durante la vida de un solo receptor [82]. En cualquier momento dado, una célula puede expresar cientos de miles de copias de hTfR1 [83] con solo un pequeño porcentaje presente en la superficie de la célula. Los tres subdominios de hTfR1 son necesarios para la unión de la Tf. El dominio helicoidal de hTfR1 es responsable de la dimerización. El dominio similar a proteasa se asemeja a la familia *glutamate carboxypeptidase* de

proteasas asociadas a la membrana, que incluyen el antígeno de membrana prostático específico (PSMA) [81]. hTfR1 carece de actividad proteasa debido a cambios evolutivos en residuos clave dentro de su sitio activo ancestral. hTfR1 se degrada en el lisosoma y depende de un ambiente de pH bajo [84]. Cuando se desprende de la membrana, el dominio extracelular de hTfR1 se puede encontrar en los espacios intersticiales y circulando en la sangre, donde se ha convertido en un marcador diagnóstico de homeostasis de hierro [85].

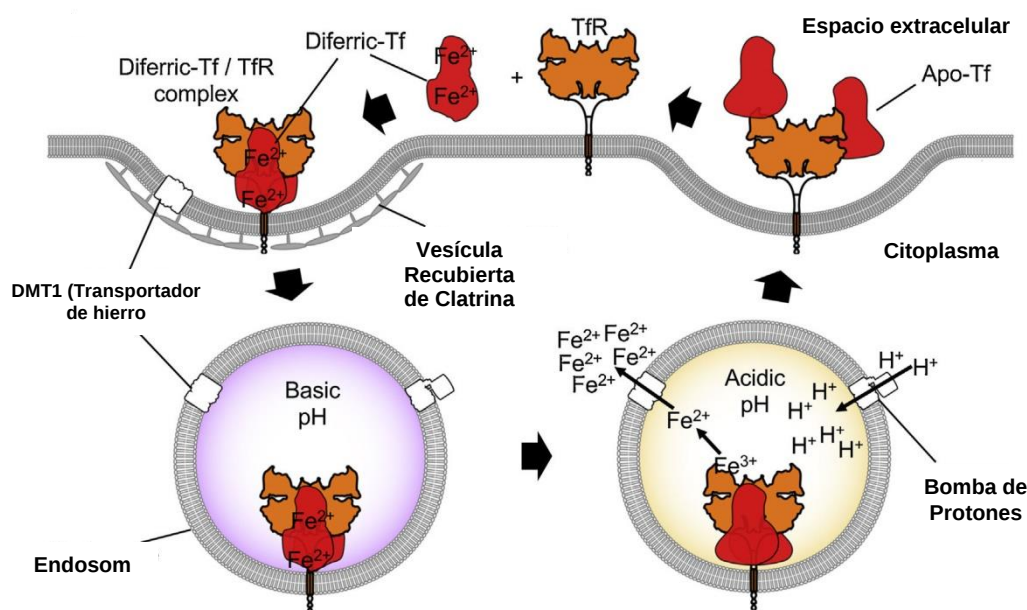


Figura 10. Internalización del hierro del hTfR1. Endocitosis de Tf cargada de hierro unida a hTfR1 a través de depresiones recubiertas de clatrina en el compartimento del endosoma. La acidificación a través del bombeo de protones en el endosoma induce una modificación conformacional en Tf que da como resultado la liberación del hierro. El hierro es luego bombeado al citosol desde el endosoma por el transportador de metal divalente 1 (DMT1). Tf se libera más tarde una vez que el hTfR1 nuevamente alcanza la superficie celular. Adaptado de [86]

Como ya se mencionó uno de los ligandos naturales del hTfR1 es el Tf. La estructura de Tf unida a hTfR1 se resolvió por medios cristalográficos a temperatura ambiente y pH 7,5 [87] (**Figura 11, A**). La Tf humana cargada con hierro unida a su receptor revela la reestructuración de la interfaz del dímero hTfR1. En esta estructura, dos moléculas Tf se unen al homodímero hTfR1, con los lóbulos N y C de Tf que demuestran interacciones significativas con el receptor [87]. En el hTfR1, la unión a Tf genera un *cluster* de histidina que está preparado para la reorganización conformacional tras la exposición a pH bajo [88]. Otro ligando natural del hTfR1, aparte del Tf, es la hemocromatosis humana (HFE). La estructura de HFE unido a hTfR1 revela una estequiometría de uno a uno de HFE a hTfR1 [87] (**Figura 11, B**). Cada molécula de HFE se une a hTfR1 en un plano, lo que significa que es probable que HFE se una solo al hTfR1 presente en la membrana de la misma célula. Un paquete de

tres hélices estabiliza predominantemente el complejo de HFE y hTfR1. Este paquete está formado por una hélice de HFE y dos del dominio helicoidal de hTfR1 [89]. Mientras que HFE permanece relativamente sin cambios por la interacción con hTfR1, el dominio helicoidal del receptor experimenta un ligero reordenamiento al unirse.

El hTfR1 es una proteína de membrana que se expresa en mayor o menor medida en todos los tejidos. Abunda particularmente en las células inmunes activadas y las células endoteliales vasculares, tipos de células críticamente involucradas en la patogénesis de los Mamarenavirus [90]. En la célula huésped, hTfR1 es un ejemplo clásico de un receptor de transporte y, como vimos anteriormente, juega un papel central en el metabolismo celular de hierro [91]. Estudios celulares y moleculares permitieron identificar al hTfR1 como el receptor celular para las FHS [14, 71, 92]. En contraste, otros tres virus del grupo B, los TCRV, Amapari (AMAV) y Cupixi (CPXV) no son patogénicos, en parte porque no se pueden unir a hTfR1, pero si usar ortólogos de hTfR1 para la entrada del virus a otras especies que actúan como sus reservorios naturales [93]. Además, recientemente se ha observado que también una cepa del Mamarenavirus Whitewater Arroyo (WWAV) de América del Norte, vinculada con tres casos fatales de Fiebre Hemorrágica, también requiere de hTfR1 para su internalización [2].

Se observó que la GP1 de los Mamarenavirus patogénicos media la entrada a la célula. Usando la subunidad GP1 del MACV como una sonda, lograron identificar por inmuno-precipitación a hTfR1 como el receptor celular humano [71]. Se observó también que la entrada de JUNV ocurre por vía dependiente de vesículas recubiertas por clatrina [94], la cual también es utilizada por hTfR1. Análisis de infectividad de pseudovirus en células que expresan hTfR1 modificado por mutagénesis dirigida confirman que el extremo del dominio apical de hTfR1 determina la capacidad del receptor para mediar la infección con los Mamarenavirus patógenos del Nuevo Mundo [93, 95]. También mostraron que la infección por los virus tiene una correlación directa con el aumento de la expresión celular de hTfR1, mientras que la reducción en expresión de hTfR1 redujo la infección [71]. Asimismo, estudios estructurales permitieron determinar que la GP1 de estos Mamarenavirus se une al dominio apical de hTfR1 (**Figura 11, C**) pese a que exhiben una sorprendente variedad estructural, compartiendo solo 25-47% de identidad de residuos [95]. Es interesante notar que ni holo-Tf ni apo-Tf interfirieron o aumentan la infección por virus de las células, lo que indica que los sitios de unión de Tf y de la GP1 al hTfR1 no se superponen [71], tampoco lo hace la HFE [87] (**Figura 11, D**).

Recientemente, se ha reportado el desarrollo de aptámeros que se unen al dominio apical de hTfR1 y pueden bloquear hasta 90% la internalización de MACV, pero solo un 70% de JUNV, sin haber sido probado contra otros Mamarenavirus [96].

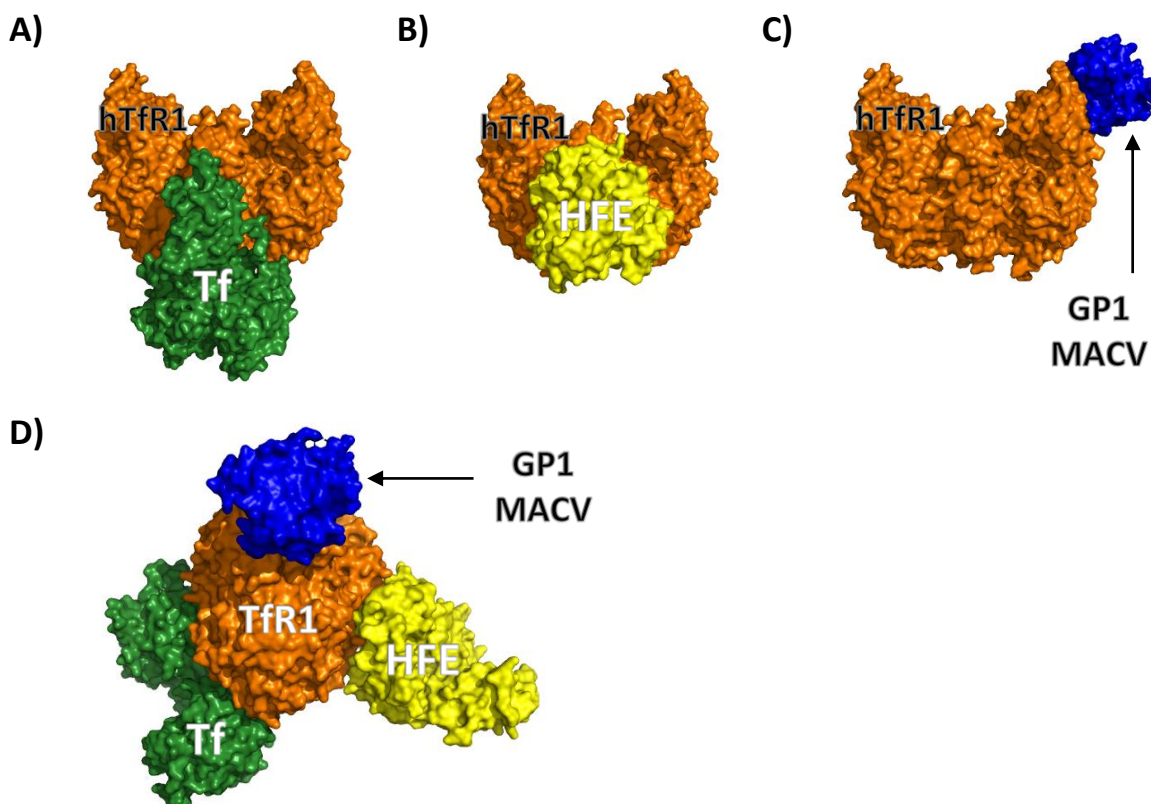


Figura 11. Ligandos naturales del hTfR1. Estructura del modelo de hTfR1 (naranja) con sus ligandos naturales: A) Tf (verde); B) HFE (amarillo); C) GP1 de MACV (azul). Los modelos se generaron a partir de los archivos Banco de Datos de Proteínas (PDB): 1DE4, 3S9L y 3KAS, respectivamente. D) Se muestra al hTfR1 unido a todos sus ligandos de forma simultánea.

Se han reportado algunas variantes naturales del hTfR1 en humanos: Y20H, G142S, L212V, G420S, R677H. De ellas, la única que se posiciona dentro de la región que reconocen las GP1 de los Mamarenavirus causantes de las FHS es la correspondiente al polimorfismo de nucleótido único (SNP) L212V. Dicha mutación solo se ha informado en poblaciones asiáticas (China y Japón). Se secuenciaron los hTFR1 de 18 individuos indígenas de Centro y Sudamérica y no se lograron identificar casos de este polimorfismo. Por lo tanto, al igual que todos los SNP, este surgió al azar y puede no tener una aptitud ventajosa o desventajosa en las poblaciones asiáticas donde se encuentra, ya que los Mamarenavirus que utilizan hTfR1 no se encuentran en esa parte del mundo [97]. No obstante, este SNP humano en esta región, L212V, haría que el hTfR1 sea un receptor más débil para el MACV, pero un receptor más fuerte para JUNV Y SABV. Colectivamente, estos hallazgos establecen el escenario para posibles compensaciones evolutivas, donde la selección natural de resistencia a un virus puede hacer que los humanos o roedores sean susceptibles a otras especies de Mamarenavirus [98].

Por otra parte, ha sido reportado que el hTfR1 juega un rol en la infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) a nivel de entrada mediada por glucoproteína y posiblemente esté involucrado en

la internalización de partículas de VHC [99]. También recientemente se ha reportado al hTfR1 como un receptor específico de reticulocitos para *Plasmodium vivax*, uno de los parásitos causantes de la más frecuente y extensamente distribuida forma de malaria benigna, y que la proteína PvRBP2b del parásito compite por el sitio de unión GP1 de MACV con el hTfR1 [100].

1.3. El anticuerpo monoclonal quimérico ch128.1 y las FHS

Previamente, el grupo del Dr. Helguera ha publicado un artículo donde demuestra que el AcM quimérico ch128.1 contra el dominio apical de hTfR1 es capaz de bloquear la internalización de pseudovirus que expresan GP1/GP2 de JUNV, MACV, CHAV, GTOV y SABV por más de 90% y reducir la infectividad de la cepa replicante atenuada IV445 de JUNV [92]; mientras que en el caso de la cepa de WWAV, la internalización de pseudovirus que expresan su GPC también puede ser bloqueada con ch128.1 [2].

Es importante tener en cuenta que ch128.1 no compite con el sitio de unión de Tf [101] y tanto ch128.1 como el anticuerpo original de ratón 128.1 no afectan a células que expresan niveles normales o bajos de hTfR1 [102, 103]. Sin embargo, se ha observado que estos anti-hTfR1 en la forma bivalente ch128.1 y en la tetravalente ch128.1-Av puede inducir *crosslinking* provocando una reducción de los niveles de receptor en la superficie en células que sobre-expresan hTfR1, induciendo citotoxicidad y afectando los niveles de hierro en las células [101, 103-105], pero no en otros tipos celulares que lo expresan a niveles menores [101-103].

Mediante estudios de unión de receptores de transferrina híbridos de hTfR1 con regiones de TfR1 de ratón (mTfR1) realizados por ingeniería genética (mutagénesis dirigida) y expresada en células CHO se pudo determinar una región fundamental para la unión del anticuerpo ch128.1 sobre la superficie del hTfR1 (**Figura 12**). Esta región está comprendida por 45 aminoácidos sobre la región apical del receptor, de la serina (S o Ser) en la posición 324 a la serina en la posición 368 (S324-S368) [92].

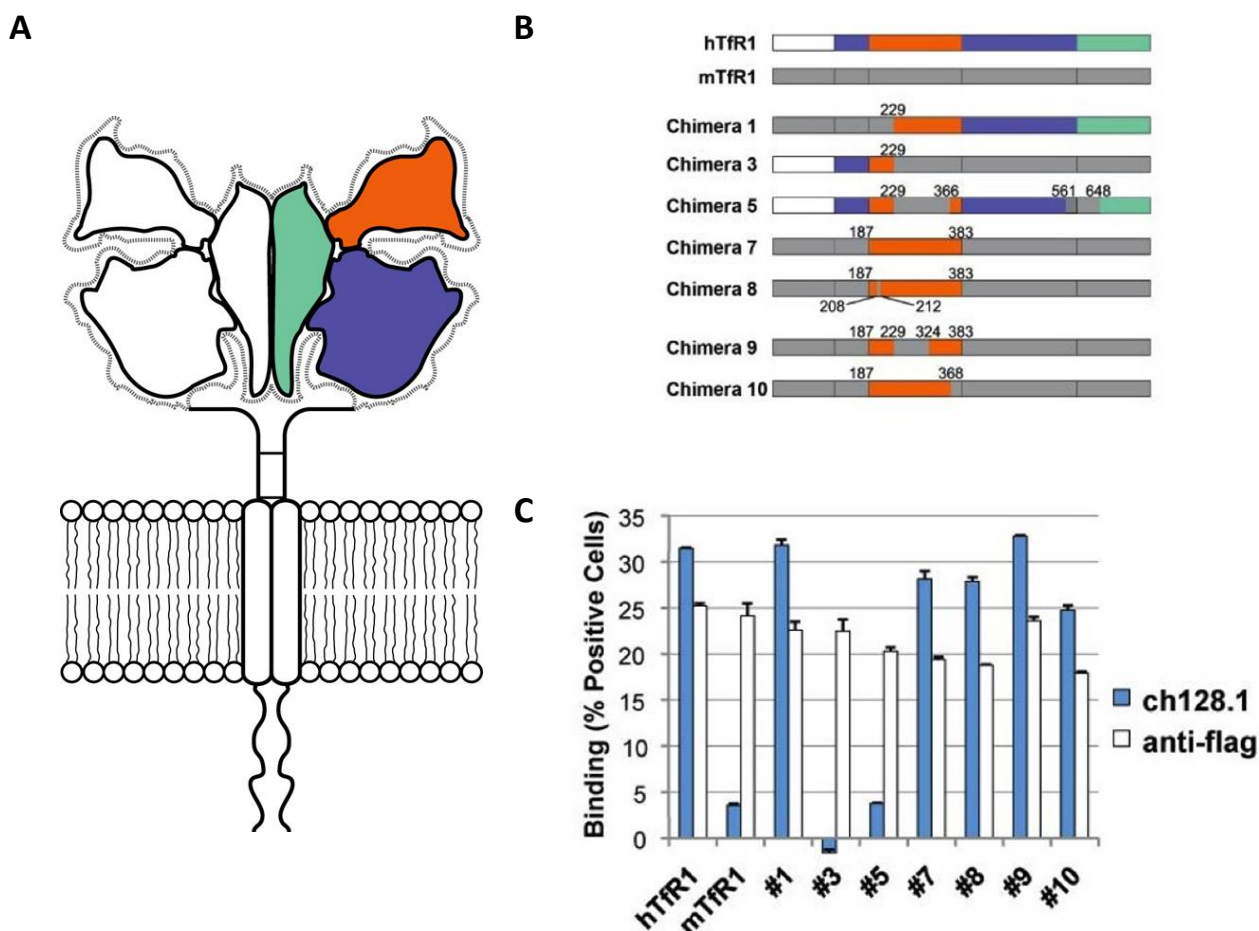


Figura 12. Estudio de la región de unión del anticuerpo ch128.1 al hTfR1 por mutagénesis dirigida. A) Se muestra un esquema del hTfR1 y se resaltan las regiones de hélice en verde, tipo proteasa en azul y región apical en naranja. B) Híbridos de hTfR1 con regiones de mTfR1 realizados por ingeniería genética y expresados en células CHO. C) Ensayo de unión de los híbridos con el anticuerpo ch128.1 por ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). [92]

1.4. La estructura básica de los Anticuerpos

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son proteínas únicas con varias propiedades que los hace un componente crítico del sistema inmunitario. Su propiedad más notable es que exhiben alta afinidad y especificidad para una amplia gama de diferentes moléculas conocidas como antígenos. Además, los anticuerpos tienen la capacidad de activar e interactuar con el sistema inmune efector del huésped.

La estructura básica de un anticuerpo consta de dos polipéptidos de cadena liviana idénticos y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos, unidos entre sí por enlaces disulfuro. Las cadenas pesada (H) y liviana (L) están codificadas por genes separados (**Figura 13, A**) y se organizan en dominios globulares discretos separados por segmentos peptídicos cortos (**Figura 13, A**). La molécula

de anticuerpo normalmente exhibe una forma de "Y", con dos "fragmentos de unión al antígeno" (Fab) que forman los brazos, vinculados a través de una bisagra al dominio "fragmento cristalizante" (Fc) que forma el tallo (**Figura 13, B**). Los dominios en los extremos amino-terminal de las cadenas tanto pesadas como livianas, contienen el sitio de unión al antígeno. Estos dominios se caracterizan por su variabilidad de secuencia (región variable o V), y se denominan las regiones V_H y V_L para indicar las cadenas pesadas y livianas, respectivamente (**Figura 13, B**) [106, 107].

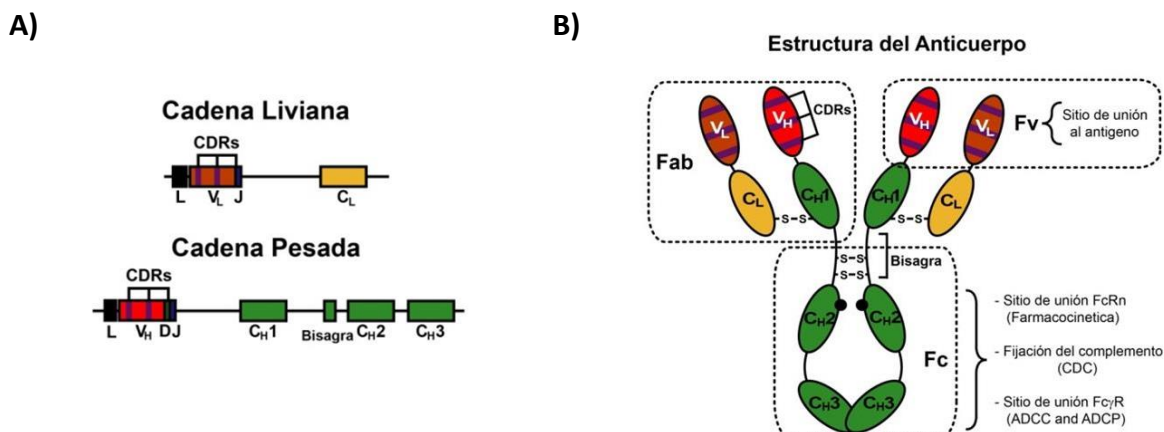


Figura 13. IgG. A) Genes que codifican las cadenas pesada y liviana. En los genes, cada dominio está codificado por un exón discreto (indicado por cajas) separado por secuencias intermedias (intrones) indicadas por la línea. Ambas cadenas pesadas y livianas contienen secuencias líder hidrófobas (L) necesarias para su secreción, un dominio variable que contiene tres secuencias determinantes de la complementariedad (CDR), que proporciona variabilidad en los sitios de reconocimiento entre los anticuerpos, y un segmento de unión (J). En las cadenas pesadas también hay un segmento de diversidad (D). **B)** Estructura general de la molécula de inmunoglobulina G (IgG) (el anticuerpo más abundante en la sangre) y los fragmentos con actividad que pueden derivar de la misma. La proteína del anticuerpo está formada por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas con dominios discretos: dos dominios constituyen la cadena liviana (V_L y C_L), mientras que cuatro dominios forman la cadena pesada (V_H , C_H1 , C_H2 y C_H3). Las regiones variables se designan como la región Fv e incluyen las regiones CDR que son los residuos de aminoácidos críticos para la afinidad y especificidad de los sitios de unión al anticuerpo. Las funciones efectoras del anticuerpo son propiedades del fragmento Fc. Las unidades de carbohidratos (círculos negros) presentes en N297 dentro de los dominios C_H2 contribuyen a las propiedades funcionales del anticuerpo. La región bisagra proporciona flexibilidad a la molécula de anticuerpo, facilitando la unión al antígeno, y las funciones efectoras. La enzima papaína escinde el anticuerpo en dos fragmentos Fab que contienen los sitios de unión al antígeno y un fragmento Fc responsable de las funciones efectoras;). Adaptado de Ref. [108].

1.4.1. Variabilidad de los anticuerpos

La especificidad de un anticuerpo depende de la secuencia de la región variable. El número total de diferentes regiones variables disponibles en los seres humanos se estima que es al menos 10^{11} . Sin embargo, el número real de especificidades de anticuerpos en un individuo (conocido como el repertorio de anticuerpos) es limitado al número total de células B y de la historia de la exposición a antígenos del individuo. La extraordinaria variabilidad de la respuesta de anticuerpos es el

resultado de procesos que incluyen la recombinación V (D) J y la hipermutación somática (SHM). La recombinación V (D) J es el proceso por el cual los segmentos génicos V, D y J se reordenan aleatoriamente, lo que lleva al desarrollo de una gran diversidad de regiones variables [109]. Dentro de las regiones variables de la cadena pesada y liviana existen tres regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDRs) que codifican el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. En los seres humanos y roedores, los CDR1 y CDR2 de ambas cadenas pesadas y livianas se forman a partir de las secuencias de segmentos de genes de la línea germinal variable (V). En contraste, el bucle de CDR3 se produce por la unión del segmento V con la unión (J) para el segmento de la cadena liviana, o con la diversidad (D) y unión (J) para los segmentos de la cadena pesada. Por tanto, la diversidad de la cadena pesada y liviana se amplifica aún más por el proceso de SHM que se produce dentro de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas. Estas mutaciones se producen principalmente por sustituciones de nucleótidos individuales, con adiciones de nucleótidos ocasionales y deleciones. Durante el curso de la respuesta inmune, la afinidad de unión de los anticuerpos a los antígenos aumenta, un proceso que se conoce como maduración de la afinidad y es el resultado de la selección dentro del centro germinal de las células B que producen anticuerpos de afinidad cada vez mayor [110]. La tasa de SHM en ratones y seres humanos es de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-3} mutaciones por par de bases por generación, que es aproximadamente un millón de veces mayor que la tasa de mutación espontánea en la mayoría de los otros genes [111]. El resto de las cadenas pesadas y livianas tienen una estructura relativamente constante. La región constante de la cadena liviana, denominada región C_L , consta de un solo dominio. En contraste, la región constante de la cadena pesada (C_H) se divide en dominios estructurales discretos estabilizados por enlaces disulfuro intracadena: C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} de IgG (ver **Figura 13**). La estructura de dominios de anticuerpos resulta muy atractiva para la ingeniería genética, ya que permite el intercambio de dominios funcionales con actividades de unión al antígeno (Fabs o Fvs) o funciones efectoras (Fc). La región bisagra, un segmento de la cadena pesada entre los dominios C_{H1} y C_{H2} en las IgGs proporciona flexibilidad a la molécula. La región Fc es responsable de las propiedades farmacocinéticas del anticuerpo y de las funciones efectoras tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), y la transmisión en la placenta. Los anticuerpos son glicoproteínas y los hidratos de carbono presentes en el dominio C_{H2} de IgG han demostrado ser esenciales para sus funciones efectoras [112].

1.4.2. Clases y subclases de anticuerpos

La región constante de la cadena pesada determina la clase o isotipo del anticuerpo. En los seres humanos, hay cinco clases de cadenas pesadas diferentes que son designados por minúsculas letras griegas: γ para IgG; δ para IgD; ϵ para IgE; α para IgA, y μ para IgM (**Figura 14**). Las diferencias en el isotipo de la cadena pesada determinan la glicosilación y la capacidad de participar en diversas funciones efectoras tales como CDC, ADCC, y ADCCP, así como la transmisión placentaria [113]. Los anticuerpos IgG humanos se pueden subdividir en cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG4 (los tres con un peso molecular de aproximadamente 146 kDa), e IgG3 con un peso molecular de aproximadamente 165 kDa. El peso molecular más alto exhibido por IgG3 humana se debe a la presencia de una región bisagra extendida, que proporciona una mayor flexibilidad en comparación con las otras subclases. Las propiedades de las subclases de IgG humanos se enumeran en la **TABLA 3**. En los seres humanos, sólo hay una subclase de IgD, IgE, e IgM, pero hay dos subclases de IgA humana: IgA1 e IgA2. En contraste con las otras clases, las cadenas pesadas de las IgM e IgE contienen un dominio C_H extra (C_{H4}) y carecen de la región de bisagra que se encuentra en IgG, IgD, e IgA. La ausencia de una región bisagra no implica que los Fab de IgE e IgM sean rígidos. Las micrografías electrónicas de moléculas de IgM unidos a ligandos han demostrado que los brazos Fab pueden doblarse en relación con el dominio Fc [114]. Para el caso de IgE, el par de dominio C_H2 sustituye a la región bisagra de IgG y permite una conformación doblada de la región Fc [115].

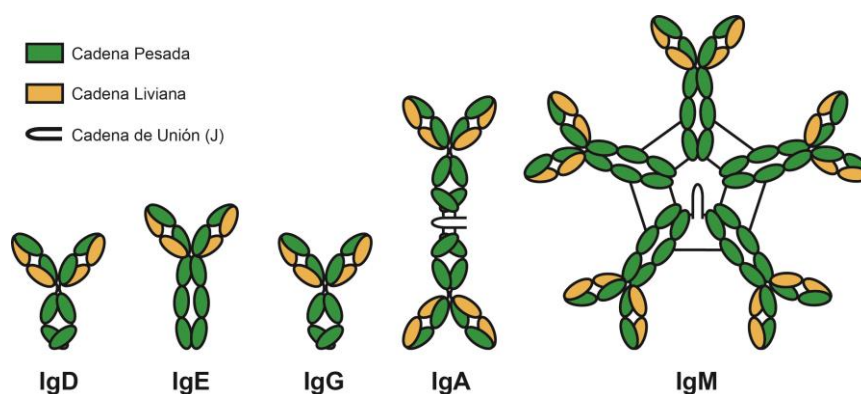


Figura 14. Estructura comparativa de las clases de anticuerpos humanos. IgD (184 kDa), IgE (189 kDa), IgG (146 kDa para IgG1, 2, y 4, y 165 kDa para IgG3), IgA (dímero 300-360 kDa) e IgM (pentámero 970 kDa). Los anticuerpos pueden ser monoméricos (IgG, IgE e IgD) o poliméricos (IgA: dímero e IgM: pentámero), donde los anticuerpos poliméricos contienen una cadena de unión (J). Adaptado de Ref. [10]. IgM también puede ser un hexámero que carece de la cadena J. [108]

Hay dos isotipos de cadena liviana diferentes, que son designados por las letras griegas minúsculas κ y λ . Las cadenas livianas de ambos isotipos se encuentran asociados con todas las clases de cadena pesada. Las diferencias en el isotipo de la cadena liviana no parecen influir significativamente en la estructura ni en las funciones efectoras de la molécula de anticuerpo.

Aunque todas las moléculas de anticuerpos se construyen a partir de la unidad básica de dos cadenas pesadas y dos livianas (H_2L_2), las IgA e IgM forman polímeros (**Figura 14**). Las regiones

Característica o función	Subclase o isotipo			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Peso molecular aproximado (kDa)	146	146	165	146
Longitud de la bisagra (número de aa)	15	12	62	12
ADCC	+++	+/-	++	+/-
ADCP	+	+	+	+/-
Unión de C1q	++	+/-	+++	-
Lisis celular mediada por complemento	++	+/-	++	-
Unión del FcRn	+	+	+/-	+
Vida media en suero (en días)	21	21	5 – 7.5	21
Concentración sérica promedio aproximada (mg / ml)	9	3	1	0.5

TABLA 3. Propiedades funcionales de las subclases de IgG humanos. Adaptado de [108]

constantes de IgM e IgA de la cadena pesada contienen una región de 18 aminoácidos con un residuo de cisteína que es esencial para la polimerización. La cadena de unión J es un polipéptido de 15 kDa producida por los linfocitos B y células plasmáticas (células secretoras de anticuerpos) que promueve la polimerización mediante la vinculación a la cisteína de dicha región. IgA forma una estructura dimérica en la que dos unidades de H_2L_2 están unidas por una cadena J [$(H_2L_2)_2J$]. Las IgM forman una estructura pentamérica con cinco unidades H_2L_2 unidas por una cadena J [$(H_2L_2)_5J$] o una estructura hexamérica [$(H_2L_2)_6$], que no posee la cadena J. La IgA secretora encontrada en las superficies de la mucosa contiene un polipéptido adicional, el componente secretor (SC), un fragmento de la escisión del receptor de inmunoglobulina polimérica utilizada para transportar a la superficie de la mucosa.

1.4.3. Actividades efectoras de los anticuerpos

Los anticuerpos presentan diferentes actividades biológicas que los hacen agentes terapéuticos eficaces [116] (**Figura 15**). Debido a su exquisita especificidad, los anticuerpos pueden evitar que mediadores solubles tales como citoquinas, toxinas, o factores de crecimiento alcancen a sus receptores, bloqueando su interacción, ya sea mediante la unión al factor en sí mismo o a su receptor. Los anticuerpos también pueden reticular los receptores de superficie celular, activando de este modo o inhibiendo las respuestas. La región Fc de la IgG se une al receptor de Fc neonatal (FcRn), también conocido como el "receptor de rescate" o receptor Brambell [117]. Este receptor se expresa por las células endoteliales y tiene un papel importante en la extensión de la vida media de los anticuerpos mediante la unión y la internalización de IgG y su reciclado de nuevo en la sangre,

protegiendo así el catabolismo de las IgG [118]. Además, dependiendo de la clase de anticuerpo, el dominio Fc puede provocar actividades inmunes tales como ADCC aunque la interacción entre la región Fc de IgG y el receptor de Fc gamma (FcγR) se expresa en la superficie de las células del sistema inmune incluyendo las células asesinas naturales (NK), los macrófagos y neutrófilos [119]. Los FcγRs también pueden conducir a la fagocitosis de células blanco recubiertas de anticuerpos por las células fagocíticas tales como macrófagos y células dendríticas, un fenómeno descrito como ADCP [120, 121]. Las células NK y otras células efectoras, una vez activadas, liberan factores que pueden matar directamente a las células blanco, así como citocinas y quimiocinas que pueden inhibir la proliferación celular, mejorar la inmunogenicidad de las células blanco y atraer otras células inmunes efectoras. Además de ADCC y ADCP, el dominio Fc de ciertos anticuerpos, puede activar la cascada del complemento que conduce a la inflamación y al CDC [121]. Aunque muchos anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden inducir respuestas mediadas por el complemento y matar células tumorales in vitro [122], su relevancia en el ámbito clínico para el tratamiento del cáncer aún no se ha establecido completamente.

Debido a sus propiedades, los anticuerpos, en particular, las IgG recombinantes son actualmente una de las clases de mayor crecimiento de fármacos. En la sangre, la IgG es la clase de anticuerpo más abundante y el más estable, con una vida media de aproximadamente 21 días para todas las subclases excepto las IgG3, cuya vida media es de aproximadamente 7 días (**TABLA 3**). Como se muestra en la **TABLA 3**, IgG1 expone actividades de ADCC y CDC significativamente superior en comparación con IgG2 e IgG4 [116, 123]. Por lo tanto, ya que la clase de anticuerpo determina la naturaleza de las funciones inmunes efectoras, la IgG1 ha sido la clase de elección para la mayoría de los anticuerpos terapéuticos [124].

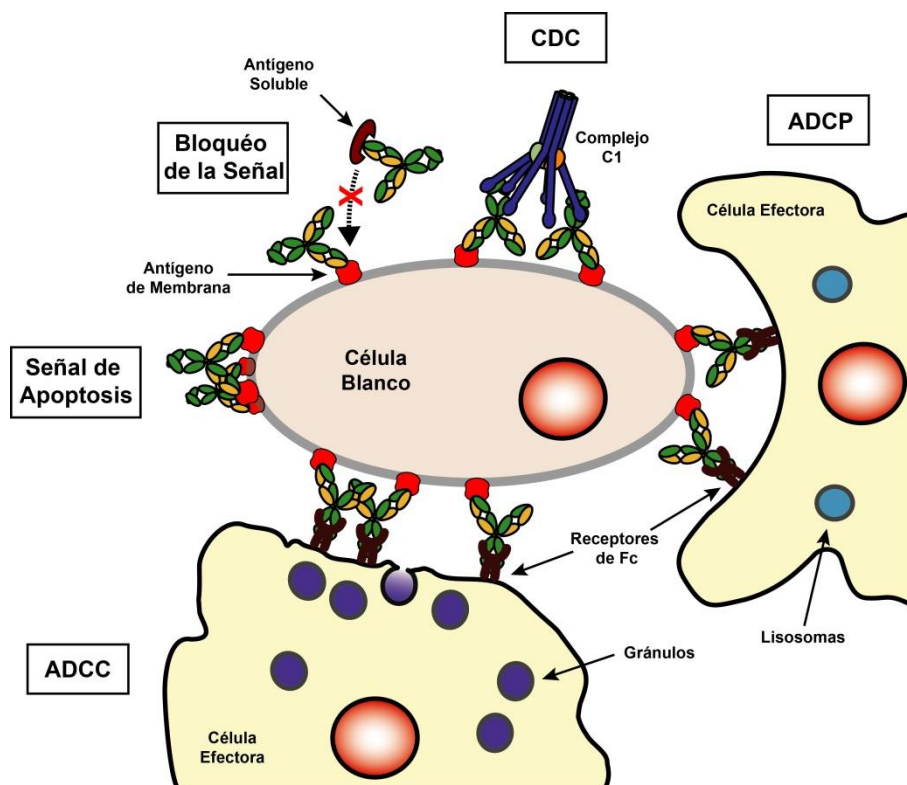


Figura 15. Modos potenciales de acción de los anticuerpos. Los anticuerpos pueden provocar su actividad protectora bloqueando la interacción de factores solubles (ligandos) con receptores de superficie ya sea dirigiéndose al factor soluble libre o al receptor sobre las células diana, que puede ser una célula cancerosa. Los anticuerpos dirigidos a la superficie de las células pueden alterar la señalización e inducir una actividad antiproliferativa y/o proapoptótica que puede ser favorecida por reticulación. Además, anticuerpos tales como IgG1 pueden activar funciones efectoras inmunitarias tales como ADCC, ADCP y CDC. Adaptado de [108]

1.4.4. Los anticuerpos estructuralmente modificados

El creciente número de dianas terapéuticas y los requisitos especiales para las diferentes intervenciones terapéuticas ha favorecido la aparición de una amplia gama de configuraciones de anticuerpos, con propiedades más allá de los anticuerpos naturales, hechos a medida para aplicaciones específicas. La estructura de dominios de anticuerpos permite la generación de formatos alternativos, donde se han eliminado o reorganizado para alterar las propiedades biológicas de los diferentes dominios constantes.

1.4.4.1. Fragmentos de anticuerpos: Fabs y scFv monovalentes, bivalentes, y multivalentes

Un bloque de unión primario del anticuerpo es el fragmento Fab, que consiste en una cadena liviana unida covalentemente mediante un enlace disulfuro a un segmento de la cadena pesada que incluye los dominios V_H y C_H1 (**Figura 16**) [125]. Como se explicó anteriormente, los fragmentos scFv

constan de los dominios V_L y V_H fusionado genéticamente por un péptido enlazador flexible. El peso molecular de los scFv es mucho menor que la de anticuerpos intactos (**Figura 16**) (25-27 kDa en comparación con aproximadamente 146 kDa para IgG1 intacto, y aún así pueden retener la especificidad y la afinidad del Fab de un anticuerpo de longitud completa. Sin embargo, los fragmentos que carecen de la región Fc o que contienen regiones Fc truncados no tienen funciones efectoras inmunes y son incapaces de unirse al receptor de rescate FcRn con la consiguiente reducción en la vida media (horas en comparación con 21 días para IgG1) [126]. Los scFv radiomarcados son herramientas importantes para la detección y el tratamiento de la metástasis del cáncer en modelos preclínicos y pacientes [125]. Los scFv sin marcar también pueden tener eficacia terapéutica. Un scFv sin marcar que se está evaluando actualmente en la clínica es DLX105, un scFv humanizado específico para el TNF- α , una importante citocina proinflamatoria importante para inducir y perpetuar la hiperalgesia periférica y la degeneración del cartílago en pacientes con artrosis. DLX105, expresada en bacterias, se ha utilizado en dos ensayos clínicos para el tratamiento de la osteoartritis muy dolorosa de la rodilla (NCT00819572) y de leve a moderada *psoriasis vulgaris* (NCT01595997). Ambos ensayos mostraron que DLX105 reunió criterios de valoración inicial de seguridad y eficacia.

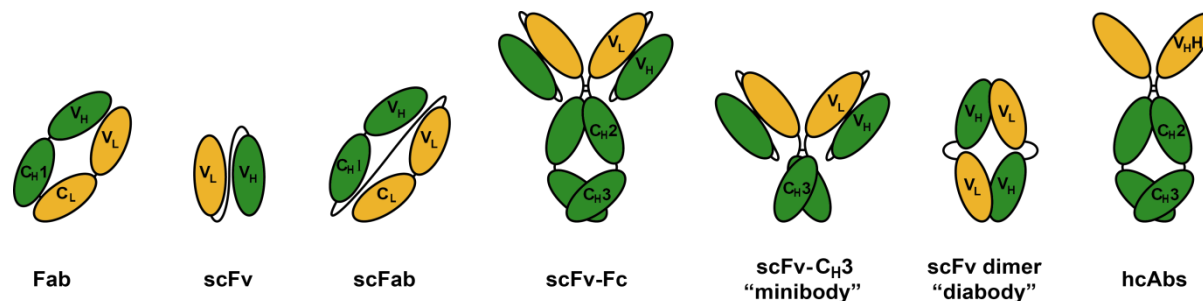


Figura 16. Representación esquemática de varios fragmentos de anticuerpos manipulados genéticamente. Se muestran el tamaño relativo y las relaciones de dominio entre Fab, Fv de cadena sencilla (scFv), Fab de cadena sencilla, scFv-Fc, scFv-C_{H3} o minibody, dímero de di-scFv o diabody y fragmentos de hcAbs.

Una limitación de los scFv en comparación con los anticuerpos de larga duración se vincula con su monovalencia contra el antígeno. Debido a la presencia de dos sitios de unión al antígeno, los anticuerpos intactos exhiben una mayor avidéz en comparación con scFv. Para abordar esta cuestión, se han producido dímeros de scFv denominados "diacuerpos" (o diabody) mediante la incorporación de un residuo de cisteína carboxi-terminal para formar un puente disulfuro, obteniéndose fragmentos (scFv)₂ (**Figura 16**) [127]. Otra configuración con pequeño tamaño son los anticuerpos de cadena pesada (HcAb) derivados de camélidos, que carecen de la cadena liviana y el dominio C_{H1}, son bivalentes, y se unen a su objetivo a través de dominios VHH [128] (**Figura 16**). La avidéz de los

fragmentos de anticuerpos puede incrementarse aún más en el enfoque de “diabody” por la disminución de la longitud del péptido enlazador entre dominios, que puede resultar en la formación de “tria-bodies” y “tetra-bodies” [129]. Alternativamente, los dímeros de scFv se han construido utilizando un péptido enlazador muy corto para conectar las regiones variables del anticuerpo, lo que resulta en la formación de dímeros, en la que el V_L de uno asocia con la V_H de un segundo, mientras que el V_L del segundo se asocia con el V_H de la primera [130] (**Figura 16**). Estos dímeros no covalentes tienen un peso molecular similar a la de los fragmentos Fab de anticuerpos (55-60 kDa), pero contienen dos sitios de unión al antígeno y son capaces de unirse al antígeno de forma bivalente, lo cual presenta una mejora significativa *in vivo* en comparación con scFv estándar. Otra configuración bivalente de fragmentos scFv incluye su fusión a un dominio C_H3 de inmunoglobulina, resultando en un “minibody” [131] (**Figura 16**).

Sin embargo, por la bivalencia de los dos dominios Fab unidos a través del dominio Fc, los anticuerpos completos pueden causar efectos indeseados. El efecto de *crosslinking* que se obtiene mediante la unión cruzada de dos antígenos formando inmunocomplejos, está asociado a respuestas inflamatorias que en algunos casos pueden ser perjudiciales. Esta reactividad cruzada puede afectar la actividad funcional de receptores de superficie, y alterar el metabolismo celular induciendo citotoxicidad [132]. Una solución son los mencionados fragmentos Fab que consisten en fragmentos de anticuerpos monoclonales aprobados para uso clínico [133]. En este contexto han sido aprobadas varias moléculas Fab para el tratamiento de enfermedades. En 1994 fue aprobado Abciximab (ReoPro, Centocor/Johnson & Johnson), un fragmento Fab de un anticuerpo quimérico contra la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa, como un complemento para prevenir la trombosis durante el cateterismo coronario para infarto de miocardio con elevación del ST [134]. Ranibizumab (Lucentis, Genentech) es un Fab humanizado dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular A, aprobado en 2006 como tratamiento para la degeneración macular neovascular (húmeda) relacionada con la edad [135]. Cimzia (Certolizumab pegol, UCB) es un Fab anti-TNF α PEGuilado aprobado en 2008 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn [133]. Praxbind (Idarucizumab, Boehringer Ingelheim International GmbH) es un Fab humano dirigido contra *dabigatran etexilato* para el tratamiento de las hemorragias aprobado en 2015 [136]. También se han reportado los Fab humanos HO538-213 y 13B8.2 dirigidos contra la proteína de membrana CD4, que bloquean la unión de gp120 de la cápside de HIV e inhiben su entrada a las células humanas [137, 138]. En ambos casos, los Fab mostraron significativa actividad inhibitoria contra la infección por este virus. En este momento se encuentra en evaluación clínica fase III y pendiente de aprobación por la FDA Ibalizumab, un Fab humanizado anti-CD4 con isotipo IgG4 para el tratamiento de pacientes de HIV resistentes a múltiples drogas [139]. Tanto la forma IgG como la Fab de Ibalizumab bloquean de

forma efectiva la entrada de distintas cepas de virus de HIV-1, lo que descarta que el *crosslinking* de CD4 sea requerido para su actividad antiviral [140].

1.5. Estudios estructurales de proteínas por Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X es el método más poderoso en la actualidad para obtener una estructura macromolecular (**Figura 17**). La mejora de las tecnologías computacionales en los últimos años y el desarrollo de nuevos y poderosos programas para realizar cálculos junto con el enorme incremento en el número de estructuras de proteínas depositadas en el *Protein Data Bank* (www.rcsb.org)[141], hacen que la resolución de nuevas estructuras sea más fácil que en el pasado. Siempre que sea aplicable, este método permite la resolución de estructuras macromoleculares a partir de un único conjunto de datos de difracción de rayos X y un modelo de búsqueda descargado del Banco de Datos de Proteínas (PDB). La metodología tiene varios pasos: la formación de cristales de la proteína, la difracción de rayos X, la resolución de las fases, resolución de la estructura y refinamiento.

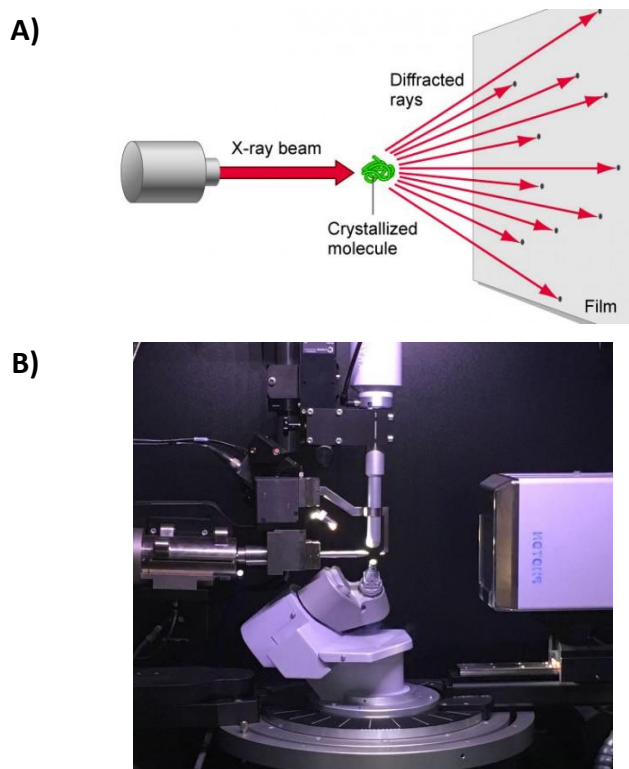


Figura 17 Cristalografía de rayos X. A) Esquema del fenómeno de difracción de rayos X. B) Foto real de un difractómetro de rayos X. Los rayos X son generados y son dirigidos de forma laminar a un cristal de proteína. Estos impactan sobre los electrones de los átomos dentro del cristal y son difractados con un cierto ángulo e

intensidad. Los haces de rayos X difractados son colectados con un detector para su posterior análisis por métodos matemáticos e informáticos para lograr generar la estructura atómica tridimensional de la proteína.

1.5.1. Cristales de proteínas

El primer y más difícil requisito para la determinación de la estructura de proteínas mediante cristalografía de rayos X es obtener cristales de proteínas que difracten a alta resolución. La cristalización de proteínas es principalmente un procedimiento de "prueba y error" en que la proteína precipita lentamente de su solución. Como regla general, mientras más pura sea la proteína, mayor las posibilidades de crecer cristales. El crecimiento de cristal de una proteína comienza a partir de una solución súper saturada de la macromolécula, y evoluciona hacia un estado termodinámicamente estable en el que la proteína se divide entre una fase sólida y la solución. El tiempo requerido antes de que se alcance el equilibrio tiene una gran influencia en el resultado final, que puede ir desde un precipitado amorfo o microcristalino hasta un gran cristal sólido. Las condiciones de sobresaturación pueden obtenerse mediante la adición de agentes precipitantes (sales, disolventes y polímeros de polietilenglicol) y/o modificando algunos de los parámetros internos de la solución, como el pH, la temperatura y la concentración de proteínas. Como las proteínas son moléculas lábiles, deben evitarse extremas condiciones de precipitación, pH y temperatura. Por lo tanto la cristalización de proteínas implica tres pasos principales:

1. Determinación del grado de pureza de la proteína. Si la proteína no es al menos 90-95% pura tendrá que llevarse a cabo más pasos de purificación para lograr la cristalización.
2. Las proteínas deben disolverse en un solvente adecuado del cual se debe precipitar en forma cristalina al aumentar lentamente la concentración del agente precipitante (PEG, sales o disolventes orgánicos).
3. La solución se lleva a la sobresaturación. En este paso, se forman pequeños agregados, que son los núcleos para el crecimiento de cristales. Una vez que se han formado los núcleos, comienza el crecimiento real del cristal.

La cristalización puede llevarse a cabo utilizando diferentes técnicas, las más utilizadas son: métodos de difusión líquido-líquido, cristalización bajo diálisis y técnica de difusión de vapor, siendo este último el más utilizado. La técnica de difusión de vapor se puede realizar de dos maneras: el método llamado de "gota colgante" o "gota sentada". En el método de "gota colgante", las gotas se preparan en un cubreobjetos de vidrio de microscopio siliconado mezclando 1-5 μ l de solución de proteína con el mismo volumen de solución precipitante. El cubreobjetos se coloca boca abajo sobre cada pocillo de la placa, el cual está parcialmente lleno con la solución precipitante. La cámara se sella aplicando grasa en la circunferencia de la depresión antes de colocar el cubreobjetos (**Figura 18**,

A). Este mismo procedimiento puede ser realizado por robots automatizados que son capaces de utilizar volúmenes de proteínas muy pequeños, en orden de los nL. El método de "gota sentada" es preferible en casos en que la solución de proteína tiene una tensión superficial baja y la velocidad de equilibrio entre la solución de gota y la solución de depósito debe reducirse (**Figura 18, B**). Los parámetros que se pueden variar incluyen: naturaleza y concentración del agente precipitante, *buffers* para explorar todo el rango de pH, sales y detergentes adicionales, etc.

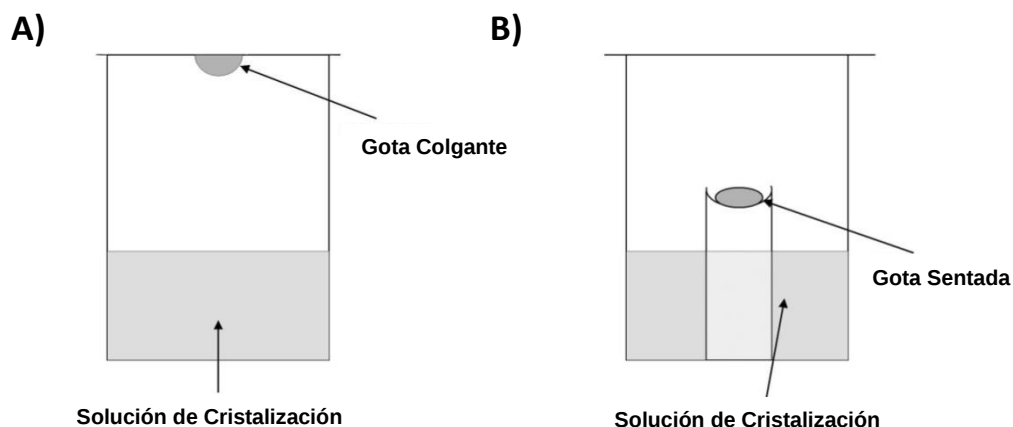


Figura 18. Técnicas de difusión de vapor para la generación de cristales. La técnica de generación de cristales por difusión de vapor se puede realizar de dos maneras: mediante gota colgante (A) o por gota sentada (B). En ambos casos los reservorios contienen la solución de cristalización y las gotas se conforman con la proteína a cristalizar y la misma solución de cristalización contenida en el reservorio.

Un cristal es una disposición periódica de moléculas en el espacio tridimensional. Moléculas que precipitan de una solución tienden a alcanzar el estado de energía libre más bajo. Esto a menudo se logra empacando de forma regular. Este empaque regular está formado por la repetición en las tres dimensiones espaciales de la celda unitaria, definida por tres vectores: a , b , c , y tres ángulos: α , β , γ entre ellos. Las celdas unitarias contienen una cantidad de unidades asimétricas que puede coincidir con nuestra macromolécula o con más copias de la misma, relacionadas por una determinada operación de simetría tales como rotaciones con o sin traslaciones. Hay 230 formas diferentes de combinar las operaciones de simetría en un cristal, lo que lleva a 230 grupos espaciales. Sin embargo, en cristales de proteína están permitidos solo 65 grupos espaciales, porque la aplicación de planos de espejo y puntos de inversión cambiaría la configuración de los aminoácidos de L a D, y los D-aminoácidos nunca se encuentran en la proteína natural. Los cristales de macromoléculas están empaquetados de forma suelta y contienen grandes orificios y canales llenos de disolvente, que normalmente ocupan 40-60% del volumen de cristal. Por esta razón, los cristales de proteína son muy frágiles y deben ser manipulados con cuidado. Para mantener inalterado su

contenido de agua, los cristales de proteína siempre deben mantenerse en su solución de cristalización madre o en el vapor saturado de dicha solución [142, 143]. Durante la recolección de datos, los rayos X pueden causar daños a los cristales debido a la formación de radicales libres. La mejor forma de evitar daños es la crio-protección. En la crio-cristalografía, los cristales de proteínas se empapan en una solución crio-protectora donde, al congelarse, se forma agua vitrificada, en lugar de hielo cristalino. En estas condiciones, los cristales expuestos a rayos X sufren un daño insignificante. La crio-cristalografía permite generalmente un completo conjunto de datos que se recogerá de un solo cristal y da como resultado datos con una difracción de mayor calidad y resolución, al tiempo que proporciona información estructural más precisa. Normalmente todas las medidas, tanto en difractómetros como utilizando un sincrotrón, se realizan a 100°K.

1.5.2. Difracción de rayos X

La dispersión o difracción de rayos X es un fenómeno que involucra tanto la interferencia como la dispersión coherente. Dos descripciones matemáticas del efecto de interferencia fueron presentadas por Max von Laue y W. L. Bragg [144, 145]. De acuerdo con la Ley de Bragg, la difracción de rayos X se puede ver como un proceso similar a la reflexión por planos de átomos en el cristal. Rayos X incidentes están dispersos por planos del cristal, identificados por los índices de Miller hkl , con un ángulo de reflexión θ .

Las intersecciones de los planos con los bordes de la celda deben ser fracciones del borde de la celda. Por lo tanto, las intercepciones de celda pueden estar en $1/0$ ($= \infty$), $1/1$, $1/2$, $1/3$... $1/n$. La forma convencional de identificar estos conjuntos de planos consiste en el uso de tres enteros que son los denominadores de las intersecciones a lo largo de los 3 ejes de la celda unitaria, hkl , llamados índices de Miller. Si un conjunto de planos tuviera intersecciones en $1/2$, $1/3$, $1/1$, entonces los planos se conocerían como el conjunto de planos (2, 3, 1).

La interferencia constructiva solo ocurre cuando la diferencia de longitud de trayectoria entre los rayos difractantes de los planos paralelos del cristal son un número integral de longitudes de onda. Cuando los planos cristalinos están separados por una distancia d , la diferencia de longitud de la ruta es $2d \cdot \sin\theta$. Por lo tanto, para que ocurra la interferencia constructiva, debe existir la siguiente relación: $n\lambda = 2d \cdot \sin\theta$. Como consecuencia de la ley de Bragg, para "ver" los átomos individuales en una estructura, la longitud de onda de la radiación debe ser similar a las distancias interatómicas, típicamente 0,15 nm (1,5 Å).

1.5.3. Fuentes de rayos X

Un tipo de radiación que se encuentra dentro del $\text{\AA}$ son los rayos X que se producen en el laboratorio al acelerar un haz de electrones emitidos por un cátodo en un ánodo, cuyo metal determina cuál será la longitud de onda de la radiación resultante. La monocromatización se lleva a cabo utilizando una delgada lámina de metal que absorbe gran parte de la radiación no deseada. Para obtener una fuente más brillante, el ánodo se puede hacer girar (ánodo giratorio) y se enfría con agua para evitar que se derrita. Una fuente alternativa de rayos X se obtiene al doblar un haz de electrones mediante un imán. Este es el principio detrás del sincrotrón en donde fuentes de radiación son capaces de producir rayos X miles de veces más intensas que un generador de ánodo giratorio. Una consecuencia de esta fuente de radiación de alta intensidad es que los tiempos de la recopilación de datos se han reducido drásticamente. Otra ventaja es que el espectro de rayos X es continuo desde alrededor de 0.05-0.3 nm. Otra ventaja de la radiación de sincrotrón es su capacidad de ajuste, que permite al usuario seleccionar longitudes de onda de radiación superiores o inferiores a 1.5418 $\text{\AA}$ (radiación de cobre). Recolección de datos en longitudes de onda más alta que 1.5418 $\text{\AA}$ da como resultado una menor relación señal / ruido.

1.5.4. Detector de rayos X

En un experimento de difracción de rayos X se observa un patrón de difracción que podría considerarse como un proceso tridimensional, recíproco a la red cristalina real (**Figura 19**).

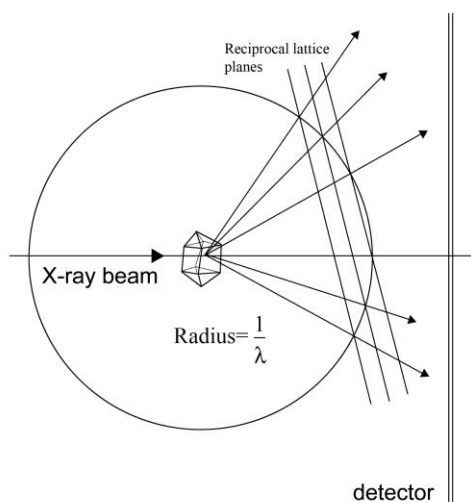


Figura 19. Esfera de Ewald. Representación diagramática de la generación de un patrón de difracción de rayos X.

Un cristal se puede considerar como una cuadrícula tridimensional y se puede imaginar que esto producirá un patrón de difracción de rayos X tridimensional. Al igual que con las rejillas del

microscopio electrónico, el patrón es recíproco con la red cristalina. Los planos que se cruzan con la esfera en la **Figura 19** son capas en una red tridimensional, llamada espacio recíproco, porque las distancias se relacionan recíprocamente con las dimensiones de la celda unitaria. Cada punto de la red recíproca corresponde a una reflexión difractada. La red recíproca es un concepto imaginario pero extremadamente conveniente para determinar la dirección de los haces difractados. Si el cristal gira, la red recíproca gira con él. En un experimento de difracción de rayos X, la dirección de los rayos difractados depende de dos factores: las distancias de las celdas unitarias en el cristal, de las cuales se derivan las distancias entre celdas unitarias en la red recíproca, y la longitud de onda de los rayos X. Como se indica en la **Figura 19**, las condiciones de difracción están determinadas no solo por la red recíproca sino también por el radio de la esfera de la reflexión o "Esfera de Ewald" (*Ewald sphere*), cuyo radio es $1/\lambda$.

Para la determinación de una estructura cristalina, se deben medir las intensidades de todas las reflexiones difractadas. Para hacerlo, todos los puntos correspondientes de la red recíproca se deben llevar a las condiciones de difracción haciendo girar la retícula (es decir, rotando el cristal) hasta que los puntos de red recíprocos requeridos estén en una esfera con radio $1/\lambda$. Se deduce que un detector de difracción consta de dos partes: 1. una parte mecánica para girar el cristal; 2. un dispositivo de detección para medir la posición y la intensidad de las reflexiones difractadas.

Para una determinación de la estructura de la proteína, el número de haces difractados que se registrarán es extremadamente alto, del orden de 10^4 - 10^6 y requiere equipos altamente eficientes. Los dispositivos más eficientes y más rápidos para la colección de los datos en cristalografía de proteínas son una placa de imagen y una cámara CCD (dispositivo acoplado cargado).

El detector de placa de imagen está formado por una placa fotosensible, hecha de BaFBr: Eu. Cuando es golpeada por una radiación, la placa produce una imagen latente que puede ser excitada por un láser, operando a 633 nm, que genera una radiación de 390 nm correspondiente a la transición de fluorescencia de *Europium*. Esta radiación luego se recoge en el fotomultiplicador y se convierte en una señal eléctrica. La cámara CCD es otro tipo de detector de área. La superficie del detector está constituida por elementos sensibles al voltaje (píxeles). Tienen un alto rango dinámico, combinado con una excelente resolución espacial, bajo nivel de ruido y alta tasa de conteo máximo. Estos instrumentos son mucho más sensibles y rápidos que una película de rayos X, lo que reduce considerablemente el tiempo de exposición y el procesamiento de los datos.

1.5.5. Medición y procesamiento de datos

El éxito de la integración de datos depende de la elección de los parámetros experimentales durante la recopilación de datos. Por lo tanto, es crucial que el experimento de difracción esté

correctamente diseñado y ejecutado. La clave de la estrategia de recopilación de los datos es recopilar cada reflexión única al menos una vez. Una lista de los problemas más importantes que tienen que ser considerados son:

- El cristal debe ser simple.
- Para tener una buena relación señal/ruido, se recomienda medir la difracción del cristal en el borde del detector.
- El tiempo de exposición debe elegirse cuidadosamente: debe ser lo suficientemente largo para permitir la recolección de datos de resolución pero no tanto como para causar reflejos de sobrecarga o saturación a baja resolución y que la radiación ocasione daños.
- El ángulo de rotación por imagen debe optimizarse: un ángulo demasiado grande dará lugar a una superposición espacial de manchas, un ángulo demasiado pequeño dará demasiados puntos parciales. Una imagen de oscilación (también llamada cuadro) se obtiene al rotar un cristal continuamente a través de $0.2-1.0^\circ$ alrededor de un eje fijo, perpendicular al haz de rayos X incidente.
- La alta multiplicidad de los datos mejorará la calidad general de los datos al reducir los errores aleatorios y facilitando la identificación de valores atípicos.

El análisis de datos realizado con los modernos programas de reducción de datos, normalmente se realiza en tres etapas:

1. Auto indexación de una imagen: El programa deduce el tipo de geometría, los parámetros de la celda unitaria del cristal y parámetros de orientación del cristal a partir de una sola imagen de difracción.
2. Indexación de todas las imágenes: El programa compara las mediciones de difracción con los puntos predichos en la base de los parámetros auto indexados, asigna los índices hkl y calcula las intensidades de difracción para cada punto en todas las imágenes recogidas.
3. Escalado: El programa escala los datos de todas las imágenes recopiladas y calcula las amplitudes de factor para cada reflexión (identificadas por los índices hkl).

1.5.6. Determinación de la estructura

El objetivo de la cristalografía de rayos X es obtener la distribución de la densidad electrónica que está relacionada con las posiciones atómicas en la celda unitaria, a partir de los datos de difracción. La función de densidad electrónica tiene la siguiente expresión:

$$\rho(x, y, z) = (1 / V) \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)}$$

donde F_{hkl} son los factores de estructura, V es el volumen de la celda y h, k, l son los índices de Miller. F es un número imaginario y se puede representar como un vector con un módulo y una fase. Es posible calcular fácilmente la amplitud de F directamente de las mediciones de dispersión de rayos X, pero la información sobre el valor de fase estaría perdida. Para resolver este problema conocido como el "problema de la fase" se pueden usar diferentes técnicas experimentales permitiendo la construcción de la estructura tridimensional de la proteína: Reemplazo Isomorfo Múltiple (MIR), Difracción Anómala Múltiple (DAM) y Reemplazo Molecular (MR). Este último puede ser realizado por cálculos computacionales utilizando solo el conjunto de datos nativos y es la técnica utilizada en este trabajo de tesis.

1.5.7. Reemplazo molecular

El método de Reemplazo Molecular consiste en ajustar una "estructura de referencia" en la celda unitaria experimental. La estructura de referencia es un modelo atómico, a partir del cual se pueden calcular las estimaciones de las fases. Dicho modelo puede ser la estructura de una proteína evolutiva relacionada con la desconocida, o incluso si está disponible, de la misma proteína de una forma de cristal diferente. Se sabe que el nivel de semejanza de las dos estructuras de proteínas se correlacionan con el nivel de identidad de secuencia [146]. Si el modelo inicial tiene al menos 40% de identidad de secuencia con la proteína cuya estructura se va a determinar, se esperan que las estructuras sean muy similares y el reemplazo molecular tendrá considerables posibilidades de tener éxito. Estas oportunidades disminuyen progresivamente con una disminución en la similitud en la estructura de las dos proteínas. Este método es aplicable a una gran fracción de nuevas estructuras desde que el sitio *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>) [147] es cada vez más grande y, por lo tanto, la probabilidad de encontrar un buen modelo es cada vez mayor. El reemplazo molecular implica la determinación de la orientación y la posición de la estructura conocida con respecto a los ejes cristalográficos de la estructura desconocida, por lo tanto el problema tiene que ser resuelto en seis dimensiones.

1.5.8. Refinamiento de la estructura

Una vez que la fase ha sido determinada el mapa de densidad electrónica puede calcularse e interpretarse en términos de la cadena polipeptídica. Si la mayor parte de la columna vertebral del modelo se puede ajustar con éxito en el mapa de densidad electrónica, se puede comenzar el refinamiento de la estructura. El refinamiento se realiza ajustando el modelo para encontrar un

modelo más cercano entre el calculado y el de los factores de estructura observados. El ajuste del modelo consiste en cambiar los tres parámetros posicionales (x , y , z) y los factores de temperatura isotrópicos B para todos los átomos en la estructura, excepto los átomos de hidrógeno. Las técnicas de refinamiento en la cristalografía de rayos X de proteínas se basan en la minimización de mínimos cuadrados. El más común y utilizado es el Refinamiento de mínimos cuadrados restringido estereoquímicamente, que aumenta el número de observaciones mediante la adición de restricciones estereoquímicas [148]. La función de minimizar consiste en un término cristalográfico y varios términos estereoquímicos. Estos se calculan como la diferencia entre los valores calculados a partir del modelo y los valores ideales correspondientes. Los valores ideales para los parámetros geométricos son aquellos medidos para pequeños moléculas y péptidos.

El parámetro utilizado para estimar la corrección de un modelo en el proceso de refinamiento es el factor R cristalográfico (R) que suele ser la suma de la diferencia absoluta entre lo observado y calculado sobre la suma de las amplitudes del factor de estructura observado. Usar el R como una guía en el proceso de refinamiento podría ser peligroso porque a menudo lleva a redefinir el modelo. Por esta razón, se recomienda utilizar también el llamado parámetro R_{free} , que es similar a R , excepto por el hecho de que se calcula a partir de una fracción de los datos recopilados que ha sido aleatoriamente elegido para ser excluido del refinamiento y el cálculo de mapas. De esta forma, el cálculo de R_{free} es independiente del proceso de refinamiento y por lo tanto no se introduce "sesgo de fase". Durante el proceso de refinamiento, ambos factores R deberían disminuir para macromoléculas hasta alcanzar un valor para macromoléculas en el rango de 0,2 a 0,6.

1.5.9. Validación del modelo

Existen varias herramientas que ayudan a evaluar la validez de un modelo estructural, de tal modo, el obtenido debe ser continuamente contrastado y validado mediante criterios estereoquímicos como las distancias interatómicas y los ángulos de enlace, en donde estos deben ser aceptables y consistentes. También, para el caso de las proteínas, debido al carácter geométrico del enlace peptídico, debe cumplirse que el ángulo de torsión en dicho enlace no se desvíe mucho del valor aceptable para la conformación estructural que adoptan esos aminoácidos, tal como se muestra en la denominada distribución de Ramachandran. En esta distribución se enfatiza el dominio de las restricciones estéricas para especificar la estructura de los polipéptidos y en donde los ángulos diedros (ϕ y ψ) definen las regiones permitidas del espacio conformacional. [149]

1.6. Modelado computacional del acoplamiento Proteína-Proteína

1.6.1. ClusPro

El servidor ClusPro (<https://ClusPro.org>) [150] es una herramienta ampliamente utilizada para el modelado del acoplamiento proteína-proteína. El servidor proporciona una página de inicio simple para uso básico, que requiere solo dos archivos en el formato PDB. Sin embargo, ClusPro también ofrece una serie de opciones avanzadas para modificar la búsqueda; estos incluyen la eliminación de regiones proteicas no estructuradas, la aplicación de atracción o repulsión, explicando las restricciones de distancia por pares, la construcción de homo-multímeros, la consideración de datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y la ubicación de sitios de unión a heparina. Se pueden usar seis funciones de energía diferentes, según el tipo de proteína. El acoplamiento con cada conjunto de parámetros de energía da como resultado diez modelos definidos por centros de agrupaciones muy pobladas por estructuras acopladas de baja energía. Este protocolo describe el uso de varias opciones, la construcción de archivos de restricciones auxiliares, la selección de los parámetros de energía y el análisis de los resultados. Aunque el servidor se usa mucho, las ejecuciones generalmente se completan en menos de 4 h.

Las interacciones proteína-proteína son importantes para comprender la función y la organización celular. La interpretación mecanística de las interacciones con frecuencia requiere detalles a nivel atómico, que idealmente se obtienen mediante cristalografía de rayos X. Sin embargo, algunas de las interacciones biológicamente importantes ocurren en complejos transitorios, y por lo tanto la determinación de la estructura experimental puede ser muy difícil, incluso cuando se conocen las estructuras de las proteínas componentes. Por lo tanto, se han desarrollado métodos de acoplamiento computacional que, a partir de las estructuras de las proteínas componentes, intentan determinar la estructura de sus complejos, con una precisión cercana a la proporcionada por la cristalografía de rayos X [151-153].

El acoplamiento generalmente genera una serie de modelos detallados que definen las posiciones de todos los átomos, pero las funciones de puntuación actuales generalmente no son lo suficientemente precisas para la discriminación confiable del modelo, y en la mayoría de los casos el modelo más cercano a la estructura nativa no puede identificarse únicamente por herramientas informáticas. Sin embargo, la selección del modelo puede basarse en información adicional obtenida mediante métodos de menor resolución, como la mutagénesis dirigida o la reticulación química, y los modelos generados seleccionados por el acoplamiento proporcionan detalles a nivel atómico.

Los métodos de acoplamiento se pueden clasificar como directos o basados en plantillas. Sobre la base de la termodinámica, los métodos directos intentan encontrar la estructura del complejo localizada en la mínima energía libre de Gibbs en el espacio conformacional, y por lo tanto requieren un modelo de evaluación de energía libre factible computacionalmente y un algoritmo de minimización efectivo [154]. Como se verá más adelante, los métodos de acoplamiento directo pueden dar buenos resultados si los cambios conformacionales sobre la asociación proteína-proteína son moderados. El acoplamiento basado en plantillas se basa en la observación de que los pares que interactúan y que comparten >30% de identidad de secuencia a menudo interactúan de la misma manera, y por lo tanto la estructura del complejo puede obtenerse mediante herramientas de modelado de homología si está disponible un complejo de plantilla apropiado de estructura conocida [155]. Aunque la aplicabilidad del acoplamiento basado en plantillas se ha extendido en base a la observación de que las estructuras parciales que representan la región de la interface puede proporcionar plantillas [156], la cobertura del espacio de la plantilla en la actualidad todavía es limitada, y por lo tanto los métodos directos son generalmente más útiles en muchas aplicaciones.

El servidor ClusPro, es un servidor basado en la web para el acoplamiento directo de dos proteínas que interactúan. ClusPro se introdujo en 2004 [150, 157], pero desde entonces se ha modificado y ampliado sustancialmente [158-160].

El servidor realiza tres pasos computacionales de la siguiente manera:

1. Acoplamiento de cuerpo rígido mediante el muestreo de miles de millones de conformaciones.
2. Agrupamiento basado en la “Desviación de la raíz media cuadrada” (RMSD) de las 1.000 estructuras de menor energía generadas, para encontrar los *clusters* más grandes que representarán los modelos más probables del complejo.
3. Refinamiento de las estructuras seleccionadas usando minimización de energía

El paso de acoplamiento de cuerpo rígido utiliza PIPER [161], un programa de acoplamiento basado en el enfoque de correlación de Transformada rápida de Fourier (FFT). El enfoque de FFT, presentado por Katchalski-Katzir y colaboradores [162] en 1992, condujo a un gran progreso en el acoplamiento de cuerpo rígido proteína - proteína. En este método, una de las proteína (que llamaremos el receptor) se coloca en el origen del sistema de coordenadas en una cuadrícula fija, la segunda proteína (que llamaremos el ligando) se coloca en una rejilla móvil, y la energía de interacción se escribe en la forma de una función de correlación (o como una suma de algunas funciones de correlación). La eficiencia numérica de los métodos proviene del hecho de que tales funciones de energía se pueden calcular de manera eficiente usando FFT, y esto da como resultado la capacidad de muestrear exhaustivamente miles de millones de conformaciones de las dos proteínas que interactúan, evaluando las energías en cada punto de la cuadrícula. Por lo tanto, el algoritmo

basado en FFT permite el acoplamiento de proteínas sin información *a priori* sobre la estructura del complejo. Katchalski-Katzir y col. [162] utilizaron una función de puntuación simple que solo explicaba la complementariedad de formas. Sin embargo, los métodos posteriores basados en el enfoque de correlación de FFT para el acoplamiento introdujeron funciones de puntuación más complejas y más precisas que también incluían términos que representan interacciones electrostáticas [163, 164], o contribuciones tanto electrostáticas como de desolvatación [165]. Una clave para el éxito de los métodos de cuerpo rígido es que el término de complementariedad de forma permite algunas superposiciones y, por lo tanto, los métodos pueden tolerar diferencias moderadas entre estructuras unidas y no unidas (cristalizadas por separado). Como se discutirá, una de las características distintivas de PIPER, el programa de acoplamiento utilizado en la versión actual de ClusPro, es que esta implementa el método de correlación FFT que utiliza una función de puntuación que incluye un término de interacción por pares basado en la estructura, y la combinación con los otros términos en la función de energía aumenta sustancialmente la precisión del acoplamiento, lo que resulta en estructuras más cercanas a las nativas [161].

Los métodos de cuerpo rígido, incluido PIPER, realizan un muestreo exhaustivo del espacio conformacional en una densa grilla y, por lo tanto, ciertamente muestran algunas estructuras cercanas a la nativa. Sin embargo, la necesidad de tolerar algunos enfrentamientos estéricos debido al acoplamiento de estructuras de proteínas no unidas requiere el uso de funciones de puntuación aproximadas, y la reducción de la sensibilidad a las diferencias conformacionales también reduce la especificidad. Por lo tanto, las conformaciones acopladas que están cerca de la estructura nativa no necesariamente tienen las energías más bajas, y las conformaciones de baja energía pueden ocurrir lejos de las estructuras de rayos X. En PIPER, se conservan las 1.000 estructuras acopladas de menor energía para su posterior procesamiento y se espera que este conjunto incluya al menos algunas que estén cerca de la estructura nativa del complejo. Otra característica única de ClusPro es que selecciona los centros de *clusters* altamente poblados de las estructuras de baja energía, en lugar de simplemente las conformaciones de energía más baja, como las predicciones del complejo [166]. Como se analizará más adelante, el tamaño de cada grupo representa el ancho del pozo de energía correspondiente y, por lo tanto, proporciona cierta información sobre las contribuciones entrópicas de la energía libre. Aunque los clusters más grandes no contienen necesariamente las estructuras más cercanas a la nativa, se demostró que los 30 conglomerados más grandes incluyen estructuras casi nativas para el 92% de los complejos en un conjunto de referencia de proteínas - proteínas [167-170]. Sin embargo, las tasas de éxito son más altas para ciertas clases de complejos, como pares de inhibidores de enzimas [171, 172], y por lo tanto, generalmente es suficiente retener solo diez o menos agrupaciones altamente pobladas.

1.6.2. Rosetta SnugDock

El paquete de software de modelado molecular Rosetta proporciona una gran cantidad de herramientas validadas experimentalmente para modelar y diseñar proteínas, ácidos nucleicos y otros biopolímeros, con nuevos protocolos que se agregan continuamente. Se utiliza bajo un servidor web llamado *Rosetta Online Server* (ROSIE). Entre todas las aplicaciones que ofrece esta plataforma se incluyen determinación de pKa, cálculo de accesibilidad lipídica, rediseño de ácido ribonucleico, acoplamiento proteína-proteína, acoplamiento de proteína-molécula pequeña, acoplamiento simétrico, acoplamiento de anticuerpos, acoplamiento de toxinas cíclico, determinación de péptido de unión crítica y mapeo de sitios de unión de molécula pequeña. ROSIE está disponible gratuitamente para usuarios académicos en <http://rosie.rosettacommons.org>. [173]

1.6.2.1. Acoplamiento Anticuerpo-Antígeno

Aunque las predicciones precisas de estructuras de anticuerpos no unidos son interesantes, carecen de un contexto biológico importante como la interacción anticuerpo-antígeno (Ab-Ag). Las estructuras de alta resolución de complejos Ab-Ag dan una idea del mecanismo molecular por el cual funcionan los anticuerpos, una necesidad para el diseño racional de vacunas o agentes terapéuticos de anticuerpos. Las estructuras de los complejos Ab-Ag pueden determinarse a través de métodos experimentales; sin embargo, al igual que con los anticuerpos no unidos, estos métodos están limitados por su rendimiento y gasto, y no son viables para todas las proteínas. Cuando los métodos experimentales no se pueden usar para determinar estructuras complejas, la predicción computacional de la interfaz proteína-proteína (acoplamiento) proporciona un enfoque alternativo. En general, los enfoques de acoplamiento computacional se esfuerzan por muestrear todas las posibles interacciones entre dos proteínas para discernir la interacción biológicamente relevante. La predicción de una interacción proteína-proteína de *novo* es un desafío debido al gran número de conformaciones acopladas posibles. Sin embargo, el espacio muestral puede hacerse tratable con información sobre la interacción. En el caso de las interacciones Ab-Ag, el espacio de búsqueda está limitado porque el parátipe del anticuerpo, compuesto por los seis bucles CDR, es el sitio de unión para el epítipo del antígeno relacionado.

El algoritmo Rosetta SnugDock aprovecha la información sobre las regiones flexibles y/o inciertas del anticuerpo para obtener un acoplamiento Ab-Ag robusto [174]. SnugDock simula el mecanismo de ajuste inducido mediante la optimización simultánea de varios grados de libertad. Realiza acoplamiento de cuerpo rígido del complejo anticuerpo (V_L - V_H)-Ag, así como la remodelación

de los bucles CDR H2 y H3, el último de los cuales típicamente aporta una pluralidad de contactos atómicos a la interacción Ab-Ag [175, 176]. SnugDock también puede simular la selección del conformero intercambiando el anticuerpo o el antígeno con otro miembro de un conjunto estructural pre-generado. Debido a que SnugDock muestrea la mayor parte del espacio conformacional disponible para los paratopes del anticuerpos, puede refinar los modelos de homología de anticuerpos con imprecisiones en la orientación V_L - V_H difícil de predecir y en el lazo CDR H3.

Al acoplar modelos de homología, es mejor si hay evidencia experimental que sugiera la ubicación general del epítipo (dentro de aproximadamente 8 Å). Si no hay información disponible sobre el epítipo, existen varios programas que realizan el acoplamiento global o la predicción de epítopes [177]. En particular, hay dos métodos de acoplamiento de cuerpo rígido con transformada rápida de Fourier (FFT) que implementan potenciales de energía específicos de anticuerpo: PIPER [161] con el potencial de anticuerpos ADARS [178] y ZDOCK [179] con el potencial de i-Patch del anticuerpo [180]. En la FFT los enfoques corporales rígidos son rápidos, pero no pueden explicar los movimientos de los anticuerpos tras la unión del antígeno o compensar los errores en el modelo de homología inicial, SnugDock es el único método de acoplamiento de estructuras flexible de anticuerpos. Puede proporcionar una alternativa de acoplamiento antígeno global, pero es más lenta y, como otras, puede producir predicciones de epítopos falsos positivos [174].

El acoplamiento funciona en dos fases: modo de baja resolución, en el que las cadenas laterales están representadas por un único pseudoátomo ubicado en el centro de los átomos pesados de la cadena lateral y el modo de alta resolución, en el que todos los átomos de proteína son explícitos. El modo de baja resolución consiste en dos tipos de movimientos de Monte Carlo intercalados: la traducción y rotación Ab-Ag de cuerpo rígido y los intercambios de conformador de conjunto de columna vertebral. Además, al final del modo de baja resolución, los bucles H2 y H3 se refinan. El modo de alta resolución consiste en una trayectoria de Monte Carlo de 50 pasos en la que cada movimiento se selecciona de un conjunto de cinco movimientos posibles: acoplamiento de cuerpo rígido Ab-Ag (40%), acoplamiento de cuerpo rígido V_L - V_H (40%), minimización de CDR (10%), refinamiento de bucle H2 (5%) y refinamiento de bucle H3 (5%), donde los porcentajes indican la probabilidad de seleccionar cada movimiento. Cada trayectoria da como resultado un modelo. Típicamente, SnugDock se usa para generar un total de 1.000 modelos, de los cuales los que tienen la puntuación baja muy probablemente se encuentran dentro de la conformación nativa.

1.6.2.2. Advertencias, desafíos y trampas

Hay varias advertencias asociadas con el modelado computacional de anticuerpos y el acoplamiento de anticuerpos y antígenos. Teniendo en cuenta estas advertencias, el usuario debe evaluar críticamente cada predicción. Por el contrario, SnugDock modela el estado de anticuerpos ligado al antígeno. 37% de bucles CDR H3 exhiben un cambio conformacional $> 1 \text{ \AA}$ tras la unión al antígeno (este valor rara vez es $> 1 \text{ \AA}$ para los otros bucles CDR y la orientación V_L-V_H) [181]. Para tener en cuenta los movimientos en la unión, así como el error introducido durante la modulación del anticuerpo, SnugDock muestra conformeros alternativos de conjuntos de anticuerpos y antígenos, y remodela explícitamente los bucles CDR H2 y H3, fija las cadenas V_L-V_H y minimiza la interfaz. Por lo tanto, SnugDock emula el bloqueo y la clave, la selección del conformero y los modelos de unión de ajuste inducido del anticuerpo. SnugDock, sin embargo, no muestra explícitamente los grados de libertad de la estructura del antígeno o de las otras CDR canónicas del anticuerpo. Si las conformaciones no unidas y unidas difieren sustancialmente o si los modelos de homología son pobres, podría ser difícil o imposible modelar el acoplamiento del complejo con precisión [182]. A pesar de esta complicación, SnugDock ha predicho con éxito complejos de Ab-Ag a partir de modelos de homología [174].

2. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es avanzar en el desarrollo de un agente inhibidor de entrada de virus como potencial tratamiento para las FHS. El agente que proponemos consiste de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio apical del Receptor de transferrina 1 humano (hTfR1), que compita con la unión de las GP1 de todos los Mamarenavirus patogénicos y que posea mínima o nula actividad efectora, con el fin de bloquear la internalización de los virus a las células huésped. Esta estrategia controlaría la progresión de este grupo de enfermedades en humanos y contribuiría al desarrollo del primer tratamiento eficaz y seguro contra cinco FHS, cuatro de las cuales no tienen terapias fiables ni vacunas disponibles en la actualidad.

Objetivos específicos:

- Evaluar en un modelo *in vitro* de pseudovirus la actividad del plasma de pacientes convalecientes de FHA sobre la infección de los Mamarenavirus de las FHS
- Generar un anticuerpo monoclonal derivado del anticuerpo ch128.1 con escasa o nula actividad efectora como terapia dirigida contra las FHS
- Determinar la estructura de la región variable del anticuerpo ch128.1 y proponer un modelo de su unión con el hTfR1 y que explique el bloqueo de la entrada de los Mamarenavirus de las FHS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las líneas celulares de Ovario de Hamster Chino (CHO-K1), Embrionarias de Riñón Humano (HEK-293T) fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células CHO-TRVb-1 fueron provistas por la Dr. Nélide Candurra de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires; son células CHO que fueron modificadas para la expresión de forma estable de hTfR1 en membrana.

Las células HEK-293T y CHO-K1 fueron cultivadas utilizando medio DMEM y HAM (Gibco, NY, EE.UU.), respectivamente; suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Internegocios, Mendoza, Argentina) de complementado e inactivado, 2 mM L-glutamina y 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomycin y 0,25 µg/ml fungizona (Gibco, NY, EE.UU.) a 37°C en estufa con 5% CO₂.

Las células CHO TRVb-1 fueron cultivadas utilizando medio IMDM (Gibco, NY, EE.UU.), suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF) (Internegocios, Mendoza, Argentina) de complementado e inactivado, 2 mM L-glutamina y 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomycin y 0,25 µg/ml fungizona (Gibco, NY, EE.UU.) suplementado con 50 µg/ml de Geneticina (G418, Sigma, MO, EE.UU.) a 37°C en estufa con 5% CO₂.

3.2. Inhibición de la internalización de pseudovirus decorados con GP1/GP2 de FHS, en células humanas in vitro

3.2.1. Generación del modelo de pseudovirus

Para la determinación de la internalización de virus de las FHS, en primer lugar, se generaron partículas pseudovirales de JUNV, MACV, CHAV, GTOV, SABV y LASV, co-transfectando células HEK-293T con vectores para la expresión de la proteína de cápside viral gag/pol del virus de la leucemia murina no-replicante (MLV), el complejo de glicoproteínas GP1/GP2 de cada uno de los virus, y el vector retroviral pQCXIX que expresa GFP (por las siglas en inglés: *green fluorescent protein*) (**Figura 20**) por transfección con fosfato de calcio según lo detallado en Radoshitzky y col. 2017 [71]. En este sistema, las glicoproteínas sobre la superficie de los pseudovirus interaccionan con hTfR1 en la membrana celular y las partículas pseudovirales son internalizadas induciendo la expresión de GFP (**Figura 20**). Brevemente, se plaquearon células HEK-293T un día antes para que al momento de la transfección las mismas estén en un 50% de confluencia. Para la transfección de los vectores se preparó una solución de CaCl₂/HBS/ADN por cada placa de cultivo de 10 cm, se alicuotaron 500 µl de HBS 2X (273 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄, 55 mM HEPES, pH 7,0) dentro de un tubo de centrifuga

estéril de 1,5 ml. En un tubo separado, 25 µg totales de ADN (misma relación de cada vector), 61 µl de CaCl_2 2M (2 M CaCl_2 en agua) más agua destilada hasta completar 500 µl de volumen total. Se agregó la mezcla CaCl_2 /ADN al HBS y luego se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se añadió directamente a las células sobre la placa de cultivo dejando caer gota a gota de manera uniforme en el medio y se incubó en estufa a 37°C con 5% de CO_2 durante 16 h, momento en el cual se cambió el medio por medio fresco. El sobrenadante con los pseudovirus se recolectaron a las 24 h de la transfección (Día 1) y a las 48 h (Día 2). Los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0,45 µm y se guardaron a -80°C.

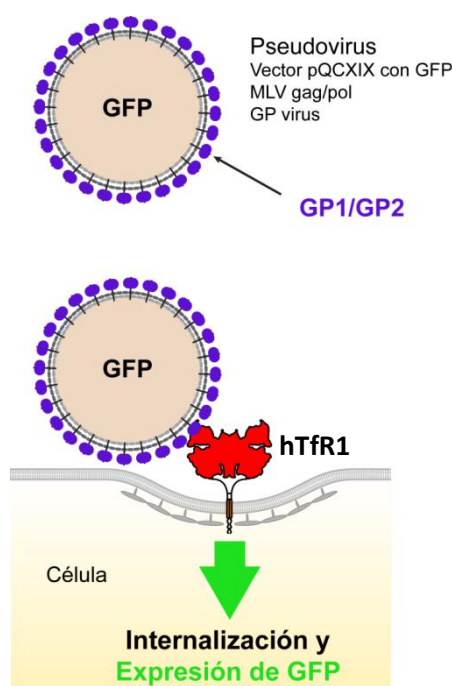


Figura 20. Modelo de pseudovirus de los Mamarenavirus de las FHS. Se generaron partículas pseudovirales decoradas con el complejo GP1/GP2 de JUNV, MACV, CHAV, GTOV, SABV o LASV que contienen un vector para la expresión de GFP. En este sistema la glicoproteínas GP1 sobre la superficie de los pseudovirus interaccionan con el hTfR1 sobre la membrana celular de la célula huésped y las partículas pseudovirales son internalizadas induciendo la expresión de GFP.

3.2.2. Ensayo de internalización de pseudovirus en presencia de plasma de pacientes convalcientes de FHA y anticuerpos específicos

Con el fin de evaluar la internalización de pseudovirus en presencia de distintos tratamientos, se cubrieron placas de 48 pocillos con poli-D-lisina (0,05 mg/ml en agua destilada) y se incubaron a 37°C durante 1 h. Luego se retiró la solución de cada pocillo y las placas se dejaron secar en la cabina de flujo laminar. Las placas fueron recubiertas con células HEK-293T e incubadas durante 24 h. Posteriormente, el medio fue retirado y las células se trataron durante 30 min con 100 µl de: medio

completo, diluciones 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 o 1:100.000 de plasma de pacientes convalecientes de FHA, con título 10.240, 320 o 0 de AcNT; o, medio completo, ch128.1 (50 nM), Fab128.1 (100 nM) y un anticuerpo inespecífico como control negativo llamado Cetuximab (50 nM) (Erbix[®], Anticuerpo anti- EGFR (factor de crecimiento epidérmico), Lilly, IN, EE.UU.), a 37°C con 5% de CO₂.

Para realizar estos estudios se utilizaron muestras biológicas tituladas de plasma de pacientes convalecientes de FHA provistos por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (INEVH, Pergamino, Buenos Aires, Argentina). El protocolo para el uso de estas muestras “INEVH 01/2011” ha sido aprobado por la comisión evaluadora y el comité de ética INEVH.

Luego de la incubación, se adicionaron 100 µl de medio con pseudovirus de JUNV, MACV, GTOV, CHAV y SABV; o, medio con cada pseudovirus suplementado con la misma concentración final de cada uno de los tratamientos, se incubó 16 h en las mismas condiciones y se cambió el medio por medio fresco. Cabe mencionar que al momento de adicionar los pseudovirus las soluciones de plasma se diluyeron al medio, por lo tanto las diluciones finales son de 1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000 o 1:200.000.

A las 48 h luego del tratamiento, las células fueron levantadas utilizando una solución de tripsina/EDTA (0,05% tripsina, 0,02% EDTA) y fijadas con 2% de formaldehído. El porcentaje de células que expresaron GFP fue medido por citometría de flujo FACScan (BD-Biosciences, CA, EE.UU.). Se tomaron 50.000 eventos de cada condición y se determinó fluorescencia con excitación por láser de argón (488 nm) y la emisión se detectó utilizando un filtro de paso de banda de 530/30 nm en el canal FL1. Antes de realizar el análisis se eliminaron las células muertas y los desechos utilizando los parámetros de dispersión directa (*forward scatter*, FSC) y lateral (*side scatter*, SSC).

Se calculó la dilución de plasma de pacientes convalecientes de FHA que induce un bloqueo del 80% (concentración efectiva 80, EC₈₀) en la internalización de pseudovirus de JUNV en células HEK-293T. Para ello se graficaron los valores del porcentaje de internalización en presencia de diluciones 1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000 o 1:200.000 de plasma con título 10.240, 320 o 0 de AcNT normalizados con el plasma título 0 de AcNT, de cada uno de los triplicados como porcentaje de bloqueo, es decir 100 menos el porcentaje de internalización relativa en función del log₁₀ de cada dilución. Luego se calcularon las curvas de ajuste no lineal y los valores de EC₈₀ utilizando GraphPad Prism 5.

El estudio de la dosis respuesta de Fab128.1 se llevó a cabo de la misma forma que lo realizado para el estudio de la internalización de pseudovirus detallado anteriormente pero utilizando diluciones seriadas 1/10 de Fab128.1 (0,01, 0,1, 1, 10 o 100 nM) o medio y pseudovirus de JUNV, MACV, GTOV, CHAV, SABV y LASV (como control negativo). Los resultados obtenidos se utilizaron

para el cálculo de la concentración capaz de inhibir el 50% la internalización de pseudovirus (concentración inhibitoria 50, IC₅₀). Para ello se graficaron los valores del porcentaje de internalización de cada uno de los triplicados en función del log₁₀ de la concentración de Fab128.1. Luego se calcularon las curvas de ajuste no lineal y los valores de IC₅₀ utilizando GraphPad Prism 5.

3.3. Comparación de secuencias genómicas

Para realizar los alineamientos de secuencias se utilizó el programa ClustalX2.0 [183]. Este programa utiliza, en la interfaz gráfica para los alineamientos, un esquema de color predeterminado. A cada residuo se le asigna un color si el perfil de aminoácidos del alineamiento en esa posición cumple con algunos criterios mínimos específicos para el tipo de residuo (TABLA 4).

ClustalX2.0 Colores Predeterminados			
Categoría	Color	Residuo	(Umbral, Grupo de residuos)
Hidrofóbico	AZUL	A,I,L,M,F,W,V	(>60%, WLVIAMFCHP)
		C	(>60%, WLVIAMFCHP)
Carga Positiva	ROJO	K,R	(>60%,KR),(>80%, K,R,Q)
Carga Negativa	MAGENTA	E	(>60%,KR),(>50%,QE),(>85%,E,Q,D)
		D	(>60%,KR), (>85%, K,R,Q), (>50%,ED)
Polar	VERDE	N	(>50%, N), (>85%, N,Y)
		Q	(>60%,KR),(>50%,QE),(>85%,Q,E,K,R)
		S,T	(>60%, WLVIAMFCHP), (>50%, TS), (>85%,S,T)
Cisteínas	ROSA	C	(>85%, C)
Glicinas	NARANJA	G	(>0%, G)
Prolinas	AMARILLO	P	(>0%, P)
Aromático	CYAN	H,Y	(>60%, WLVIAMFCHP), (>85%, W,Y,A,C,P,Q,F,H,I,L,M,V)
No conservados	BLANCO	cualquier/gap	Si no se cumple ninguno de los criterios anteriores

TABLA 4. Código de colores predeterminado por el programa ClustalX2.0. La tabla proporciona los criterios como cláusulas: (> X%, xx, y), donde X es la presencia del porcentaje umbral para cualquiera de los tipos de residuos xx (o y).

3.3.1. Comparación de secuencias de las glicoproteínas GP1 de todos los Mamarenavirus patogénicos

En primer lugar se identificaron las secuencias de los Complejos GP de glicoproteína pre-glicoproteína (*Pre-glycoprotein polyprotein GP complex*) de todos los virus causantes de las FHS de la base de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Estos complejos están compuestos por un péptido señal seguidos por las glicoproteínas GP1 y GP2. Para realizar el alineamiento se utilizaron las regiones correspondientes a las GP1 de cada uno de ellos (TABLA 5).

Arenavirus	Identificación Uniprot	Nº de residuos del complejo GP (aa)	Segmento correspondiente a la GP1
JUNV	P26313	485	59-251
MACV	Q6IUF7	496	59-262
GTOV	Q8AYW1	479	59-245
CHAV	B2C4J0	484	59-250
SABV	Q90037	488	59-254

TABLA 5. Información sobre las secuencias de Mamarenavirus disponibles en Uniprot en relación a los complejos GP de cada uno de los virus de las FHS.

Por otra parte se calcularon los porcentajes de identidad de secuencias de todas las GP1 de los distintos Mamarenavirus con respecto a JUNV. Este análisis fue realizado con la herramienta *in silico* “SIM - Alignment Tool for protein sequences” (<https://web.expasy.org/sim/>).

3.3.2. Secuencias de región variable del anticuerpo ch128.1 Fv2014 vs Fv2016

El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando las dos secuencias de las regiones variables del anticuerpo ch128.1, provistas por el Dr. Penichet de la Universidad de California en los Ángeles (UCLA), secuencias llamadas Fv2014 y Fv2016. Por motivos de protección de propiedad intelectual solo se presentan los aminoácidos correspondientes a las mutaciones que existen entre ambas secuencias.

3.3.3. Secuencia Fv2016 vs secuencia obtenida de la estructura del Fab128.1

Se realizó el alineamiento de las secuencias del Fv2016 provista por el Dr. Penichet y la secuencia de la región variable obtenida luego de resolver por cristalografía de rayos X la estructura del Fab128.1 producido por la digestión con papaína del anticuerpo ch128.1 con isotipo IgG1. Por motivos de protección de propiedad intelectual no se describen los aminoácidos.

3.3.4. hTfR1 de humano vs mTfR1

Para realizar el alineamiento de secuencia de los hTfR1 y mTfR1, se utilizaron las secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos de *Uniprot* (<http://www.uniprot.org>) de cada una de las proteínas: hTfR1 con identificación P02786 (TfR1_HUMAN) y el mTfR1 Q62351 (TfR1_MOUSE).

3.4. Producción de las proteínas recombinantes

3.4.1. Optimización de codones

Para realizar la optimización de codones para la expresión en células CHO-K1 y bacterias *E. Coli* se utilizó la herramienta *in silico Sequence Manipulation Suite* (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) junto con la base de datos de uso de codones de GenBank obtenidos a través de la página <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Las bases de datos utilizadas para las optimizaciones fueron: Células CHO: *Cricetulus griseus* [gbrod]: 331 CDS's (153527 codons); *E. Coli*: *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 [gbbct]: 5347 CDS's (1611503 codons).

3.4.2. Transformación de células

3.4.2.1. Preparación de células de *Escherichia coli* competentes para shock térmico

Se utilizó 1 colonia de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) wt Jm109 crecida en una placa de medio LB-agar para inocular 10 ml de medio LB sin antibiótico a 37°C durante 16 h. Se utilizaron 5 ml de este cultivo saturado para inocular 500 ml de medio LB y se cultivó a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 – 0,8. Se incubó el cultivo en hielo durante 30 min y se centrifugó a 4.000 g durante 7 min a 4°C. Se resuspendió el *pellet* suavemente con 500 ml de *buffer* TBF I (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 50 mM de MnCl₂, 10 mM de CaCl₂, pH 5,8) refrigerado. Posteriormente se centrifugó a 4.000g durante 7 min a 4°C, se resuspendió el *pellet* suavemente con 100 ml de *buffer* TBF I y se incubó en hielo durante 1 h. Se realizó otra centrifugación a 4.000g durante 7 min a 4°C, se resuspendió el *pellet* con 200 ml de *buffer* TBF II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM de CaCl₂, 15% de glicerol, pH 7,0) refrigerado y se centrifugó a 4.000g durante 7 min a 4°C. Finalmente el *pellet* fue resuspendido en 4 ml de *buffer* TBF II y se hicieron alícuotas de 50 µl que fueron guardadas a -80°C.

3.4.2.2. Transformación de bacterias por shock térmico

Se tomaron 50 µl de bacterias competentes guardadas en -80°C y se descongelaron en hielo durante 30 min. Se agregaron 2 µl de ADN y se incubó durante 20 min en hielo. Luego se incubaron en un baño termostatzado a 42°C durante 90 seg, y rápidamente se pusieron en hielo, donde se incubó durante 5 min. Posteriormente las bacterias se mezclaron con 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 h en agitación a 37°C. Luego, 200 µl de este cultivo fueron plaqueados en placas de LB-Agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron 16 h en estufa a 37°C. Se realizaron cultivos líquidos

de diez colonias resistentes al marcador de selección en medio LB con ampicilina (100 µg/ml), se realizaron stocks en 30% de glicerol y se guardaron a -80°C.

3.4.2.3. Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes

Se utilizó 1 colonia de *E. coli* wt crecida en una placa de medio LB-agar para inocular 10 ml de medio LB sin antibiótico durante 37°C durante 16 h. Se utilizaron 5 ml de este cultivo saturado para inocular 500 ml de medio LB y se cultivó a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5 – 0,8. Se incubó el cultivo en hielo durante 30 min y se centrifugó a 4.000g durante 7 min a 4°C. Luego, el *pellet* fue lavado con 500, 250 y 125 ml de una solución 10% de Glicerol fría centrifugando entre lavado y lavado a 4.000g durante 7 min a 4°C. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 4 ml 10% de Glicerol frío y se hicieron alícuotas de 80 µl que fueron guardadas a -80°C.

3.4.2.4. Transformación de bacterias por electroporación

Se agregaron 2 µl de la solución de ADN a 80 µl de bacterias electrocompetentes y el ADN fue incorporado dentro de las bacterias por electroporación utilizando un electroporador MicroPulser™ (Bio Rad, CA, EE.UU.), con el programa para bacterias EC2. Inmediatamente después de la electroporación las bacterias se mezclaron con 1 ml de medio LB y se incubó 1 h en agitación a 37°C. Luego, 100 µl del medio LB con las células electroporadas fueron distribuidas en placas de LB-Agar con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante 16 h en estufa a 37°C. Se realizaron cultivos líquidos de diez colonias resistentes al marcador de selección y luego se produjeron *stocks* en 30% de glicerol y se guardaron a -80°C.

3.4.3. Expansión y purificación de ADN plasmídico (*miniprep*)

Las *minipreps* se realizó a partir de 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) inoculados con una punta de micropipeta tomando una muestra del stock de glicerol guardado a -80°C, e incubando en agitación (200 rpm) a 37°C durante 16 h. Luego se centrifugó a 4.000g durante 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregaron 350 µl de Solución I (25 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,9% glucosa) y se resuspendió con micropipeta suave. Se agregaron 350 µl de Solución II (0,2 M NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se agregaron 450 µl de Solución III (3 M acetato de potasio, 2 M de ácido acético glacial) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 14.000g durante 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se agregó 1 ml de cloroformo/ alcohol isoamílico en una relación de 24:1 y se centrifugó a 4.000g durante 1 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 2 µl de Ribonucleasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C durante

2 h. Se agregó 1 volumen de alcohol isopropílico y se incubó durante 30 min a -20°C . Luego se centrifugó a 14.000g durante 20 min a 4°C , se descartó el sobrenadante, se lavó con 1 ml de alcohol etílico 70% y se centrifugó a 14.000g durante 10 min nuevamente. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* con el ADN se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 50 μl de agua deionizada estéril. La medida de la concentración de ADN de cada uno de los vectores se obtuvo mediante la medida de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific, MA, EE.UU.).

3.4.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

Se utilizaron geles con un porcentaje de agarosa de 12 a 15% en *buffer* TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) y la separación se realizó a voltaje constante de 80 voltios durante 1 h. El ADN fue cargado con *Loading buffer* 5X (15% glicerol, 0,2% Orange G). Los ácidos nucleicos fueron visualizados mediante tinción con GelGreen (Biotium, CA, EE.UU.).

3.4.5. Electroforesis en geles de acrilamida SDS-PAGE

Para realizar un SDS-PAGE se utilizaron geles realizados en el laboratorio de forma artesanal y otros pre-empacados comerciales. A continuación se detallan los procedimientos utilizados para cada uno de los casos.

3.4.5.1. Geles preparados en el laboratorio

Se prepararon geles de poly-acrilamida 7 a 15% a partir de acrilamida-Bis acrilamida 37,5:1 usando persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) como agentes polimerizantes. Las muestras se trataron con *buffer* de siembra (0,5% SDS, 35% glicerol y 18% β -mercaptoetanol). Posteriormente se incubaron a 95°C durante 10 min. La corrida se realizó a voltaje constante y 100 voltios durante 30 min y luego 1,5 h a 120 voltios. Se utilizó como *buffer* de corrida una solución 0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 0,1% SDS. Los geles se tiñeron durante 20 min con una solución 0,1% de coomassie R250, 10% ácido acético, 40% de metanol y se destiñeron utilizando una solución 20% de metanol, 10% ácido acético, durante 24 h. Finalmente, los geles fueron digitalizados para su posterior análisis.

3.4.5.2. Geles pre-empacados

Se utilizaron geles pre-empacados NuPAGE™ (Invitrogen, CA, EE.UU.) 4-12% de acrilamida en *buffer* Bis-Tris. Estos geles se adquieren listos para utilizar. Las muestras se trataron con NuPAGE™

LDS Sample *buffer* (4X) (Invitrogen, CA, EE.UU.). Posteriormente, se incubaron a 95°C durante 10 minutos. La corrida se realizó durante 1,5 h a 120 voltios. Se utilizó como *buffer* de corrida NuPAGE™ MOPS SDS Running *buffer* (20X) (Invitrogen, CA, EE.UU.). Los geles se tiñeron durante 20 min con GelCode™ (*Blue Safe Protein Stain*, Invitrogen, CA, EE.UU.) y luego se destiñeron con agua destilada durante 16 h con agitación. Finalmente, los geles fueron digitalizados para su posterior análisis.

3.4.6. Lisis bacteriana por sonicación

Las bacterias fueron lisadas por ultrasonido utilizando un sonicador (Sonics-Vibra Cell, Newtown, CT, EE.UU.) realizando 10 pulsos de 30 s de duración con 90 s de descanso en hielo entre cada pulso. Se utilizó una punta de 3 mm de diámetro a una amplitud de 90% y *cycle* de 1.

3.4.7. Estudio del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas recombinantes con región variable del AcM ch128.1

Para el cálculo del pI del scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016, las secuencias de cada una de las proteínas se incorporaron en un sitio *in silico* llamado IPC (*isoelectric point calculator*) (<http://isoelectric.ovh.org>) que calcula los pI a través de la secuencia primaria de la proteína según las siguientes bases de datos: *IPC protein*, *IPC peptide*, *Toseland*, *Thurlkill*, *Nozaki_Tan*, *Dawson*, *DTASelect*, *EMBOSS*, *Grimsley*, *Rodwell*, *Sillero*, *Solomon*, *Lehninger*, *Wikipedia* y *ProMoST*.

3.5. Producción de sTfR1 humano

Células de riñón de hamster bebé (BHK) productoras del sTfR1 (BHKHis-sTfR1) fueron cultivadas en el laboratorio de la Dra. Tracy Daniels-Wells de la *Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, David Geffen School of Medicine*, Universidad de California en Los Ángeles, California, Estados Unidos. Las células fueron cultivadas en *Roller Bottles* y el sobrenadante (1L), conteniendo el sTfR1, fue cosechado a las 2 semanas de comenzado el cultivo. Posteriormente el sTfR1 fue purificado del sobrenadante mediante IMAC y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (ver siguiente sección).

3.5.1. Purificación del sTfR1

3.5.1.1. Cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)

Se realizó una purificación por IMAC del sTfR1 utilizando una columna cargada con níquel pre-empacadas HisTrap FF (GE Healthcare, MA, EE.UU.) de 5 ml y un equipo de FPLC *Duoflow* (Bio-Rad, CA, EE.UU.). El sobrenadante (1L) del cultivo celular conteniendo el sTfR1 fue inyectado en la columna a un flujo de 5 ml/min. Se lavó con 50 ml de *buffer* A (TBS 1X, 150 mM de NaCl, pH 7,6) y luego se realizaron lavados con 15 ml de un gradiente de 0 a 10% de *buffer* de elusión (TBS 1X, 150 mM de NaCl, 500 mM imidazol, pH 7,6). Finalmente se realizó la elusión del sTfR1 con 50 ml de un gradiente de *buffer* de elusión 10% a 100%. Posteriormente, la columna fue lavada y reconstituida utilizando secuencialmente 25 ml de PBS pH 7,4, EDTA 50 mM, NaOH 1M, Tritón X-100 0,25% en ácido acético 0,1 M, etanol 70%, isopropanol 30%, NaCl 1,5 M, PBS pH 7,4, NiCl 2,5% en agua destilada, PBS pH 7,5 y finalmente la columna fue guardada en una solución 20% de etanol. Entre cada una de las distintas soluciones se lavó con 20 ml de agua destilada.

3.5.1.2. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La SEC separa proteínas basándose en diferencias en su peso molecular. El método se basa en la utilización de una resina compuesta por partículas esféricas con poros de un tamaño adecuado a través de las cuales las proteínas difunden a una velocidad proporcional a su tamaño. En donde las proteínas con mayor tamaño poseen menores tiempos de retención que las de menor tamaño.

Se utilizó una columna *ENrich SEC 650 10 x 300 mm* (Bio Rad, CA, EE.UU.) y un equipo de cromatografía “*NGC Quest™ 100 Chromatography System*” (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Previo a la purificación, se realizó un lavado de la columna con dos volúmenes de columna (vol.) de agua deionizada y 2 vol. de *buffer* de corrida (50 mM Tris-Cl, 150 mM de NaCl, pH 7,6). Se realizó la inyección de la muestra con un volumen final de 500 µl y la elusión, utilizando 1,5 vol. de *buffer* de corrida a un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1,5 ml a partir de la aplicación de la muestra.

3.6. Anticuerpos con la región variable del AcM ch128.1

3.6.1. Desarrollo de un anticuerpo completo con isotipo IgG4 con la región variable del AcM ch128.1 (ch128.1g4) en células de mamífero

3.6.1.1. Diseño de los vectores para la expresión del anticuerpo ch128.1g4

En un primer paso se realizó la optimización de codones para la expresión en células CHO-K1 según lo descripto en la sección 3.4.1. Luego se sintetizaron las secuencias que codifican para las regiones Fv2014 del AcM ch128.1 de ratón en vectores de clonado pUC57 por la empresa GenScript (NJ, EE.UU.). Las secuencias codificantes para las regiones variables Fv2014 de ch128.1 fueron insertas en los vectores 6714 pAN (con gen de resistencia a Geneticina) y 6132 pAH (con gen de resistencia a Histidinol), que codifican para la regiones constantes liviana isotipo *kappa* humano y la cadena pesada isotipo *gamma* 4 (IgG4) humana, respectivamente que fueron provistos por el Dr. Penichet de la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA), EE.UU.. Los vectores también fueron secuenciados por GenScript para verificar su correcta construcción. Estos vectores de expresión de cadena liviana y pesada fueron utilizados para la generación de los transfectomas de ch128.1g4. Las construcciones con las regiones variables insertas en vectores pUC57 fueron enviadas en papel absorbente y luego reconstituidas con agua.

3.6.1.2. Transfección de los vectores en células CHO-K1 y generación de transfectomas

Con el fin de incorporar los vectores de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo ch128.1g4 en células CHO-K1, se realizó una transfección. Para ello, se sembraron células CHO-K1 en placas de 6 pocillos, en 2 ml de medio completo 24 h antes de la transfección (60 a 90% de confluencia al día de la transfección) y se incubaron a 37°C en estufa con atmosfera de 5% CO₂. Los vectores para la expresión de las cadenas pesada y liviana fueron linealizados mediante digestión con la enzima de restricción PvuI (New England BioLabs, MA, EE.UU.) según indicaciones del fabricante y luego co-transfectados. Para la transfección se utilizó un sistema de liposomas catiónico llamado *Turbofect* (MBI Fermentas, Alemania) según especificaciones del fabricante.

3.6.1.3. Selección de células resistentes y generación de clones por dilución terminal

En primer lugar con el fin de evaluar las concentraciones óptimas de antibióticos a utilizar para realizar la selección de las células efectivamente co-transfectadas con ambos vectores, se realizó una curva de muerte de los antibióticos en células CHO-K1. Se utilizaron los antibióticos Geneticina e Histidinol cuyas resistencias contienen los vectores de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo ch128.1. Para ello, se sembraron 5×10^4 células CHO-K1 por pocillo en placas de 96 pocillos en 100 µl de medio completo (ver sección 3.1). A las 24 h el medio fue cambiado por 100 µl de medio igual al anterior o suplementado con diluciones seriadas ½ de Geneticina (2 mg/ml a 32 µg/ml) o Histidinol (200 mM a 6,25 mM) (Sigma, MO, EE.UU.). Todas las condiciones se realizaron por triplicado y el

medio fue reemplazado por medio fresco suplementado con cada una de las concentraciones de antibiótico cada 3 días. El porcentaje de células vivas se determinó mediante la visualización de cada pocillo al microscopio invertido de campo claro.

Para la selección de los clones que contenían los dos vectores para la expresión del ch128.1g4, 48 h luego de la co-transfección se cambió el medio por medio completo suplementado con 500 µg/ml Geneticina y 50 mM Histidinol, de concentración final. Se cambió el medio cada 3 días durante 10-15 días hasta obtener *clusters* provenientes de células estables co-transfectadas con ambos vectores, que son las únicas que sobreviven en el medio con Geneticina e Histidinol. Las células fueron levantadas con una solución 0,05% tripsina 0,02% EDTA y se realizó una dilución terminal realizando el cálculo para sembrar 0,5 células por pocillo en dos placas de 96 pocillos con 100 µl de medio igual al descripto anterior suplementado con los antibióticos. Se incubaron a 37°C en estufa con atmosfera de 5% CO₂ durante una semana y se seleccionaron los pocillos donde existían *clusters* únicos. El medio fue cambiado por medio fresco igual al anterior una vez por semana. Una vez que los *clusters* ocuparon el 70% del pocillo, el medio fue recolectado para la determinación de la presencia de anticuerpo humano por ELISA *sándwich* para IgGs.

3.6.2. ELISA *sándwich* para IgGs

Se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 50 µl/pocillo de un anticuerpo *Goat Anti-Human IgG (γ chain specific)* (SouthernBiotech, Bi, EE. UU.) (5 µg/ml) en *buffer* carbonato (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,3) y se incubó a 4°C durante 16 h. Se lavó 3 veces con 200 µl/pocillo de PBS (155 mM NaCl, 1,059 mM KH₂PO₄, 2,96 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) y se agregaron 100 µl de solución de bloqueo (3% BSA, 0,02% azida de sodio, en *buffer* PBS) a cada pocillo. Se Incubó 1 h a temperatura ambiente y la placa fue lavada 3 veces con 200 µl/pocillo de *buffer* PBS. Se adicionaron 50 µl/pocillo de sobrenadantes de los clones para ser testeados y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa 4 veces con 200 µl/pocillo de *buffer* PBS; se incubó durante 1 h a 37°C con 60 µl/pocillo de *Anti-Human Kappa Light Chain* (SIGMA MO, EE.UU.) (1/10.000) en una dilución 1/3 de solución de bloqueo; se lavó la placa 4 veces con 200 µl/pocillo de *buffer* PBS; y luego se agregaron 100 µl/pocillo de una solución *buffer* de sustrato (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ y 2,5 mg/ml p-nitrofenil-fosfato (pNPP)). Finalmente, se incubó durante 1 h a 37°C y la placa fue leída en un lector de placas de ELISA (Rayto, Alemania) a 405 nm.

3.6.3. Desarrollo de fragmentos de anticuerpos de cadena simple con la región variable del AcM ch128.1 en *E. coli* (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016)

3.6.3.1. Diseño de los vectores de expresión en *E. coli*

Se desarrollaron fragmentos scFv de las dos secuencias que contamos de regiones variables del AcM ch128.1, denominadas Fv2014 y Fv2016. Los scFvs diseñados fueron llamados respectivamente scFv128.1-2014 y scFv128.1-2016, y se diseñaron con las regiones variables de cadena liviana y pesada unidas por un “linker” flexible que consiste en una secuencia en tándem de tres repeticiones de GGGGS [184]. Para facilitar la purificación de los scFvs se sintetizó la secuencia con una cola de seis histidinas en el extremo amino terminal y un sitio de clivaje por la proteasa viral del tabaco (TEV) para su posterior eliminación siguiendo la secuencia Hisx6-V_H-(GGGGS)x3-V_L (ver **Figura 31**). Las secuencias completas de los scFvs se generaron por síntesis química por la empresa GenScript (NJ, EE.UU.), se ligaron con el vector de expresión pGS-21a (**Figura 21, A**) y finalmente se secuenciaron para verificar su correcta construcción. Por otro lado, se generó una proteína de fusión con la región variable Fv2016 y la proteína de unión a maltosa (MBP), proteína MBP-scFv2016 (ver **Figura 31**). Para ello, la secuencia del Fv2016 se insertó en un vector comercial que contiene la secuencia del MBP, pMAL-c2X (**Figura 21, B**).

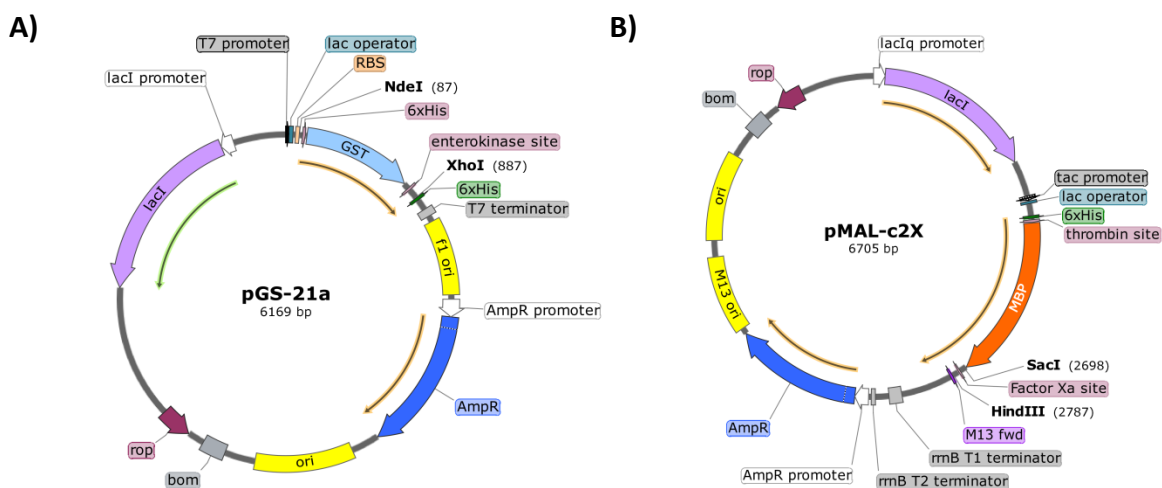


Figura 21. Vectores de expresión procariota utilizados para la expresión de proteínas recombinantes scFv con las regiones variables del anticuerpo ch128.1. A) Vector comercial de expresión en *E. coli* pGS-21a utilizado para la expresión de las proteínas scFv128-2014 y scFv128.1-2016. B) Vector comercial de expresión en *E. coli* pMAL C2X utilizado para la expresión de la proteína de fusión MBP-scFv-2016. Ambos poseen resistencia a ampicilina (AmpR) y una región de clonado múltiple bajo un promotor T7 inducible por IPTG.

3.6.3.2. Transformación, cultivo e inducción de las proteínas recombinantes con la región variable del AcM ch128.1 en *E. coli*

Los vectores de expresión, pGS-21a - scFv128.1-2014 (**Figura 36**), pGS-21a - scFv128.1-2016 (**Figura 43**) o pMAL-c2X - MBP-scFv128.1-2016 (**Figura 50**) codificantes para los tres fragmentos de anticuerpos recombinantes scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 o MBP-scFv128.1-2016 fueron empleados para las transformaciones por *shock* térmico de bacterias *E. coli* según lo detallado en la sección 3.4.2.1. Se seleccionaron los clones utilizando placas LB-Agar con ampicilina (100 µg/ml). En el caso del scFv128.1-2014, la presencia del casete de expresión fue evaluada mediante *colony* PCR según lo detallado en la siguiente sección.

A partir de una colonia de bacterias productoras transformadas con cada uno de los vectores de expresión se realizó un pre-cultivo de 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) de un stock en glicerol a -80°C de la cepa *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016) o BL21 (DE3) C41 (scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016) y se incubó en agitación a 37°C durante 16 h. Luego, 1 L de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) fueron inoculados con los 10 ml del pre-cultivo obtenido en el paso anterior. Dicho cultivo fue incubado en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO a 600 nm de 1,2 - 1,5 (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016 como proteína soluble) o 0,8-1 (scFv128.1-2016 como cuerpos de inclusión). Luego, la expresión de las proteínas recombinantes fue inducida por el agregado de IPTG a una concentración final de 0,1 mM. Una vez transcurridas 24 h de inducción con agitación continua a 16°C (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016) o 4 h de inducción con agitación continua a 37°C (scFv128.1-2016 como cuerpos de inclusión), los cultivo fueron centrifugados a 4.000g durante 10 min a 4°C, de esta manera se obtuvieron los *pellets* bacterianos que luego fueron guardados a -20°C hasta el momento de la purificación de las proteínas recombinantes.

3.6.3.3. Detección de clones transformados con el vector para la expresión del scFv128.1-2014 por *colony* PCR

La detección de los clones transformados con el vector pGS-21a-scFv128.1-2014 para la expresión del fragmento scFv128.1-2014 se realizó la técnica de *colony* PCR. En primer lugar, se puso a punto la técnica realizando una PCR en gradiente. Se emplearon como molde para la PCR 10 ng de *minipreps* del vector pGS-21a-scFv128.1-2014 clonados por bacterias *E. coli* JM109. Las reacciones se realizaron utilizando *buffer* 1X, 0,1 µM de cada primer, 0,25 mM de cada dNTPs y 1 Unidad de Taq pfu (Invitrogen, CA, EE.UU.) por reacción en un volumen final de 20 µl. Se realizaron 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53,4, 53,4, 55,8, 58,5, 61,4, 64,2 o 66,7°C, y 1 min a 72°C con un ciclo inicial de 2 min a

94°C y final de 5 min a 72°C. Los *primers* utilizados se especifican en la **TABLA 6**. Estos se diseñaron para hibridar por fuera del casete de scFv128.1-2014 (primer forward, pGS-21a-f) y por dentro del casete (*primer* reverse, scFv128.1-2014-r) generando un amplicón de 401 pb. Se utilizó un termociclador en gradiente MasterCycler (Eppendorf, HA, Alemania). La *colony* PCR se realizó igual que la descrita anteriormente para la reacción de PCR en gradiente pero utilizando una temperatura definida de 64°C para la hibridación de los *primers* y como molde se utilizó 1 µl de sobrenadante de una solución de agua y bacterias de cada colonia que fueron previamente incubadas a 94 °C durante 5 min y luego centrifugadas a 4.000g durante 10 min.

TABLA 6. *Primers* utilizados para realizar la *colony* PCR.

<i>Primers</i>	Secuencia	TM
pGS-21a-f	5'AGGGGAATTGTGAGCGGATA 3'	62°C
scFv128.1-2014-r	5'CTTTTATCCACGGTCAGCGG 3'	63°C

3.6.3.4. Purificación de las proteínas recombinantes con la región variable del AcM ch128.1 en E. coli

Las purificaciones de las proteínas recombinantes se realizaron utilizando los *pellets* bacterianos del cultivo inducido de 1L (aprox. 5 gr de peso húmedo) resuspendidos en 25 ml de volumen final con *buffer* de unión (155 mM NaCl, 1,059 mM KH₂PO₄, 2,96 mM Na₂HPO₄, 20 mM imidazol; pH 7,4 o pH 6,5 para el scFv128.1-2014; pH 7,0 para el scFv128.1-2016; y pH 7,5 para el MBP-scFv128.1-2016) y se adicionaban 250 µl de un coctel de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) y 250 µl de benzonase (Thermo Scientific, MA, EE.UU.). Luego las células fueron lisadas por sonicación según lo detallado en la sección 3.4.6, se centrifugó a 6.000g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante conteniendo proteínas en forma soluble fue recuperado (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016 y MBP-scFv128.1-2016) y se filtró con filtro 0,22 µm como paso previo para la purificación por IMAC.

En el caso de purificar el scFv128.1-2016 a partir de cuerpos de inclusión se recuperó el *pellet*. Los cuerpos de inclusión se lavaron 3 veces con *buffer* 155 mM NaCl, 1,059 mM KH₂PO₄, 2,96 mM Na₂HPO₄ pH 7,0, 2 M de urea, 1% Tritón X-100, resuspendiendo y centrifugando a 6.000g durante 20 min a 4°C cada vez. Para cada lavado se incubó durante 1 h a 4°C en agitación rotativa. Una vez finalizados los lavados, para desnaturalizar y solubilizar los *pellet* se resuspendieron en *buffer* 155 mM NaCl, 1,059 mM KH₂PO₄, 2,96 mM Na₂HPO₄; pH 7,0, 8 M de urea y se incubaron durante 48 h en agitación rotativa a 4°C. Luego se centrifugó a 6.000g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante,

conteniendo los cuerpos de inclusión solubilizados, se guardó para la posterior purificación del scFv128.1-2016 por IMAC.

La purificación por IMAC se realizó utilizando columnas preempacadas cargadas con níquel HisTrap FF (GE Healthcare, MA, EE.UU.) de 1 y 5 ml y una bomba peristáltica (APEMA, BA, Argentina) con flujos de 0,5 ml/min para las columnas de 1 ml y 2,5 ml/min para columnas de 5 ml. En todos los casos, antes de utilizar las columnas, estas fueron previamente lavadas con 10 vol. de agua destilada, 5 vol. de *buffer* de unión, 5 vol. de *buffer* de elusión y finalmente equilibrada con 10 vol. de *buffer* de unión. Posteriormente, cada solución de proteína se inyectó en la columna. Se lavó con 20 vol. de *buffer* de unión. Luego, previo a la elusión, se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol. Se realizaron lavados: con 12% y 20% de *buffer* de elusión (60 y 100 mM de imidazol para el scFv128.1-2014); con 4% de *buffer* de elusión (20 mM de imidazol) para el scFv128.1-2016 en forma soluble y en condiciones desnaturizantes; y con 4% y 8% de *buffer* de elusión (20 y 40 mM de imidazol) para el MBP-scFv128.1-2016.

Posteriormente las eluciones de las proteínas se realizaron utilizando 10 vol. de *buffer* de elusión (155 mM NaCl, 1,059 mM KH_2PO_4 , 2,96 mM Na_2HPO_4 , 500 mM imidazol) con pH 7,4 o pH 6,5 para el scFv128.1-2014, pH 7,0 para el scFv128.1-2016 y 7,5 para el MBP-scFv128.1-2016. Se recogieron fracciones de 1 ml para columnas de 1 ml y de 5 ml para columnas de 5 ml y se midió la absorbancia a 280 nm de todas las fracciones utilizando el *buffer* de unión como blanco. Cuando se purificó scFv128.1-2016 como cuerpos de inclusión en condiciones desnaturizantes todos los *buffer* tanto el de unión como el de elusión se formularon con el agregado de 8 M de urea.

Las muestras del scFv128.1-2014 eluidas de la columna, se dializaron contra *buffer* PBS (155 mM NaCl, 1,059 mM KH_2PO_4 , 2,96 mM Na_2HPO_4 , pH 6,5). La diálisis fue realizada utilizando una membrana Spectra/Por® Biotech (Spectrum, CA, EE.UU.) con un tamaño de poro de 6,5 kDa previamente lavada. La muestra fue incorporada a la bolsa de diálisis, sumergida en el *buffer* e incubada durante 24 h con agitación a 4°C. Luego se realizó un cambio de *buffer* y se incubó nuevamente 24 h en las mismas condiciones anteriores.

3.6.4. ELISA *sándwich* competitivo (scFv128.1-2014)

Se cubrió una placa de 96 pocillos con 50 μl /pocillo de una solución 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de receptor de transferrina 1 soluble (sTfR1) humano en *buffer* carbonato (0,015 M Na_2CO_3 , 0,035 M NaHCO_3 , pH 9.3) y se incubó durante 16 h a 4°C. Se lavó la placa 3 veces con 200 μl /pocillo de PBS, se agregaron 200 μl de Solución de Bloqueo (5% leche descremada en polvo, 0,02% azida de sodio en PBS pH 7.4) a cada pocillo y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa 3 veces con 200 μl /pocillo de PBS y se colocaron 50 μl /pocillo de la solución de scFv128.1-2014 (300 nM) o PBS y se

incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó ch128.1 (10 nM) y se incubó nuevamente 1 h bajo las mismas condiciones anteriores. Luego, la placa se lavó 4 veces con 200 µl/pocillo de PBS y se incubó con un anticuerpo *Anti-Human Kappa Light Chain* conjugada a fosfatasa alcalina (1/10.000) (SIGMA, MO, EE.UU.) en una dilución 1/3 de solución de bloqueo durante 1 h a 37°C. Luego la placa se lavó 4 veces con 200 µl/pocillo de PBS. Se agregó 100 µl/pocillo de solución con pNPP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mg pNPP/ml de solución) se incubó durante 2 h a 37°C y la placa se leyó a 405 nm con un lector de placas de ELISA (Rayto, Alemania).

3.7. Obtención de Fab128.1 mediante digestión con papaína del AcM ch128.1

El ch128.1 con isotipo IgG1 purificado con proteína A fue digerido con papaína y purificado utilizando el kit "*Fab Preparation Kit*" (Pierce™, Thermo Scientific, EE.UU.) en el laboratorio de la Dra. Tracy Daniels-Wells de la *Division of Surgical Oncology, Department of Surgery, David Geffen School of Medicine*, Universidad de California en Los Ángeles, California, EE.UU. según indicaciones del fabricante. Posteriormente, en nuestro laboratorio, se realizó una nueva purificación de los fragmentos de Fab128.1 pero esta vez por SEC.

3.7.1. Purificación del Fab128.1 por SEC

Se utilizó una columna de alta resolución ENrich SEC 650 10 x 300 mm (Bio Rad, CA, EE.UU.) y un equipo de cromatografía de media presión "NGC Quest™ 100 Chromatography System" (Bio-Rad, CA, EE.UU.). Previo a la purificación, la columna fue lavada con 2 vol. de agua deionizada y 2 vol. de *buffer* de corrida (50 mM Tris-Cl, 150 mM de NaCl, pH 7,6) utilizando un flujo de 1 ml/min. La fracción con la muestra del Fab128.1 fue concentrada utilizando un tubo *Amicon® Ultra-4 10K Centrifugal Filter Devices* (Millipore, MA, EE.UU.) de 30 kDa de tamaño de poro hasta 500 µl y filtrada con un filtro para centrifuga de 0,22 µm. La muestra concentrada fue inyectada en el equipo y posteriormente se realizó la elución utilizando 1,5 vol. de *buffer* de corrida. Se recolectaron fracciones de 1,5 ml a partir de la aplicación de la muestra y mediante SDS-PAGE se confirmó, la pureza, el correcto ensamblado y el peso molecular.

3.8. Evaluación de la especificidad de los AcM contra hTfR1

3.8.1. Especificidad contra sTfR1 humano por ELISA *sándwich*

Con el propósito de establecer la especificidad de los anticuerpos contra el sTfR1 humano se realizaron estudios de ELISA *sándwich*. Se cubrió una placa de 96 pocillos con 50 µl/pocillo de una solución 0,5 µg/ml de sTfR1 humano en *buffer* carbonato (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃, pH 9,3) durante 16 h a 4°C. Se lavó la placa 3 veces con 200 µl/pocillo de PBS. Se agregaron 200 µl de Solución de Bloqueo (5% leche descremada en polvo, 0,02% azida de sodio en PBS pH 7.4) a cada pocillo y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa 3 veces con 200 µl /pocillo de PBS y se colocaron 50 µl/pocillo de la solución de ch128.1 (50 nM) o Fab128.1 (100 nM) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación la placa se lavó 4 veces con 200 µl/pocillo de PBS y se incubó con un anticuerpo *Anti-Human Kappa Light Chain* conjugada a fosfatasa alcalina (SIGMA, MO, EE.UU.) (1/10.000) en una dilución 1/3 de solución de bloqueo durante 1 h a 37°C. Luego la placa se lavó 4 veces con 200 µl/pocillo de PBS y se agregaron 100 µl/pocillo 5 mg/ml de pNPP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) se incubó durante 2 h a 37°C y la placa se leyó por absorbancia a una densidad óptica a 405 nm con un lector de placas de ELISA (Rayto, Alemania).

3.8.2. Especificidad contra hTfR1 en células por Citometría de flujo

Con el propósito de establecer la especificidad de los anticuerpos contra el hTfR1 expresado en células se realizaron estudios de citometría de flujo. Se cultivaron células HEK-293T que expresan de forma nativa el hTfR1, CHO-K1 que no expresan hTfR1 (control negativo) o CHO TRVb-1 que han sido modificadas para expresar hTfR1, en sus respectivos medios de cultivo (ver sección 3.1) durante 2 días. Luego todas las células fueron levantadas con una solución 0,2% EDTA incubando durante 5 min a 37°C, centrifugadas a 1.000g durante 5 min a 4°C, resuspendidas en 1 ml de PBS 1% BSA frío y se contaron en cámara de *neubauer*. Se alicuotaron en 6 tubos con 5x10⁵ células por tubo y se lavaron con 1 ml de PBS 1% BSA frío centrifugando nuevamente a 1.200g a 4°C. Luego las células se resuspendieron en 50 µl de PBS 1% BSA, ch128.1 50 nM, Fab128.1 50 nM o 100 nM, y Cetuximab 50 nM (Erbix®[®], Lilly, IN, EE.UU.); y se incubaron durante 30 min en hielo. Luego, se realizó un lavado con 1 ml de PBS 1% BSA frío, centrifugando a 1200g a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 50 µl de PBS 1% de BSA con 2.5 µl de anticuerpo *Anti-Human Ig kappa Light chain* conjugado a ficoeritrina (PE-CF594, BD-Biosciences, CA, EE.UU.) y se incubó durante 1 h en hielo. También se realizaron controles de PBS 1% BSA sin anticuerpo secundario. Las células fueron lavadas con un 1 ml de PBS 1% BSA frío y se fijaron resuspendiendo en 200 µl de 2% de formol. La intensidad de

fluorescencia fue medida utilizando un clitómetro de flujo FACScan (BD-Biosciences, CA, EE.UU.). Se tomaron 20.000 eventos de cada condición y se determinó fluorescencia excitación por láser de argón (488 nm) y la emisión se detectó utilizando un filtro de paso de banda de 530/30 nm en el canal FL1. Antes de realizar el análisis se eliminaron las células muertas y los desechos utilizando los parámetros de FSC y SSC.

3.8.3. Determinación del complejo Fab128.1-hTfR1 por SEC

Con el propósito de determinar la especificidad del Fab128.1 contra el sTfR1 humano en solución se realizó una SEC del complejo entre el fragmento con el receptor soluble. Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de media presión NGCtm (Bio-Rad, CA, EE.UU.) y una columna de alta resolución Enrich SEC 650 (Bio-Rad, CA, EE.UU.). En primer lugar se realizó un lavado de la columna con 2 vol. de agua deionizada y 2 vol. de *buffer* de corrida (50 mM Tris-Cl, 150 mM de NaCl, pH 7,6). Se mezclaron las fracciones de sTfR1 y Fab128.1 obtenidas luego de realizar SEC a cada proteína por separado, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se concentró hasta un volumen aproximado de 500 µl utilizando un tubo *Amicon® Ultra-4 10K Centrifugal Filter Devices* (Millipore, MA, EE.UU.). Se realizó la inyección de la muestra en el equipo de cromatografía y se realizó la elución con 1,5 vol. de *buffer* de corrida a un flujo de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 0,9 ml a partir de la aplicación de la muestra. Luego se realizó un SDS-PAGE (gel pre-empacado) para evaluar la existencia de sTfR1 y Fab128.1 en cada una de las fracciones.

3.9. Estudio computacional de cristalizabilidad de las proteínas recombinantes

Para determinar el grado de cristalizabilidad de cada uno de las proteínas recombinantes generadas con o sin digerir con la proteasa TEV, se utilizó el sitio en línea “*XtalPred Server*”. A este servidor se le ingresa la secuencia de aminoácidos de cada proteína y este devuelve, entre otros valores fisicoquímicos de la proteína, los valores de los parámetros de *EP crystallization clases* y *RF crystallization clase* donde cada uno de ellos tiene una escala del 1 al 5 y 1 al 11 respectivamente, siendo los valores más bajos más promisorios para la formación de cristales y los valores más altos menos promisorios.

3.10. Cristalografía de rayos X del Fab128.1

La generación de cristales del Fab128.1 se realizó en el *UCLA-DOE Crystallization Core* de la Universidad de California en Los Ángeles, EE.UU. El Fab128.1 purificado a partir de proteólisis con papaína de ch128.1 IgG1 fue purificado por SEC y concentrado a 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 con un filtro de centrifuga para concentración de proteínas *Amicon* (Millipore, MA, EE.UU.) de 10 kDa de tamaño de poro. Finalmente, la solución de proteína se filtró utilizando un filtro para centrifuga de 0,22 μm (Corning, NY, EE.UU.). Se utilizó un robot *TTP LabTech Mosquito Crystal nanodispenser* (TTP LabTech, Me, Reino Unido) para evaluar 576 condiciones distintas en un sistema de difusión de vapor en gota colgante. Se utilizaron placas de 96 pocillos Wizard™ (Rigaku, WA, USA) y una AmSO_4 (Qiagen, Hilden, Alemania) en tres condiciones por pocillo. El robot realizó 3 gotas de 210 nl finales con distintas relaciones volumen de proteína:solución de cristalización en cada uno de los pocillos como se muestra en la **Figura 22**.

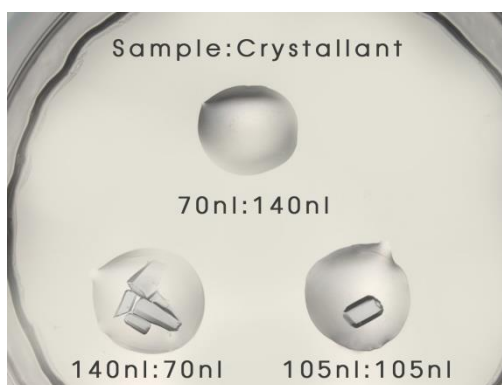


Figura 22. Fotografía de las gotas realizadas por el robot *TTP LabTech Mosquito Crystal nanodispenser* y las relaciones de muestra (*sample*) y solución de cristalización (*Crystallant*) ensayados para la cristalización del Fab128.1.

Las placas fueron incubadas en un ambiente sin vibraciones a 18°C. La formación de cristales se observó cada 72 h en un microscopio *Crystal Monitor microscope* (Emerald BioSystems, WA, EE.UU.). Una vez que se identificó un cristal orgánico con el tamaño adecuado, se pasó por una solución de glicerol 30% en solución de cristalización (del mismo pocillo del cristal), se montó en un micro lazo de 0,4 mm y se ultra-congeló por “flash-cooling” a aproximadamente -170°C sumergiendo rápidamente el cristal en nitrógeno líquido para su transporte. Sus patrones de difracción de rayos X fueron obtenidos utilizando la línea 24-ID-E con un rango de energía de 12.68-keV del sincrotrón APS (*Advanced Photon Source*, Laboratorio Nacional *Argonne*, EE.UU.). Se resolvió la estructura mediante reemplazo molecular utilizando el programa *Phaser* usando como templatado el PDB 4UV4. El refinamiento cristalográfico se realizó usando el programa *Phenix*, mientras que la visualización de los mapas de densidad electrónica se realizó con el programa *COOT*. La visualización de los modelos y el análisis de la estructura y cargas electrostáticas se realizaron con *PyMOL* [185].

3.11. Modelado del acoplamiento del Fab128.1 con el dominio apical del hTfR1

Los servidores ClusPro y Rosetta SnugDock fueron seleccionados para realizar estudios del acoplamiento antígeno-anticuerpo de forma secuencial [186, 187]. Para la carga de los datos en ClusPro v2.0 se definió al PDB del Fab128.1 como "receptor" y al PDB de hTfR1 3KAS como "ligando" usando el modo "anticuerpo". En estudios preliminares, demostramos por mutagénesis dirigida que el segmento que incluye los residuos S324-S368 del dominio apical de hTfR1 es crítico para la unión del anticuerpo ch128.1 [92], por lo que se incluyó en el modelado una máscara de atracción hacia estos residuos que se diseñó con PyMOL incluyendo los residuos de superficie hasta 2,5 Å. Las estructuras de Fab128.1 y hTfR1 con residuos de interfaz definidos se cargaron en el servidor ClusPro v2.0, un programa de acoplamiento de cuerpos rígidos que usa el algoritmo PIPER para encontrar potenciales de interacción apareados y que realiza un ranking en función del nivel de estabilidad, energía de interacción y tamaño de *cluster* de modelos [157, 186, 188].

El modelo de interacción hTfR1 y Fab128.1 mejor ranqueado con ClusPro (Cluster 000) fue utilizado como punto de partida para un posterior modelado con la opción de refinación de acoplamiento local y flexibilización de las cadenas de los bucles de los CDRs de las regiones V_H y V_L utilizando el servidor Rosetta SnugDock [187]. El archivo PDB para el modelado con SnugDock se cargó incluyendo ambos ligandos, pero debido a las limitaciones de capacidad de procesamiento del servidor, solo se incluyeron las secuencias la región V_L (secuencia 1-106) V_H (secuencia 1-118) y el dominio apical de hTfR (secuencia 189-385) separados por una línea TER.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación en un modelo *in vitro* de pseudovirus de la actividad del plasma de pacientes convalecientes de FHA sobre la infección de los Mamarenavirus de las FHS

Las FHS son una familia de graves enfermedades infecciosas que incluyen las Fiebres Hemorrágicas Boliviana, de Chapare, Venezolana, Brasileña y Argentina, y sus agentes etiológicos son los Mamarenavirus MACV, CHA), GTOV, SABV y JUNV, respectivamente. Debido a su capacidad de propagarse de persona a persona, su alta infectividad y mortalidad, constituyen una seria amenaza como potenciales agentes de bioterrorismo, por lo que son clasificados como agentes patógenos de Categoría A por el NIAID de los EE.UU. [4]. A esto se suma que no hay tratamientos eficaces ni vacunas para las FHS causadas por los virus MACV, GTOV, CHAV y SABV [5]. Sólo hay tratamiento para la FHA, la cual consiste en la inmunoterapia pasiva con el plasma de pacientes convalecientes.

Debido a la peligrosidad de este grupo de enfermedades, para trabajar con cepas patogénicas de esta familia de virus se necesitan infraestructura con nivel de bioseguridad nivel 4. Por lo tanto, para poder estudiar a estos virus, es necesario utilizar un modelo no patógeno que permita la manipulación en condiciones estándar de laboratorio. Una opción son los para este tipo de estudios *in vitro* son los modelos de pseudovirus no patogénicos que consten de partículas pseudovirales decoradas con las proteínas del virus que participan en la unión con la célula diana y han sido ampliamente utilizados para estudiar el Ébola [189] y la Malaria [190].

El laboratorio de la Dra. Choe de la Escuela de medicina de Harvard, en Boston EE.UU. nos cedió los vectores para la generación de un modelo de pseudovirus no patogénicos decorados con el complejo de glicoproteínas GP1/GP2 de cada uno de los Mamarenavirus causantes de las FHS: JUNV, MACV, SABV, GTOV y CHAV (ver sección 3.2.1). Estas glicoproteínas son las responsables de la interacción con el hTfR1 sobre la superficie de las células para su internalización y así llevar a cabo la infección. A pesar de que este modelo fue previamente utilizado para estudiar la vía de entrada de los Mamarenavirus patogénicos [71, 92], hasta el momento nunca había sido utilizado con el estándar de tratamiento de la FHA, el plasma de pacientes convalecientes. Por lo tanto utilizamos este modelo para evaluar la internalización de pseudovirus de JUNV, en presencia de diluciones 1:20 a 1:200.000 de plasmas de pacientes convalecientes con títulos de AcNT de 10.240, 320 y 0. Se realizó un ensayo de inhibición de internalización según lo detallado en la sección 3.2.2 y se pudo observar que el tratamiento con plasma de pacientes convalecientes de FHA con título 10.240 y 320 de AcNT previenen hasta 97% la entrada de pseudovirus de JUNV, con valores significativos en diluciones hasta 1:200.000. Sin embargo, la dilución 1:20 del plasma de pacientes convalecientes de FHA con 0 título de AcNT resultó en una inhibición significativa de la internalización aproximada del

30% para toda las diluciones de plasma realizadas (**Figura 23, A**). Por lo tanto, para los estudios de internalización de pseudovirus de JUNV, MACV, GTOV, SABV y CHAV, todos los porcentajes de internalización se normalizaron con respecto al plasma 0 título de AcNT para cada una de las diluciones. En la **Figura 23, B** se muestra como ejemplo la expresión de GFP en las células en donde se internalizaron los pseudovirus de JUNV vs las células que fueron tratadas con la dilución 1/20 del plasma con título 10.240 de AcNT, al microscopio invertido de fluorescencia.

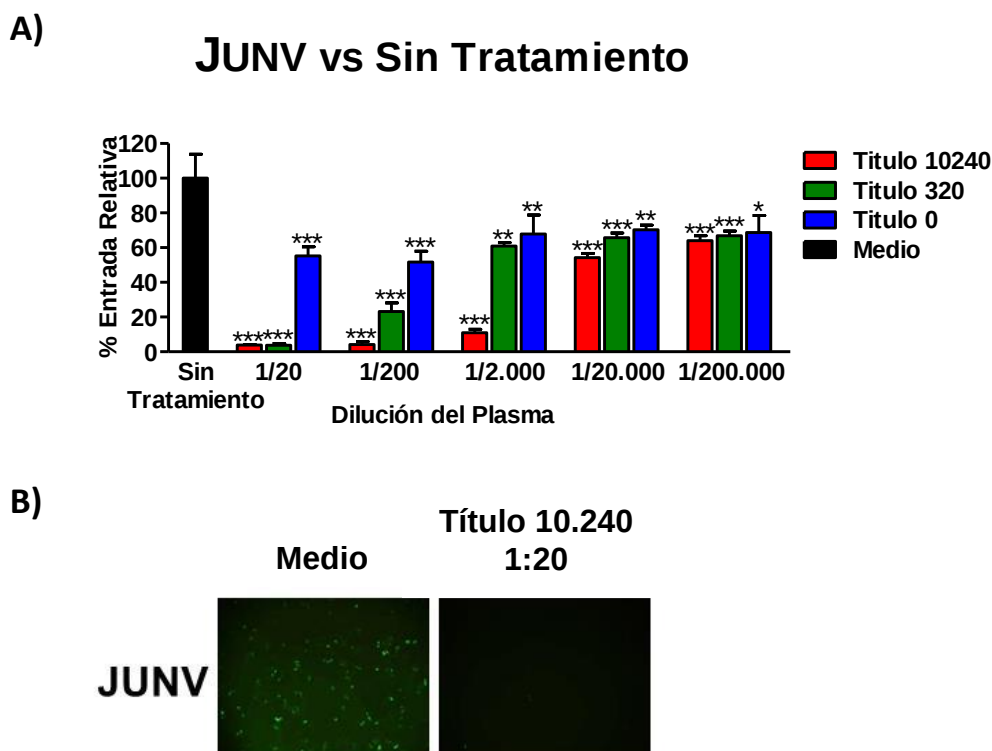


Figura 23. Análisis de la internalización de pseudovirus de JUNV en células HEK-293T en presencia de distintas diluciones de plasma de pacientes convalecientes de FHA. A) Entrada relativa de pseudovirus de JUNV en células HEK-293T en presencia de diluciones 1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000 y 1:200.000 de plasma de pacientes convalecientes de FHA con medio (sin tratamiento) o títulos de 0, 320 y 10.240 de AcNT para FHA. Los datos se expresan como la media $\pm$ Desvío estándar (SD). Los datos fueron normalizados al 100% con respecto a sin tratamiento (medio) y las diferencias significativas se indican comparando plasmas con títulos 0, 320 y 10.240 vs. Sin tratamiento (medio) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Test t de Student para datos no apareados). B) Visualización bajo microscopio de fluorescencia de células HEK-293T tratadas con una dilución 1:20 de plasma de pacientes convalecientes de FHA con título 10.240 de AcNT para FHA o sin tratamiento (medio). En verde se pueden ver las células donde hubo expresión de GFP producto de la internalización de pseudovirus de JUNV.

Como ya se mencionó, los porcentajes de internalización de JUNV se normalizaron con respecto al plasma 0 título de AcNT para cada una de las diluciones y se observó que los plasmas de pacientes convalecientes de FHA con título 10.240 AcNT inhibieron la internalización de los pseudovirus de JUNV de manera significativa hasta diluciones 1/2.000 ($93 \pm 1\%$ a 1/20, $92 \pm 4\%$ a

1/200, y $84 \pm 4\%$ a 1/2.000), mientras que con título de 320 se observaron diferencias significativas hasta diluciones 1/200 ($93 \pm 2\%$ a 1/20, $55 \pm 12\%$ a 1/200) (**Figura 24, A**).

El título de AcNT de FHA en plasmas de pacientes convalecientes se define como: la inversa de la dilución que produce un bloqueo de 80% de la formación de placas (EC_{80}) utilizando células Vero y una cepa atenuada de Junín. Para poder realizar este mismo calculo pero utilizando el modelo de pseudovirus, se representados los resultados como porcentaje de bloqueo ($100 - \text{Porcentaje de internalización relativa}$) y luego se calculó el valor de EC_{80} para cada uno de los plasmas (**Figura 24, B**). De esta forma, se obtuvieron los valores de título de AcNT para FHA con el modelo de pseudovirus. Estos valores fueron de 3.300 AcNT para el plasma 10.240 de AcNT y 76 para el plasma 320.

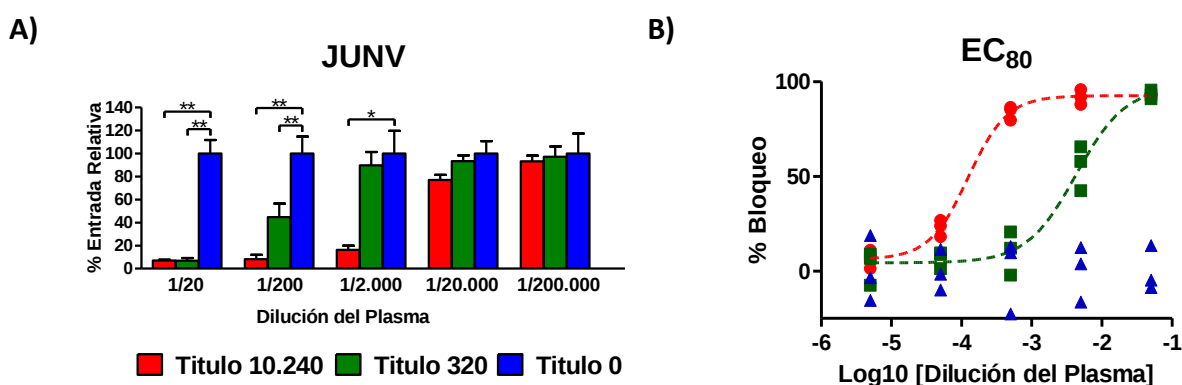
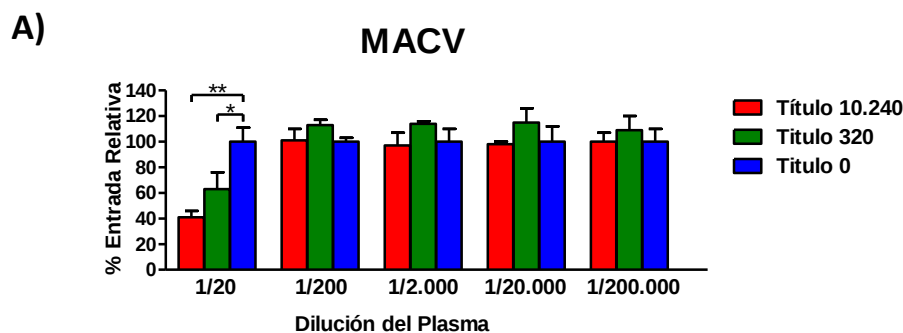
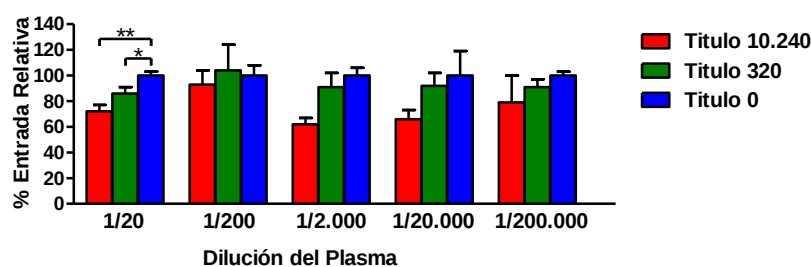


Figura 24. Análisis de la internalización de pseudovirus de JUNV en células HEK-293T en presencia de distintas diluciones de plasma de pacientes convalecientes de FHA. A) Entrada relativa de pseudovirus de JUNV en células HEK-293T en presencia de diluciones 1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000 y 1:200.000 de plasma de pacientes convalecientes de FHA con títulos 0, 320 y 10.240 de AcNT para FHA. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD. Los datos fueron normalizados al 100% con respecto al plasma con título 0. Las diferencias significativas se indican comparando plasmas con títulos 320 y 10.240 vs. Título 0 (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; Test t de Student para datos no apareados). B) Cálculo de EC_{80} para el porcentaje de bloqueo en presencia de plasma inmune de FHA sobre pseudovirus de JUNV. Se presenta cada uno de los triplicados. En líneas punteada se grafican las curvas de ajuste para el cálculo de EC_{80} utilizando GraphPad Prism 5.



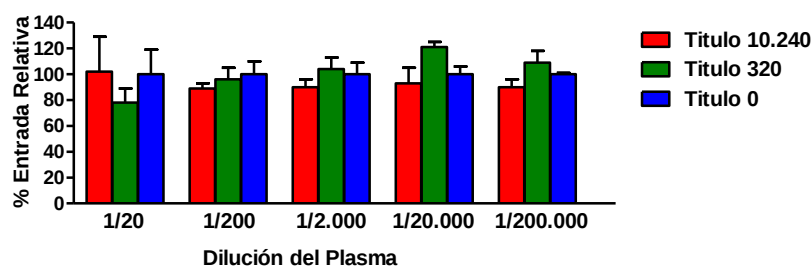
B)

GTOV



C)

CHAV



D)

SABV

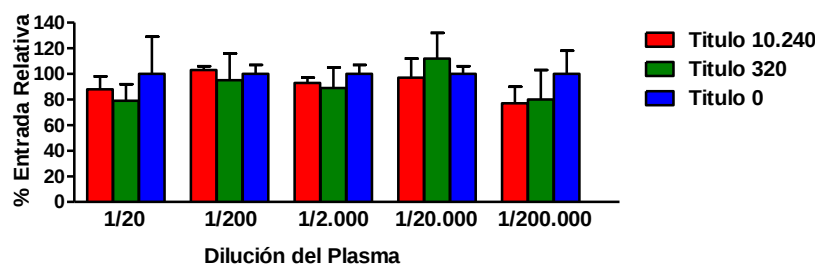


Figura 25. Análisis de la internalización de pseudovirus de MACV, GTOV, CHAV y SABV en células HEK-293T en presencia de distintas diluciones de plasma de pacientes convalecientes de FHA. Entrada relativa de pseudovirus de: Machupo (A) Guanarito (B) Chapare (C) y Sabiá (D), en células HEK-293T en presencia de diluciones 1:20, 1:200, 1:2.000, 1:20.000 y 1:200.000 de plasma de pacientes convalecientes de FHA con títulos de 0, 320 y 10.240 de AcNT para FHA. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD. Los datos fueron normalizados al 100% con respecto al plasma con título 0. Las diferencias significativas se indican comparando plasmas con títulos 320 y 10.240 vs. Título 0 (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; Test t de Student para datos no apareados).

En segundo lugar, se utilizó el modelo de pseudovirus para comparar la actividad cruzada del plasma de pacientes convalecientes de FHA sobre los otros miembros de las FHS. Por lo tanto, se realizó el mismo ensayo de internalización de pseudovirus de JUNV pero esta vez utilizando pseudovirus de MACV, GTOV, CHAV y SABV (**Figura 25**). Para estos casos, la internalización de los pseudovirus de MACV y GTOV mostraron una inhibición significativa sólo para la dilución 1/20 de ambos plasmas (MACV: título 10.240, $59 \pm 5\%$; título 320, $37 \pm 13\%$; GTOV: título 10.240, $28 \pm 5\%$; título 320, $14 \pm 5\%$) (**Figura 25, A y B**). Sin embargo, para los pseudovirus de CHAV y SABV no se observaron diferencias significativas para ninguno de los plasmas en las diluciones ensayadas (**Figura 25, C y D**).

Al igual que con JUNV, se intentaron calcular los valores de IC_{80} de los plasmas con título 10.240 y 320 de AcNT para los pseudovirus de MACV y GTOV. Pero debido a que sólo presentaban inhibición significativa en una sola de las diluciones y a que los efectos observados fueron limitados, no se lograron estimar los valores de IC_{80} para MACV y GTOV en el rango estudiado.

4.1.1. Estudio de secuencia de las glicoproteínas GP1 de los Mamarenavirus de las FHS

Para evaluar si el efecto sobre la internalización de pseudovirus de todos los demás Mamarenavirus distintos a JUNV se encontraba relacionado con la identidad de secuencias de las GP1 de estos con respecto a JUNV; se realizó un alineamiento de las secuencias de las GP1 de JUNV, MACV, GTOV, CHAV y SABV (**Figura 26**). Al calcular los porcentajes de identidad de secuencia de GP1 con respecto a JUNV de cada uno de los Mamarenavirus se observó una identidad de: 46,8% para MACV, 28,4% para GTOV, 28,1% para CHAV y 23,7% para SABV.

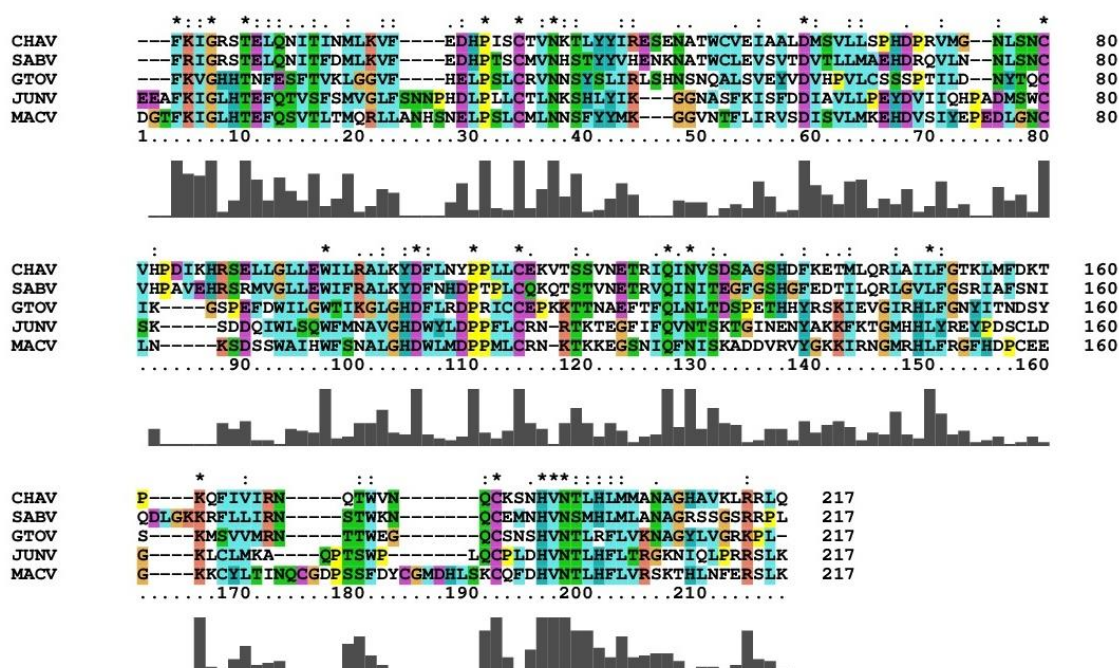


Figura 26. Alineamiento de las secuencias de las GP1 de los Mamarenavirus de las FHS. Se realizó un alineamiento de las secuencias de las GP1 de todos los virus causantes de las FHS: JUNV (P26313 segmento: 59-251), MACV (Q6IU77 segmento: 59-262), GTOV (Q8AYW1 segmento: 59-245), CHAV (B2C4J0 segmento: 59-250) y SABV (Q90037 segmento: 59-254). Las barras del histograma indican el grado de similitud entre los aminoácidos.

4.1.2. Correlación entre el efecto de bloqueo de la internalización y la identidad de secuencia de las GP1 de los Mamarenavirus patógenos

Se estudió la correlación entre la identidad de las secuencias de las glicoproteínas GP1 de MACV, GTOV, CHAV, GTOV con respecto a JUNV y el efecto sobre la internalización de pseudovirus que presentaron en presencia de los plasmas de pacientes convalecientes de FHA. Se pudo observar una significativa correlación lineal negativa al tratar a las células con diluciones 1/20 de plasma de pacientes convalecientes de FHA con título 10.240 y 320 de AcNT (**Figura 27**). Estos resultados sugieren que la disminución en la identidad de la secuencia de las GP1 de MACV, GTOV, CHAV, GTOV con respecto a JUNV, tienen asociada una disminución en el bloqueo por plasma de pacientes de FHA en la entrada de los respectivos pseudovirus.

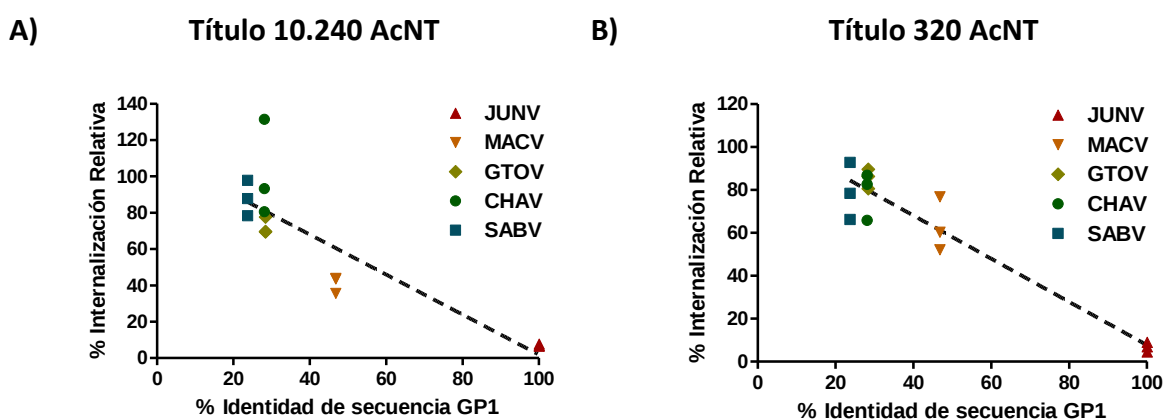


Figura 27. Correlación negativa entre el bloqueo de la internalización de pseudovirus de las FHS en presencia de plasma de pacientes de JUNV y la identidad de secuencia de las GP1 de estos Mamarenavirus patógenos con respecto a la de JUNV. Se muestran los porcentajes de internalización relativa en células HEK-293T tratadas con una dilución 1/20 de plasma de pacientes convalecientes de FHA con título 10.240 (A) y 320 (B) de AcNT. Se representan las regresiones lineales en cada caso (Plasma 10.240, $R^2= 0,770$; Plasma 320, $R^2=0,913$). Correlación de *Pearson* significativa para plasmas 10.240 y 320 (plasma 10.240, $p=0,0275$ y $R^2= 0,843$; Plasma 320, $p=0,0009$ y $R^2=0,983$) calculados utilizando GraphPad Prism 5.

4.2. Generación de un anticuerpo monoclonal derivado del anticuerpo ch128.1 con escasa o nula actividad efectora como terapia dirigida contra las FHS

4.2.1. Desarrollo de un anticuerpo completo con isotipo IgG4 con la región variable del AcM ch128.1 (ch128.1g4) en células de mamífero

Como ya se mencionó en la sección 3.3.2, se disponía de dos versiones de secuencias de ADN codificante para las regiones variables liviana y pesada del AcM 128.1 de ratón contra hTfR1, secuencias Fv2014 y Fv2016. Al realizar la traducción y el alineamiento de dichas secuencias se pudo observar que diferían en algunos aminoácidos. Para la cadena pesada se observó una mutación E89G y una delección en el último residuo del extremo c-terminal; mientras que para la cadena liviana se detectaron 6 mutaciones: A13V, D30R, K38R, S39P, K52N y P79A. Las más importantes serían las que se encuentran en las regiones CDR, que incluyen las posiciones D30R en el CDR_L1 y K52N en el CDR_L2 (Figura 28).

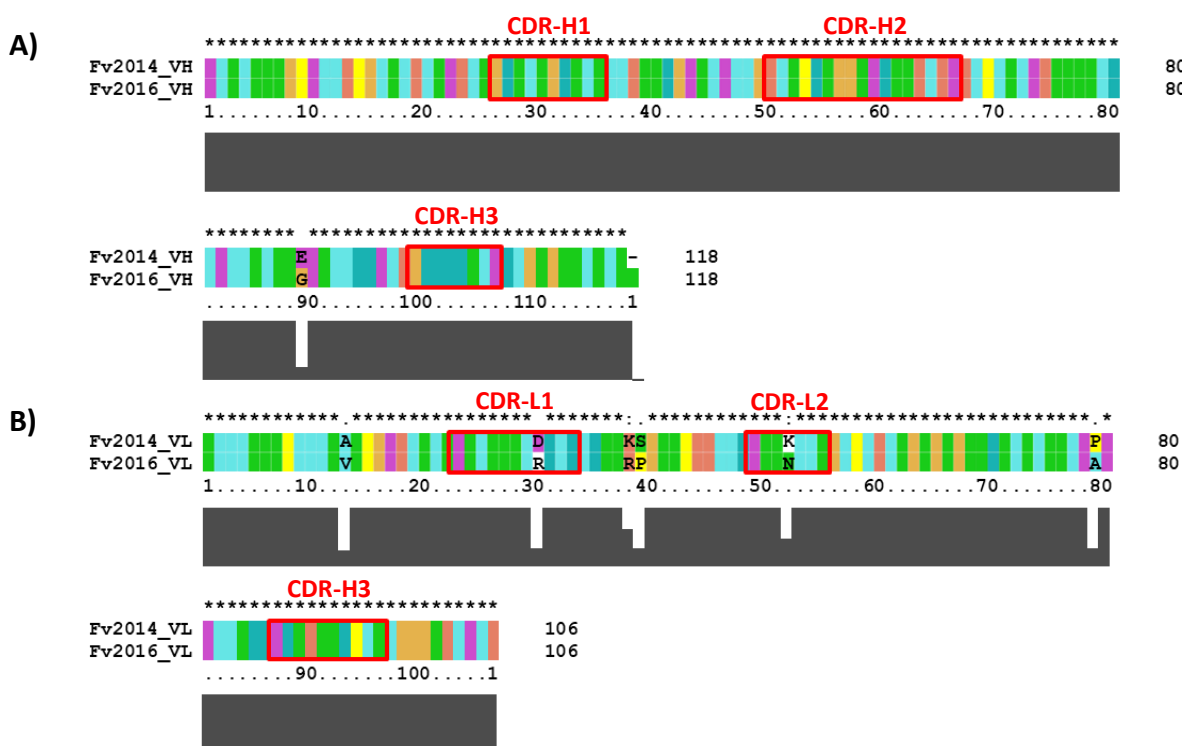


Figura 28. Alineamiento de las dos versiones de secuencias de Fv del anticuerpo ch128.1 (Fv2014 y Fv2016). Se muestra el alineamiento de aminoácidos de las dos secuencias de regiones variables que disponíamos del anticuerpo ch128.1, las secuencias Fv2014 y Fv2016. A) Alineamiento de la región variable de cadena pesada. B) Alineamiento de la región variable de cadena liviana. Por razones de protección de propiedad intelectual solo se muestran los aminoácidos que son distintos entre ambas secuencias. En recuadros rojos se marcan las regiones CDRs: CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, para la cadena pesada; CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, para la cadena liviana.

En primer lugar se optó por realizar un cambio de isotipo del anticuerpo ch128.1 de IgG3 a IgG4, ya que era la alternativa más cercana al anticuerpo de partida. Este cambio de isotipo permitiría disminuir la actividad efectora de ADCC y extender la vida media de una a tres semanas comparada con la IgG3. El anticuerpo llamado ch128.1g4 fue diseñado utilizando la secuencia de región variable murina Fv2014. Debido al origen murino de esta secuencia se realizó la optimización de codones para expresión en células CHO (ver sección 3.4.1). Las secuencias de ADN optimizadas se enviaron a la empresa GenScript (EE.UU.) para su síntesis química junto con los vectores de expresión 6714 pAN y 8228 pAH que contienen la región constante de la cadena pesada de IgG4 y liviana *kappa*, respectivamente, para la expresión del ch128.1g4. Una vez generadas las secuencias de las regiones variables Fv2014, se insertaron en los respectivos vectores y se secuenciaron para corroborar la correcta ligación en GenScript. Posteriormente se realizaron transformaciones de bacterias competentes con los vectores y *minipreps* según lo detallado en la sección 3.4.3. Con el propósito de aumentar la eficiencia en la inserción del ADN en el genoma de las células, se realizó la linealización de los vectores con la enzima de restricción PvuI (**Figura 29**); y finalmente se efectuaron tres co-transfecciones independientes sobre células CHO-K1 utilizando liposomas catiónicos según lo detallado en la sección 3.6.1.2.

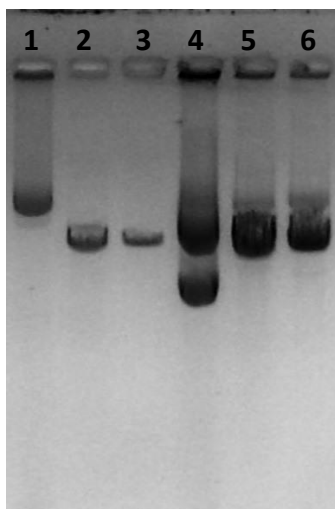


Figura 29. Electroforesis de ADN de los vectores para la expresión del anticuerpo AcM ch128.1g4 con y sin digerir con la enzima de restricción PvuI. Calle 1-3: Vector cadena pesada ch128.1 IgG4; Calle 1: Miniprep del vector, calle 2 y 3: Vector digerido con PvuI 2 y 1 μ l, respectivamente. Calles 4-6: Vector cadena liviana ch128.1 *Kappa*. Calle 4: Miniprep del vector, calle 5 y 6: Vector digerido con PvuI 2 y 1 μ l, respectivamente.

Luego de la co-transfección y selección de las células resistentes a los antibióticos de selección, con el fin de obtener clones se realizó una dilución terminal y se analizaron los sobrenadantes de todos los pocillos donde se observaron *clusters* de células adheridas provenientes de una única célula progenitora. Desafortunadamente, en ninguno de los casos se lograron obtener concentraciones de anticuerpo detectables por ELISA sándwich (**Figura 30**).

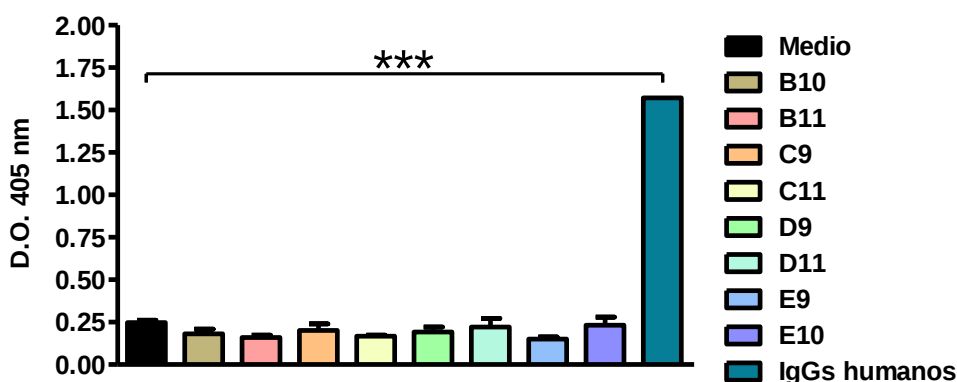


Figura 30. ELISA sándwich para detectar IgGs humanas. Se realizó un ELISA sándwich para determinar la presencia de anticuerpos IgG humanos en los sobrenadantes de los clones obtenidos mediante la co-transfección de células CHO-K1 con los vectores para la expresión de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo ch128.1g4 y una posterior selección y dilución terminal para obtener clones. Se muestra la media $\pm$ SD de un experimento representativo de un total de tres realizados. Las diferencias significativas se indican comparando IgG humanos vs medio (***) $P < 0,001$; Test t de Student para datos no apareados).

Debido a los resultados negativos, al alto costo de producción de anticuerpos completos en células de mamífero con el sistema de expresión que contamos y su baja productividad, se decidió desarrollar fragmentos scFv que contengan la región variable del anticuerpo ch128.1 y que mantenga la especificidad contra hTfR1. Este mini anticuerpo se consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo ch128.1 unidos por un *linker* flexible que las mantiene unidas sin la necesidad del dominio Fc.

4.2.2. Producción de fragmentos scFv con la región variable de ch128.1

Se diseñaron tres secuencias de scFv para su expresión recombinante en bacterias *E. coli*. En la **Figura 31** se muestran los constructos para la generación de estos fragmentos de anticuerpo con las regiones variables del ch128.1 desde su extremo 5' a 3'. Los vectores para la expresión del scFv128.1-2014 fue construida utilizando la secuencia Fv2014, mientras que los vectores para la expresión del scFv128.1-2016 y una proteína de fusión con la Proteína de Unión a Maltosa (MBP) MBP-scFv128.1-2016 fueron diseñadas con la secuencia Fv2016.

Nombre			Secuencia señal		Producto proteico							
1	scFv128.1-2014	5'	PelB	-	-	His	-	TEV site	Variable Pesada'	linker	Variable Liviana'	3'
2	scFv128.1-2016	5'	PelB	-	-	His	-	TEV site	Variable Pesada	linker	Variable Liviana	3'
3	MBP-scFv128.1-2016	5'	-	Trombi na site	MGS	His	MBP	TEV site	Variable Pesada	linker	Variable Liviana	3'

Figura 31. Constructos de expresión de los fragmentos de anticuerpos recombinantes scFv con la región variable del anticuerpo 128.1. ' Secuencias región variable Fv2014

4.2.3. Obtención de sTfR1 humano

Para poder evaluar la especificidad de los anticuerpos contra el hTfR1, se realizó una purificación de sTfR1 recombinante por IMAC y una SEC a partir de sobrenadantes de cultivo de células BHKHis-sTfR1 productoras de sTfR1. En la **Figura 32** se puede observar el cromatograma obtenido luego de la realización de la IMAC y en la **Figura 33** se muestra un SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.

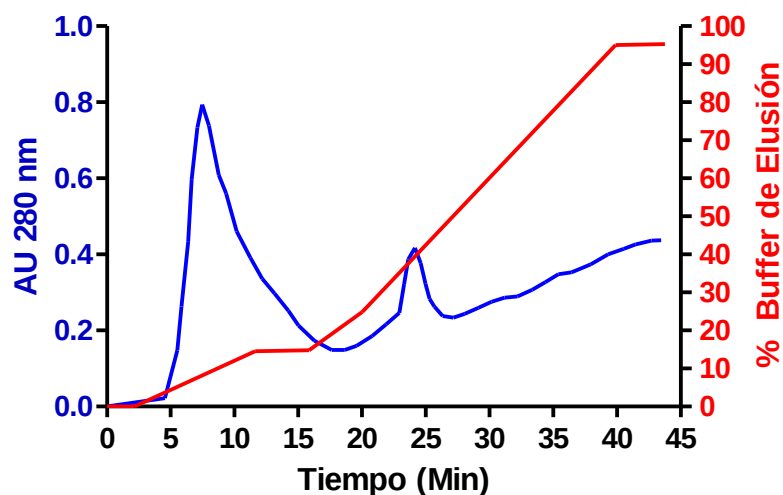


Figura 32. Cromatograma de la purificación de sTfR1 por IMAC. Se muestra los resultados de absorbancia a 280 nm vs tiempo de una purificación por cromatografía de afinidad por iones metálicos (Ni^{+2}) de sTfR1. En azul se muestra las unidades de absorbancia a 280 nm y en rojo la rampa de porcentaje de *buffer* de elución (500 mM de imidazol) utilizados.

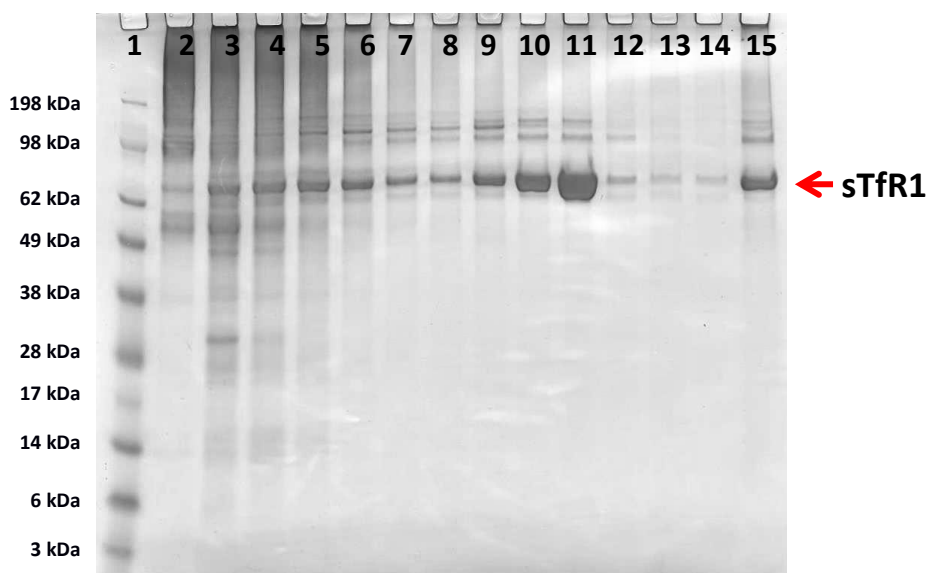


Figura 33. Gel SDS-PAGE (pre-empacado) purificación del sTfR1 por IMAC. Se sembraron las fracciones obtenidas luego de la purificación del sTfR1 por IMAC. Calle 1: marcador de peso molecular (Thermo Scientific); calles 2-9: Lavados: fracciones #1-8; calles 9-11: Eluciones: fracciones #1-5, calle 12: sTfR1 purificado previamente. La flecha roja indica la banda correspondiente al sTfR1.

Con el fin de aumentar la pureza de las fracciones de sTfR1 obtenidas luego de la IMAC, se realizó una SEC de las fracciones que contenían el sTfR1 luego de la elución (**Figura 34**). Se observaron tres picos con diferentes pesos moleculares, de los cuales el último, con una absorbancia a 280 nm de aproximadamente 1600 unidades. Luego de sembrar muestras de las fracciones de la SEC en un SDS-PAGE, se pudo observar que el pico predominante se correspondía con el sTfR1 de forma monomérica, mientras que la fracciones con mayor peso molecular contenía mezclas de la forma monomérica junto con agregados o dímeros del sTfR1 (**Figura 35**).

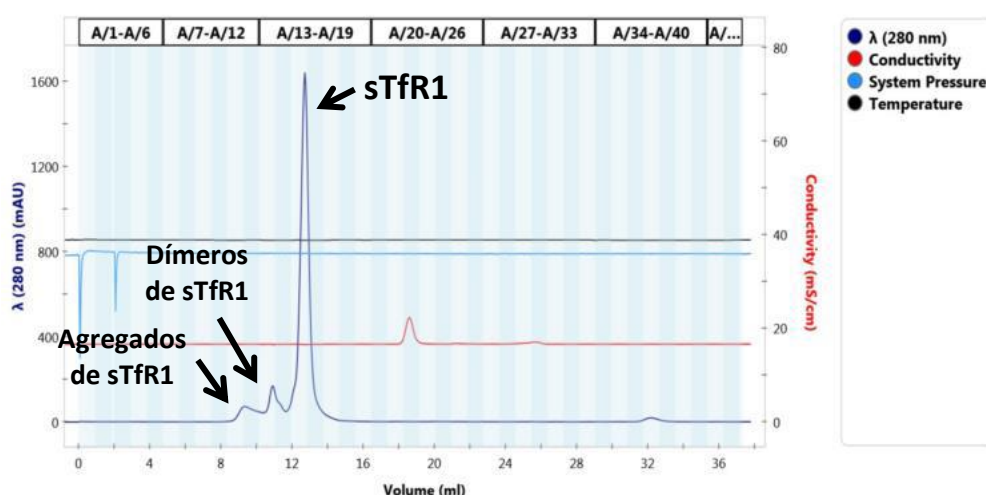


Figura 34. Cromatograma de una purificación de sTfR1 por SEC. Se realizó una SEC como otro paso de purificación sobre las eluciones de la IMAC anterior. Se muestra en azul las unidades de absorbancia a 280 nm, en rojo la conductancia y en celeste la presión del sistema.

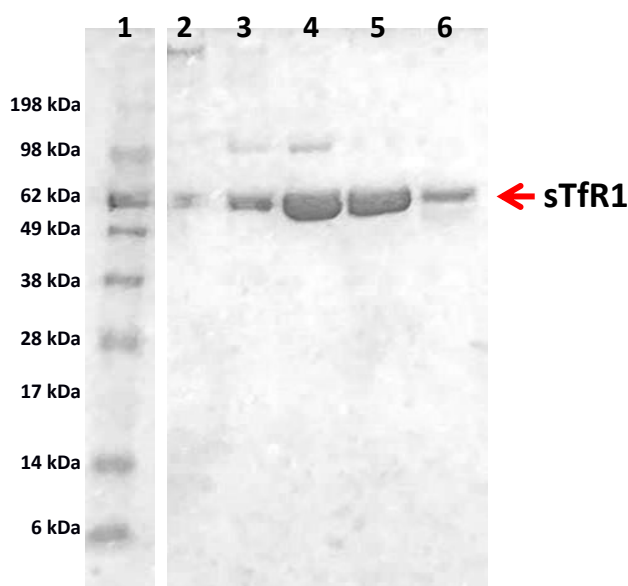


Figura 35. Gel SDS-PAGE (pre-empacado) purificación del sTfR1 por SEC. Se sembraron las fracciones obtenidas luego de la purificación del sTfR1 por SEC. Calle 1: marcador de peso molecular (Thermo Scientific); calles 2: fracción #11; calle 3: fracción #12; calle 4: fracción #13; calle 5: fracción #14; calle 5: fracción #15. La flecha roja indica la banda correspondiente sTfR1.

4.2.4. Desarrollo de scFv128.1-2014 contra el hTfR1 en *E. coli*

Se diseñaron los vectores para la generación del fragmento scFv con la secuencia variable Fv2014 del anticuerpo ch128.1. Para la generación de esta proteína que denominamos scFv128.1-2014 se realizó la optimización de la secuencia de codones de los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de igual forma a la realizada para la expresión en células CHO-K1 pero esta vez para bacterias *E. coli*. El fragmento se diseñó con una secuencia PelB para la expresión en el espacio periplásmico y una secuencia de 6 histidinas para favorecer la purificación mediante IMAC utilizando columnas de níquel (ver **Figura 31**). Además, se empleó un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV (Proteasa del virus del tabaco) para facilitar la liberación de la secuencia de histidinas una vez que la proteína haya sido purificada. La secuencia de nucleótidos fue enviada a GenScript (EE.UU.) para su síntesis química y ligación en un vector de expresión procariota comercial llamado pGS-21a (**Figura 21**, A). Una vez obtenido el vector denominado pGS-21a-scFv128.1-2014 (**Figura 36**) se realizó la transformación en una cepa de clonado *E. coli* JM109, se seleccionaron los clones y luego se realizaron mini preparaciones del vector por lisis alcalina según lo detallado en la sección 3.4.3.

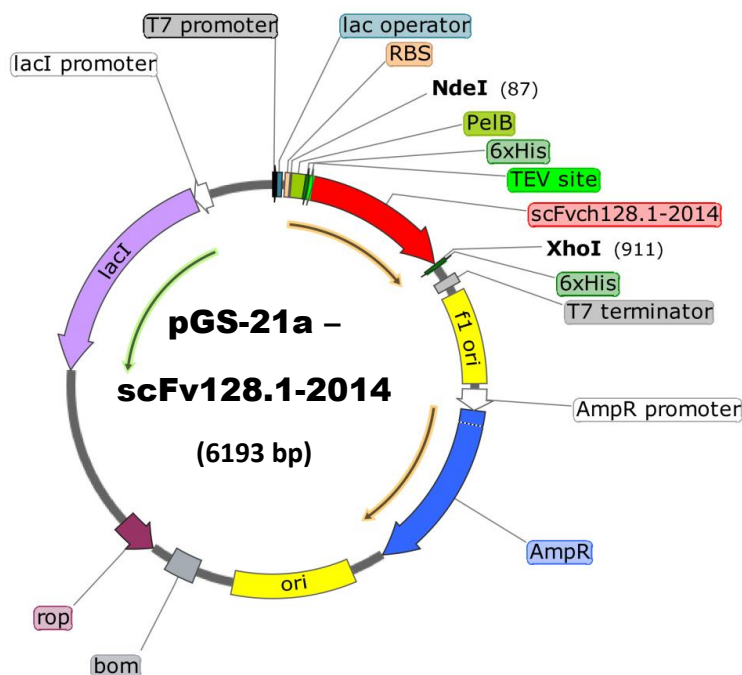


Figura 36. Vector de expresión pGS-21a -scFv128.1-2014 utilizado para la producción del scFv128.1-2014 en *E. coli*. Resistencia a ampicilina (AmpR) y ORF del scFv128.1-2014 (en rojo) bajo un promotor T7 inducible por IPTG.

Bacterias competentes Rosetta2 (DE3) PlysS se transformaron con el vector pGS-21a-scFv128.1-2014 mediante electroporación según lo detallado en la sección 3.4.2.3. Luego de la

selección con el antibiótico se realizó el chequeo de la presencia y sentido de la secuencia del scFv128.1-2014 mediante *colony* PCR. En primer lugar se realizó una PCR en gradiente para poner a punto la reacción de PCR y establecer la mejor temperatura de hibridación. Para ello se utilizó como molde ADN proveniente de una *miniprep* del vector pGS-21a-scFv128.1-2014 (**Figura 37**). Siendo las temperaturas de *melting* de los *primers* 62 y 63°C se evaluaron temperaturas de hibridación de 53.4 a 66.7°C (53,4, 53,4, 55,8, 58,5, 61,4, 64,2 y 66,7°C). Para todas las temperaturas ensayadas se obtuvo una banda predominante alrededor de 400 pb de acuerdo a lo esperado para el fragmento a amplificar con los *primers* diseñados (401 pb), otra levemente mayor a 100 pb y la banda característica de dímeros de *primers* de alrededor de 30 pb (**Figura 37**). Para las temperaturas más bajas se observaron también bandas inespecíficas de 150 pb y 1.000 pb que luego no se observaron al realizar la hibridación a 64,2°C y 66,7, por lo tanto se decidió utilizar una temperatura de 64°C para la hibridación en las *colony* PCR.

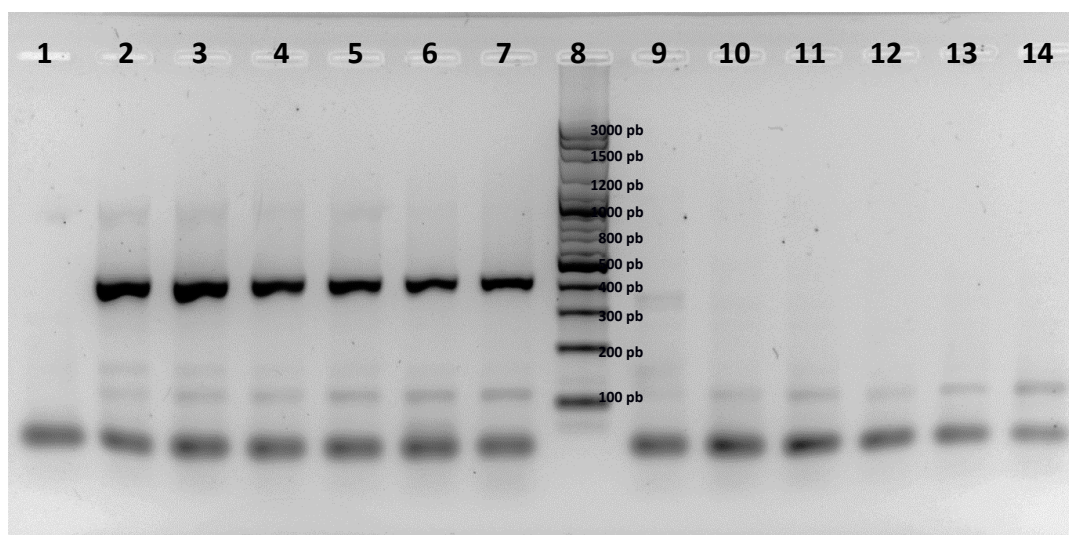


Figura 37. Gel de agarosa, PCR en gradiente. Se realizó una PCR en gradiente para determinar la temperatura de hibridación más conveniente para la amplificación de un segmento de 401 pb sobre *minipreps* de los vectores pGS-21a-scFv128.1-2014 y pGS-21a-sin inserto. Calle 1: control negativo (sin molde), calle 2 a 7: pGS-21a-scFv128.1-2014 utilizando temperatura de hibridación de 53,4, 53,4, 55,8, 58,5, 61,4, 64,2 y 66,7°C; Calle 8: Marcador de peso molecular (100 pb); Calles 9 a 13: controles negativos correspondientes al vector pGS-21a sin inserto a las mismas temperaturas de hibridación mencionadas.

Luego de realizar una *colony* PCR sobre 25 clones de pGS-21a-scFv128.1-2014 resistentes al factor de selección, se obtuvo amplificación del fragmento de ADN de 401 pb, de acuerdo a lo esperado según los *primers* diseñados, en 22 de ellos (**Figura 38**).

Una vez seleccionado el clon pGS-21a-scFv128.1-2014 clon 1, se realizaron ensayos de expresión de scFv128.1-2014 a distintas temperaturas de inducción: 32, 28 y 21°C para favorecer la producción de proteína en forma soluble con un alto rendimiento. Se pudo observar que para todas estas temperaturas la expresión de la proteína se presentó como cuerpos de inclusión debido a que la misma se encontraba en el *pellet* de las bacterias sonicadas luego de la inducción y la clarificación por centrifugación. Únicamente cuando se realizó la inducción a 16°C se logró obtener proteína soluble en el sobrenadante de las bacterias sonicadas. Por lo tanto, esta temperatura fue la utilizada posteriormente para expresar el scFv128.1-2014.

La purificación de la proteína se realizó mediante IMAC utilizando una columna de níquel utilizando soluciones a pH 7,4. Al sembrar muestras de las eluciones obtenidas en un gel SDS-PAGE, se observó una banda predominante del peso molecular esperado en 29 kDa para el scFv128.1-2014 junto con otra contaminante de mayor peso molecular (**Figura 39**).

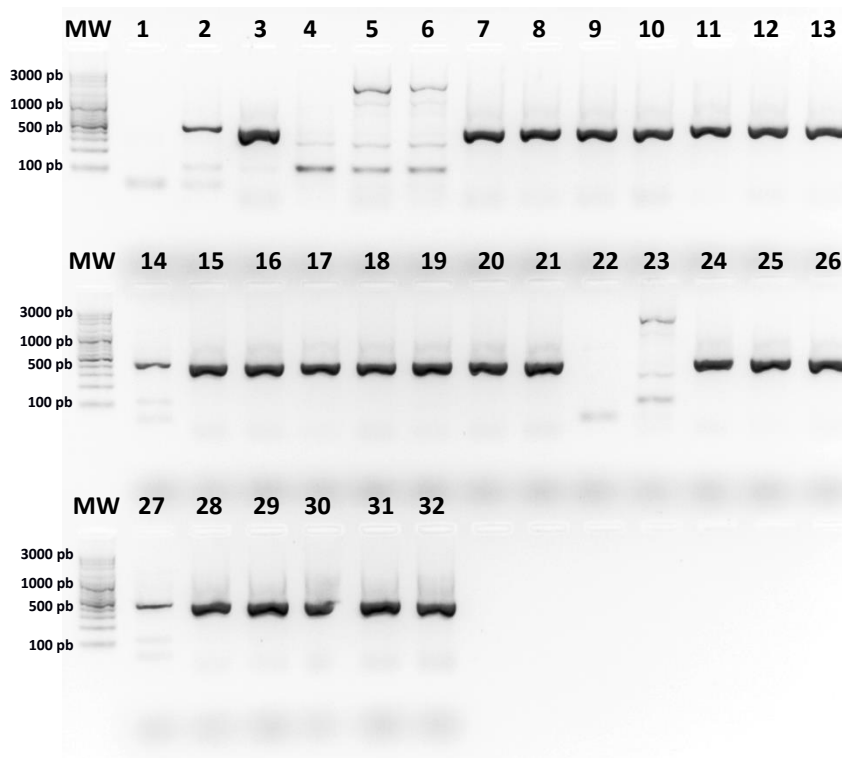


Figura 38. Colony PCR sobre *E. coli* Rosetta2 (DE3) PlysS - pGS-21a-scFv128.1-2014. MW: marcador de peso molecular (100 pb); calle 1: control negativo (agua); calle 2: Miniprep JM109 sc128.1-2014 Clon 4; calle 3: Colonia JM109 sc128.1-2014 Clon 4; calle 4: Colonia Rosetta2 WT; calle 5: Rosetta2 DE3 PlysS + pGS-21a vacío; calle 6: Rosetta2 DE3 PlysS + pGS-21a sin inserto; calle 7-13: Rosetta2 DE3 PlysS + pGS-21a con sc128.1-2014 clones 1 a 7; calle 14: Miniprep JM109 scFv128.1-2014 Clon 4; calle 15 a 26: Rosetta2 DE3 PlysS + pGS-21a con scFv128.1-2014 clones 8 a 19; calle 27: Miniprep JM109 sc128.1-2014; calle 28 a 32: Rosetta2 DE3 PlysS + pGS-21a con scFv128.1-2014 clones 26 a 30.

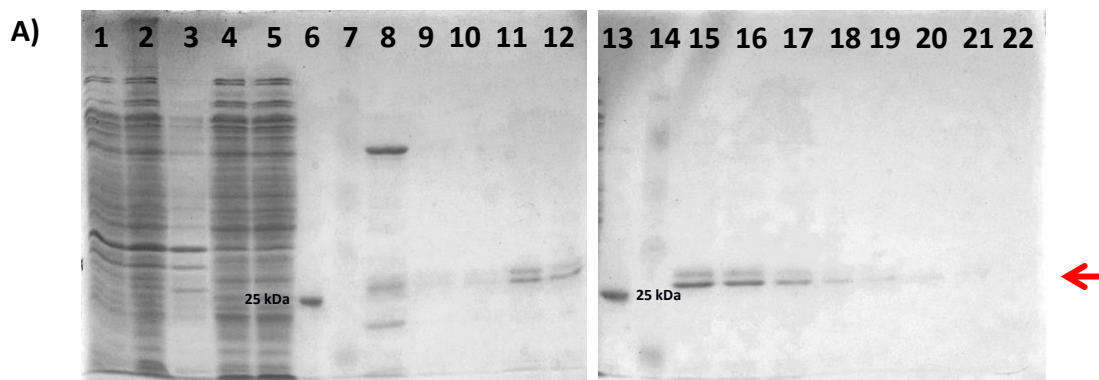


Figura 39. Gel SDS-PAGE de la expresión de scFv128.1-2014 en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) C41 y purificación por IMAC. A) Calle 1: Cultivo sin inducir 2: Cultivo inducido; 3: *Pellet* sonificado; 4: Sobrenadante del sonificado; 5: No retenido en la columna de níquel; 6: TEV; 7: Marcador de peso molecular; 8-10 Lavados # 1-3 con 60 mM Imidazol; 11-12: Lavados #1-2 con 100 mM de Imidazol; 13: TEV; 14: Marcador de peso molecular; 15-22: Eluciones # 1-8. La posición que se correspondería con el scFv128.1-2014 se indica con una flecha roja.

Las fracciones de las eluciones obtenidas luego de la purificación por IMAC del scFv128.1-2014 se guardaron a 4°C durante 48 h. Pasado este tiempo se pudo observar un precipitado de color blanco en todas las fracciones. Estas fueron centrifugadas, y una muestra del sobrenadante y del *pellet* fueron corridas en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se observó que el *pellet* correspondía a la banda de aproximadamente 29 kDa del scFv128.1-2014, mientras que en el sobrenadante no se detectó ninguna banda (**Figura 40**).

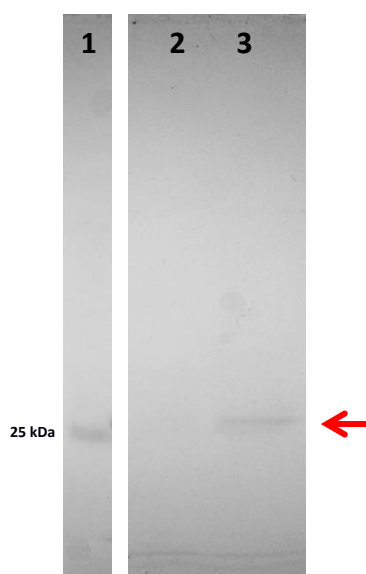


Figura 40. Gel SDS-PAGE agregados en la solución de scFv128.1-2014. Luego de centrifugar la solución de scFv128.1-2014 conteniendo agregados de color blanco se corrieron en un SDS-PAGE: Calle 1: TEV (25 kDa); Calle 2: Sobrenadante; Calle 3: *Pellet*.

Debido a esto, se realizó un análisis *in silico* del pI de la proteína y se determinó que el pI promedio para el scFv128.1-2014 sería de 7,6 (**Figura 42**), muy cerca del pH 7,4 que se había utilizado en los *buffers* para la purificación de la proteína. Por lo tanto se realizó una nueva purificación pero esta vez utilizando las soluciones a pH 6,5. Las eluciones se guardaron a 4°C durante 4 días. En esta ocasión se pudo observar ningún precipitado en la solución por lo que toda la proteína se encontraba de forma soluble en el sobrenadante. Por lo tanto se juntaron todas las fracciones, se realizó una diálisis para disminuir la concentración de imidazol de la solución de scFv128.1-2014 y se realizaron ensayos para determinar si la proteína era capaz de unirse específicamente a sTfR1. Para ello, se realizó un ELISA *sándwich* competitivo decorando las placas con sTfR1 e incubando en primer lugar con 300 nM scFv128.1-2014 y luego adicionando 10 nM ch128.1 o PBS utilizando para el revelado un anticuerpo anti-human *Kappa*. Se pudo observar que el scFv128.1-2014 no inhibió la unión del ch128.1 al sTfR1 por lo que la proteína scFv128.1-2014 no presentaría especificidad contra el sTfR1 (**Figura 41**). Esto sugiere que las diferencias en la secuencia Fv2014 con respecto a la Fv2016, aunque muy pocas, afectarían de forma dramática la especificidad por el hTfR1. Por lo tanto se decidió realizar la expresión del scFv utilizando la otra secuencia disponible del anticuerpo ch128.1, el Fv2016 (ver sección 3.3.2).

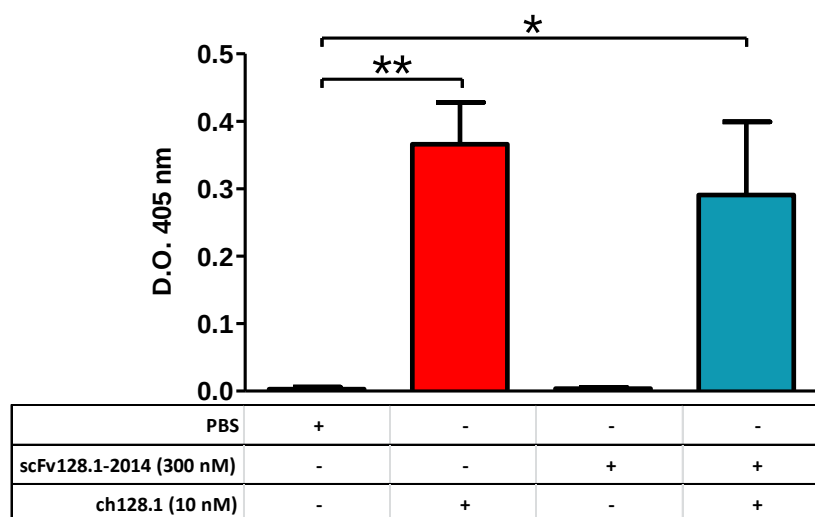


Figura 41. ELISA sándwich competitivo scFv128.1-2014 y ch128.1. Se realizó un ELISA sándwich competitivo decorando la placa con sTfR1 y luego incubando con scFv128.1-2014 (300 nM) o PBS durante 1 hora y posteriormente se adicionó 1 volumen de una solución de ch128.1 (10 nM). La placa fue revelada mediante un anticuerpo anti-*kappa* humano conjugado a PA. Se muestra la media $\pm$ desvío estándar. Las diferencias significativas se indican comparando cada tratamiento vs PBS (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; Test t de Student para datos no apareados).

4.2.5. Estudio del pI de las proteínas recombinantes con región variable del AcM ch128.1

Para evitar el agregado de las proteínas recombinantes debido a la purificación utilizando soluciones con un pH muy cercano al pI, lo que podría afectar su solubilidad a lo largo del proceso, se realizó el estudio de los puntos isoelectricos de todas las proteínas recombinantes diseñadas con las secuencias de la región variable del anticuerpo ch128.1. En la **TABLA 7** se muestran los valores de pI según cada una de las bases de datos utilizadas. Se pudo encontrar que el promedio de los valores de pI fueron de: 7,30 para el scFv128.1-2014, 8,0 para el scFv128.1-2016 y 6,25 para el MBP-scFv128.1-2016 (**Figura 42**).

Base de datos	scFv128.1- 2014	scFv128.1- 2016	MBP-scFv128.1- 2016
IPC protein	6,81	7,49	5,84
IPC peptide	7,35	8,18	6,11
Toseland	6,90	7,28	6,28
Thurkill	7,60	8,17	6,56
Nozaki_Tan	7,46	8,31	6,36
Dawson	7,29	8,06	6,09
DTASelect	7,57	8,15	6,55
EMBOSS	7,65	8,29	6,52
Grimsley	7,03	7,36	6,46
Rodwell	7,28	8,05	6,08
Sillero	7,67	8,43	6,46
Solomon	7,35	8,19	6,10
Lehninger	7,35	8,20	6,09
Wikipedia	7,27	8,01	6,10
ProMoST	7,33	8,09	6,27

TABLA 7. Estudio del pI de todas las proteínas recombinantes diseñadas con región variable del AcM ch128.1. Se muestran todos los valores de pI acorde las diferentes bases de datos utilizadas para realizar el cálculo, de cada una de las proteínas recombinantes diseñadas con región variable del AcM ch128.1.

Un problema en la digestión de fragmentos en proteínas recombinantes, es la agregación del péptido resultante debido al cambio del pI con respecto a la proteína sin digerir. Por lo tanto, además se realizó el mismo estudio realizado anteriormente pero esta vez con las secuencias de las proteínas digeridas con la proteasa TEV (**TABLA 8**). Se pudo determinar que el promedio de los valores de pI para las proteínas digeridas fueron de: 7,60 para el scFv128.1-2014, 8,2 para el scFv128.1-2016 y 8,2 para el MBP-scFv128.1-2016 (**Figura 42**).

Base de datos	scFv128.1- 2014	scFv128.1- 2016	MBP-scFv128.1- 2016
IPC protein	7,09	7,77	7,77
IPC peptide	7,78	8,48	8,48
Toseland	6,84	7,43	7,43
Thurkill	7,81	8,39	8,39
Nozaki_Tan	7,84	8,57	8,57
Dawson	7,68	8,33	8,33
DTASelect	7,78	8,37	8,37
EMBOSS	7,92	8,53	8,53
Grimsley	6,90	7,40	7,40
Rodwell	7,66	8,33	8,33
Sillero	8,06	8,67	8,67
Solomon	7,79	8,49	8,49
Lehninger	7,80	8,48	8,48
Wikipedia	7,62	8,30	8,30
ProMoST	7,85	8,37	8,37

TABLA 8. Estudio del pI de todas las proteínas recombinantes diseñadas con región variable del AcM ch128.1 luego de la digestión con la proteasa TEV. Se muestran todos los valores de pI acorde las diferentes bases de datos utilizadas para realizar el cálculo, de cada una de las proteínas recombinantes diseñadas con región variable del AcM ch128.1 luego de la digestión con la proteasa TEV.

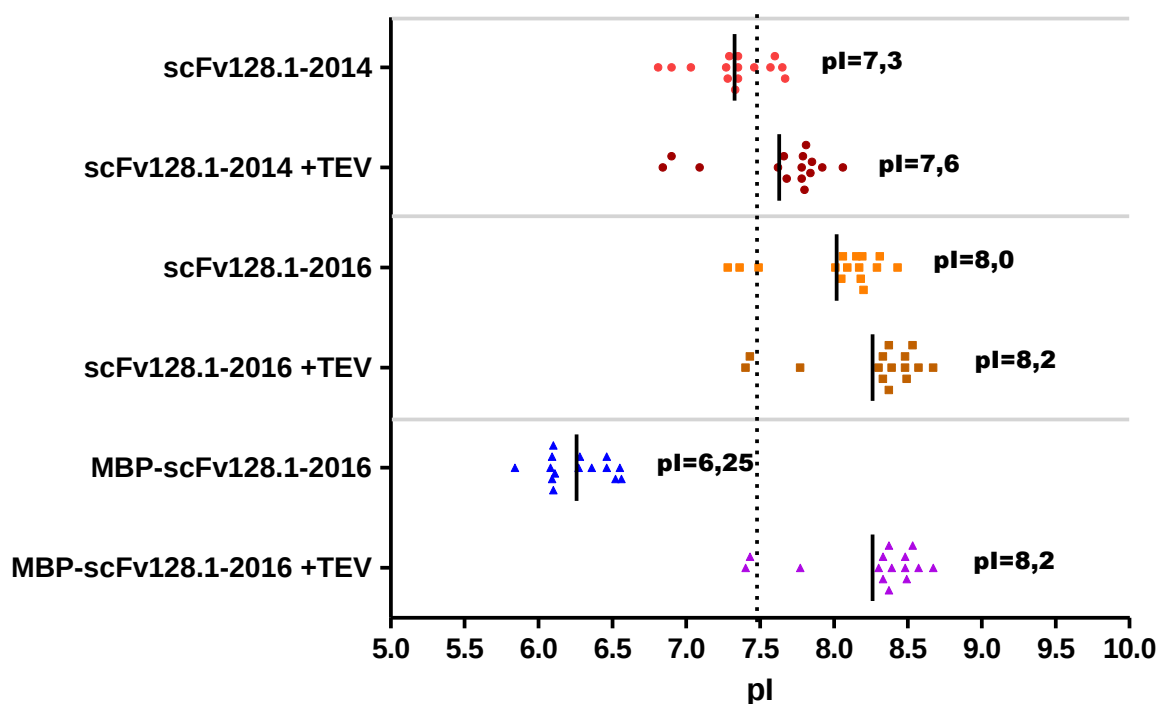


Figura 42. Estudio del pI de las proteínas recombinantes diseñadas con región variable del anticuerpo ch128.1 sin digerir y digeridas con la proteasa TEV. Se muestran todos los valores de pI acorde las diferentes bases de datos para cada una de las proteínas recombinantes con región variable del AcM ch128.1 digeridas o no con la proteasa TEV. Con una línea negra se muestra la media y se señala el valor del pI en cada caso.

De acuerdo a estos resultados y considerando que el pH óptimo para garantizar la estabilidad de carga de la proteína en solución es de una unidad con respecto a su valor estimado del pI, en la **TABLA 9** se muestran los valores de pH a utilizar para realizar las soluciones para cada una de las purificaciones de las distintas proteínas recombinantes con la región variable del AcM ch128.1.

Sin secuencia señal					
	Nombre	aa	PM (kDa)	pI	pH para Purificación
1	scFv128.1-2014	251	29.28	7.30	6.5
2	scFv128.1-2016	252	29.37	7.99	7.0
3	MBP-scFv128.1-2016	635	74.10	6.25	7.5

TABLA 9. Valores promedio de pI y pH de los buffers a utilizar en las purificaciones de las proteínas recombinantes con las regiones variables del AcM ch128.1. Se detallan las medias de los pI y los valores de pH a utilizar en la purificación considerando una diferencia de 1 punto con respecto a su valor de pI calculado; para todas las proteínas recombinantes (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016, MBP-scFv128.1-2016).

4.2.6. Desarrollo de scFv128.1-2016 en *E. coli*

Al igual que con scfv128.1-2014, la secuencia de codones del Fv2016 fue optimizada para la expresión en bacterias *E. Coli* y luego fueron enviadas a GenScript (EE.UU.) para su síntesis química y ligación en el vector de expresión procariota comercial pGS-21a (**Figura 21, A**). Una vez obtenido el vector con el inserto, llamado pGS-21a–scFv128.1-2016 (**Figura 43**) se procedió a realizar la transformación en bacterias *E. coli* JM109, se seleccionaron los clones y luego se realizaron *minipreps* del vector por lisis alcalina según lo detallado en la sección 3.4.3.

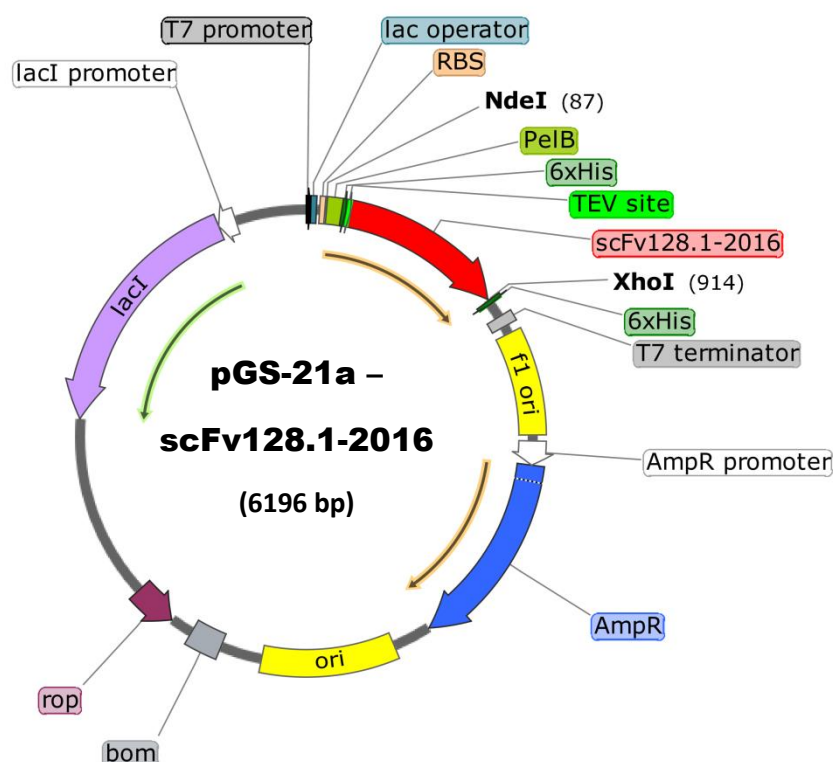


Figura 43. Vector de expresión pGS-21a - scFv128.1-2016, utilizado para la producción del scFv128.1-2016. Resistencia a ampicilina (AmpR) y ORF del scFv128.1-2016 (en rojo) bajo un promotor T7 inducible por IPTG.

Se realizó la transformación de bacterias competentes BL21 (DE3) C41 con el vector pGS-21a-scFv128.1-2016 según lo detallado en la sección 3.4.2.4 y se realizaron ensayos de expresión de scFv128.1-2016 a 16°C sobre 10 clones transformados con el vector de expresión y seleccionados con el factor de selección. Esta temperatura de inducción fue la utilizada para expresar el scFv128.1-2014 en forma soluble. Se tomaron muestras de cultivos líquidos de bacterias inducidas y sin inducir de cada clon y se corrieron en un SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se pudo observar que 8 de los 10 clones inducidos para el scFv128.1-2016 presentaban expresión de una proteína del peso molecular esperado de aproximadamente 29 kDa, comparando con el mismo cultivo sin inducir (Figura 44).

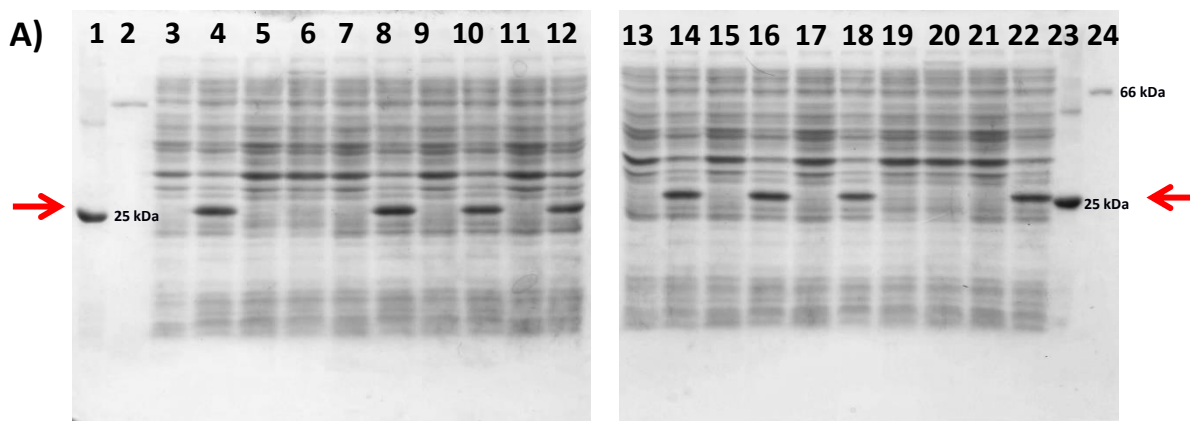


Figura 44. SDS-PAGE de un ensayo de expresión de clones BL21 (DE3) C41 transformados con el vector de expresión para la síntesis del scFv128.1-2016. A) Calle 1: TEV (25 kDa); 2: BSA (66 kDa); 3-4: Clon 1 sin inducir, inducido; 5-6: Clon 2 sin inducir, inducido; 7-8: Clon 3 sin inducir, inducido; 9-10: Clon 4 sin inducir, inducido; 11-12: Clon 5 sin inducir, inducido; Calles 13-14: Clon 6 sin inducir, inducido; 15-16: Clon 7 sin inducir, inducido; 17-18: Clon 8 sin inducir, inducido; 19-20: Clon 9 sin inducir, inducido; 21-22: Clon 10 sin inducir, inducido; 23: TEV (25 kDa); 24: BSA (66 kDa). La posición que se correspondería con el scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

Se realizó un cultivo de bacterias BL21 (DE3) C41 clon 3 productoras de scFv128.1-2016 y se efectuó la inducción a 16°C. Para realizar la purificación de la proteína recombinante se utilizó IMAC utilizando columnas de níquel y se pudo observar por SDS-PAGE que en las fracciones eluidas aparecían varias bandas de distintos pesos moleculares cercanos al de scFv128.1-2016 pero sin lograr obtener una banda clara y definida con el peso molecular esperado (**Figura 45**). También se observó que en las condiciones de cultivo empleadas se producía la proteína recombinante en alta cantidad como cuerpos de inclusión y con un elevado grado de pureza con respecto a la fracción soluble (Calle 3: **Figura 45**, A).

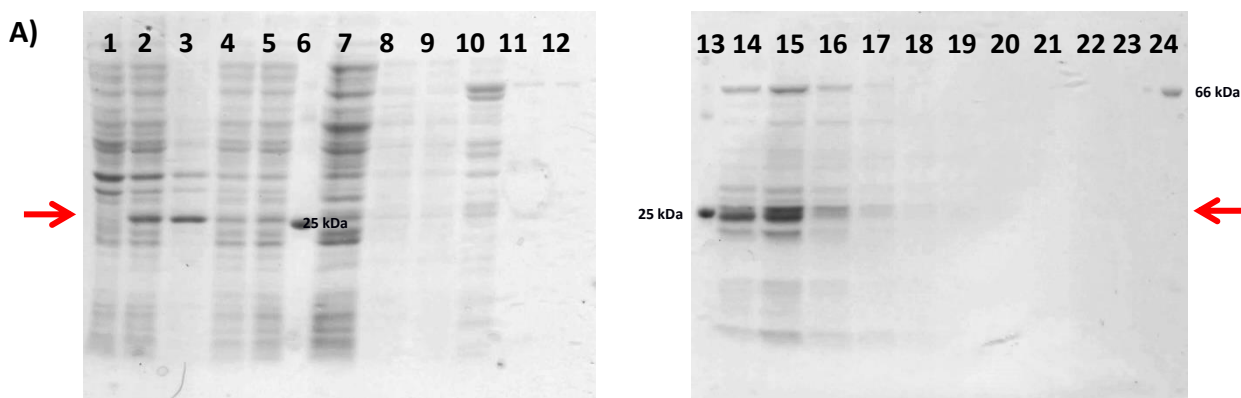


Figura 45. SDS-PAGE de una purificación de scFv128.1-2016 por IMAC. A) Calles 1: Cultivo sin inducir 2: cultivo inducido; 3: *Pellet* del sonicado; 4: Sobrenadante del sonicado; 5: No retenido en la columna de IMAC; 6: TEV

(25 kDa); 7-12: Lavados; Calles 13: TEV (25 kDa); 14 a 23: Eluciones 1 a 10; 24: BSA (66 kDa). La posición que se correspondería con el scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

Por lo tanto, se decidió evaluar la posibilidad de purificar el scFv128.1-2016 a partir de cuerpos de inclusión. Para ello, se realizó la inducción a 37°C para obtener mayores niveles de expresión. Luego de realizar la inducción se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 24 h) y se pudo observar que la concentración de proteína expresada fue en aumento hasta las 4 h de inducción. A las 24 h la concentración de proteína recombinante disminuyó y pudieron observarse otras bandas de proteínas que aumentaron su expresión, probablemente de proteínas que se producen como productos metabólicos o de degradación de la recombinante (**Figura 46, A**). A las 5 h de inducción el cultivo fue centrifugado y las bacterias fueron lisadas por sonicación. Posteriormente luego de centrifugar y correr en un SDS-PAGE la fracción soluble y el *pellet*, se observó que todo el scFv128.1-2016 se encontraba en forma insoluble en el *pellet* (cuerpos de inclusión) (**Figura 46, B**). Luego, el *pellet* fue lavado y solubilizado utilizando una solución 8 M de urea según lo detallado en la sección 3.6.3.4, observándose una completa solubilización de los cuerpos de inclusión (**Figura 46, B**).

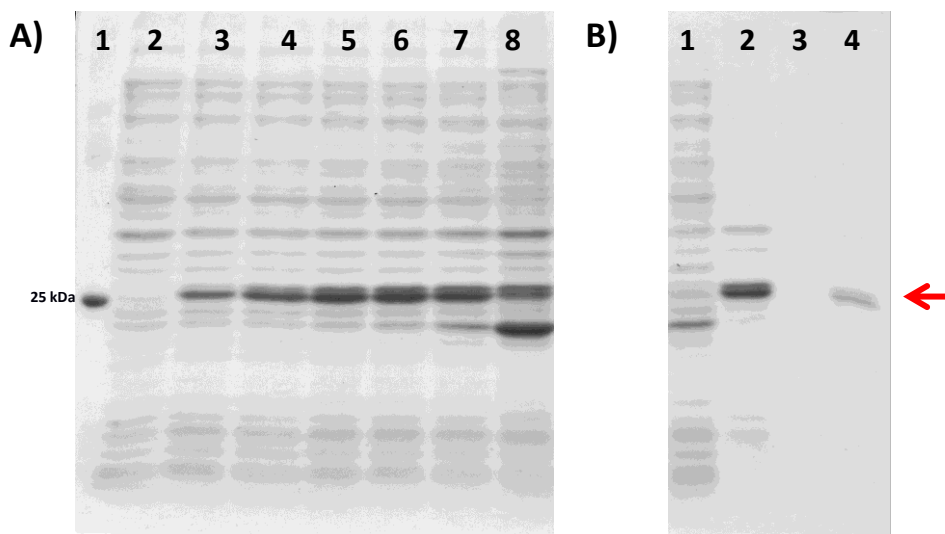


Figura 46. SDS-PAGE de muestras de bacterias BL21 (DE3) C41 clon 3 productoras de scFv128.1-2016. A) Muestras de cultivos con distintos tiempos de inducción. Calle 1: TEV (25 kDa); calle 2: antes de la inducción; calle 3: 1 h; calle 4: 2 h; calle 5: 3 h; calle 6: 4 h; calle 7: 5 h; calle 8: 24 h. B) Luego de la solubilización de los cuerpos de inclusión. Calle 1: Sobrenadante del sonicado; calle 2: *pellet* del sonicado; calle 3: Sobrenadante Lavado *pellet* #1 2M urea; calle 4: *Pellet* solubilizado 8 M urea. La banda que se correspondería con el scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

Se intentó realizar la renaturalización de la fracción solubilizada de los cuerpos de inclusión del scFv128.1-2016 manteniendo la proteína inmovilizada en la columna de níquel y reduciendo la concentración de urea [191]. Desafortunadamente, en este caso al bajar la concentración de urea la

proteína se agregó dentro de la columna, por lo que no se detectó proteína soluble por SDS-PAGE en la posterior elusión (datos no mostrados).

Dado que en la columna no se logró purificar y renaturalizar el scFv128.1-2016 al mismo tiempo, se realizó en primer lugar una purificación en condiciones desnaturalizantes por IMAC y posteriormente una renaturalización mediante la disminución de la concentración de urea por diálisis. Para esto se realizó un nuevo cultivo y se solubilizaron los cuerpos de inclusión de scFv128.1-2016 utilizando los mismos procedimientos antes descriptos y luego se purificó mediante IMAC en condiciones desnaturalizantes utilizando todas las soluciones con 8 M urea (**Figura 47**).

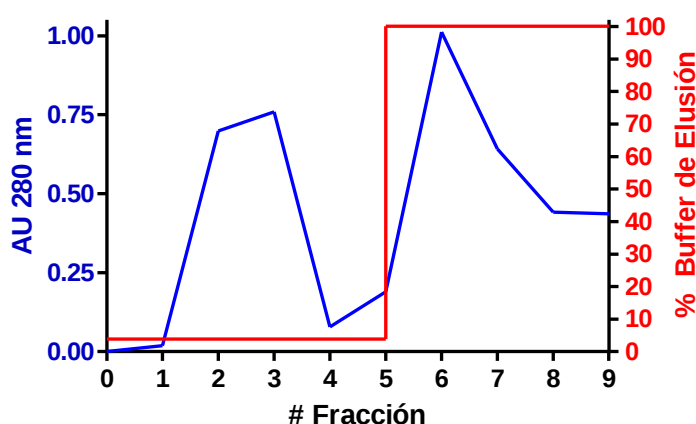


Figura 47. Cromatograma de una purificación por IMAC del scFv128.1-2016 en condiciones desnaturalizantes. Se muestra una de las purificaciones del anticuerpo scFv128.1-2016 por IMAC, utilizando una columna de níquel en condiciones desnaturalizantes con soluciones 8 M de urea. En azul se muestra las unidades de absorbancia de 280 nm y en rojo la rampa del porcentaje de *buffer* de elusión (500 mM de imidazol) utilizados.

En la **Figura 48** se muestra un SDS-PAGE donde se corrieron muestras de las fracciones luego de la purificación por IMAC del scFv128.1-2016 desnaturalizado. Se pudo observar un aumento en la pureza de la fracción de scFv128.1-2016 debido a que, en las eluciones, solo quedan algunas proteínas de bajo peso molecular mientras que antes de la purificación también se observaban bandas de proteínas contaminantes de mayor peso molecular. Luego se realizó la renaturalización de los cuerpos de inclusión mediante la dilución de la urea utilizando diálisis. En este caso, también pudo observarse que el scFv128.1-2016 se agregó luego de la diálisis debido a que luego de centrifugar no fue posible detectar por SDS-PAGE la banda correspondiente a la proteína soluble en el sobrenadante (**Figura 49**).

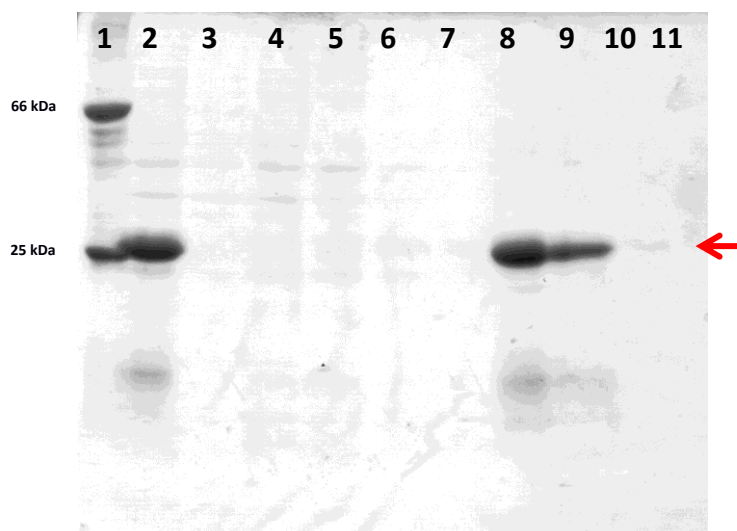


Figura 48. SDS-PAGE de una purificación de cuerpos de inclusión del scFv128.1-2016 por IMAC. Calles 1: TEV (25 kDa) + BSA (66 kDa); calle 2: Cuerpos de inclusión solubilizados antes de inyectarse en la columna; calles 3-7: Lavados con 20 mM de Imidazol; calles 8 a 11: eluciones. La banda que se correspondería al scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

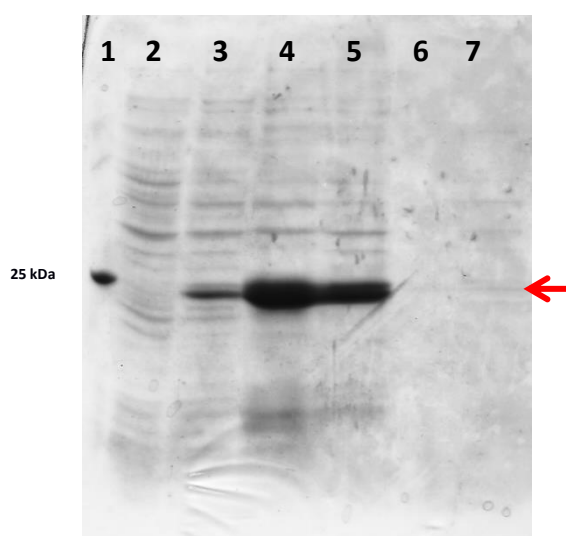


Figura 49. SDS-PAGE de la renaturalización de cuerpos de inclusión de scFv128.1-2016 mediante diálisis. Calle 1: TEV (25 kDa); calle 2: Sin inducir; calle 3: Inducido; calle 4: Antes de dializar; 5: *Pellet* dializado, calle 6: Sobrenadante dializado, calle 7: Sobrenadante dializado concentrado. La banda que se correspondería al scFv128.1-2016 se marca con una flecha roja.

Debido a las dificultades para producir el scFv128.1-2016 soluble con alto rendimiento y pureza, y sumado a que no fue posible la renaturalización de la proteína a partir de cuerpos de inclusión, se decidió sintetizar una proteína de fusión del scFv128.1-2016 con un segmento de unión a maltosa (MBP). Este constructo está descrito como estrategia para aumentar la solubilidad y estabilidad de la proteína recombinante [192]. Además, al existir columnas de purificación con unión

a MBP brindan un paso más de purificación para aumentar la probabilidad de llegar a una solución de proteína recombinante más pura. A diferencia de las proteínas scFv128.1-2014 y scFv128.1-2016, la proteína MBP-scFv128.1-2016 se expresa en el citoplasma de las bacterias.

4.2.7. Desarrollo de la proteína de fusión MBP-scFv128.1-2016 en *E. coli*

Como se mencionó anteriormente, con el fin de aumentar la solubilidad del scFv128.1-2016 se decidió generar una proteína de fusión con un *tag* de MBP. Para ello, la secuencia fue enviada a GenScript (EE.UU.) para su síntesis química y ligación en un vector de expresión procariota comercial llamado pMAL-c2X (**Figura 21**, B). Una vez obtenido el vector pMAL-c2X-MBP-scFv128.1-2016 (**Figura 50**) se procedió a realizar la transformación en la cepa de clonado *E. coli* JM109 (ver sección 3.4.2.2), se seleccionaron los clones. Se realizó la transformación de bacterias competentes BL21 (DE3) C41 y Rosetta2 DE3 pLysS con el vector pMAL-c2X-MBP-scFv128.1-2016 según lo detallado en 3.4.2.4.

Se realizaron ensayos de expresión de MBP-scFv128.1-2016 a partir de 10 clones transformados y resistentes al factor de selección. Se realizaron cultivos de cada uno de los clones y la expresión de la proteína recombinante se indujo a 16°C. Se tomaron muestras de los cultivos inducidos y sin inducir de cada clon y se sembraron en un SDS-PAGE. Se pudo observar que la totalidad de los clones analizados presentaban la expresión de una proteína del peso molecular aproximado de 74 kDa, que coincide con el estimado para MBP-scFv128.1-2016 (**Figura 51**). Sin embargo, lo niveles de expresión en relación a la proteína total fueron muy bajos.

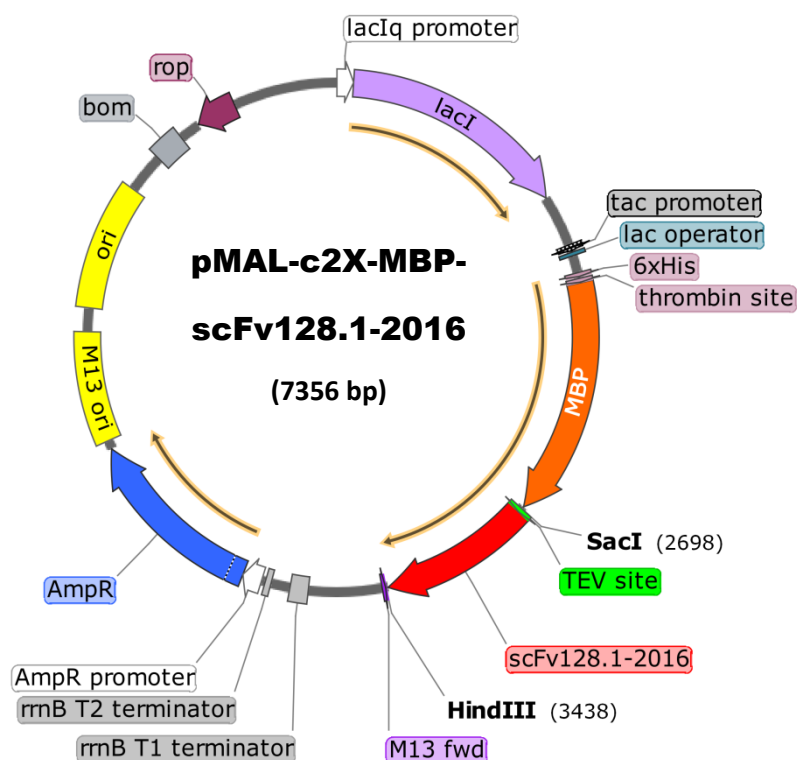


Figura 50. Vector pMAL-c2X – MBP-scFv128.1-2016 para la expresión de MBP-scFv128.1-2016. Resistencia a ampicilina (AmpR) y ORF de MBP-scFv128.1-2016 (MBP, en naranja + scFv128.1-2016, en rojo) bajo un promotor T7 inducible por IPTG.

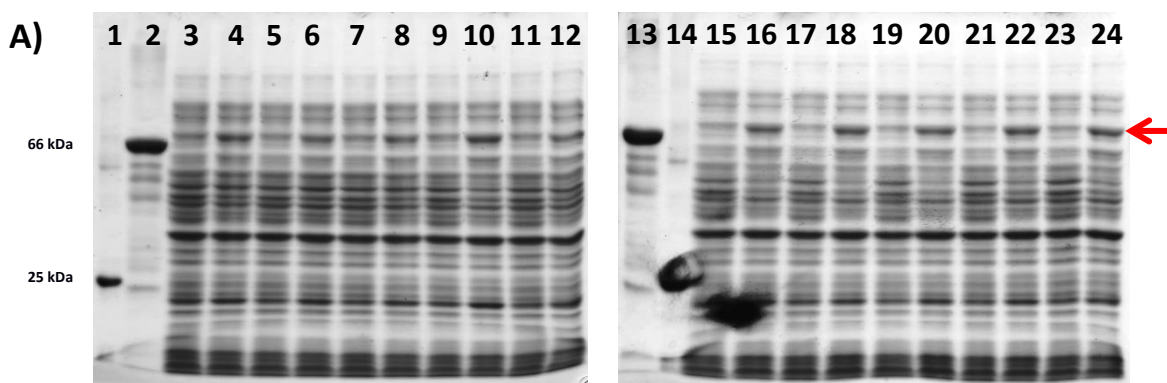


Figura 51. SDS-PAGE de un ensayo de expresión de MBP-scFv128.1-2016. Calle 1: TEV (25kDa); 2: BSA (66 kDa); Clones BL21 DE3 C41-MBP-scFv128.1-2016, 3-4: Clon 1 sin inducir, inducido; 5-6: Clon 2 sin inducir, inducido; 7-8: Clon 3 sin inducir, inducido; 9-10: Clon 4 sin inducir, inducido; 11-12: Clon 5 sin inducir, inducido, 13: BSA (66 kDa); 14: TEV (25 kDa); Clones Rosetta2 DE3 pLysS – MBP-scFv128.1, 15-16: Clon 1 sin inducir, inducido; 17-18: Clon 2 sin inducir, inducido; 19-20: Clon 3 sin inducir, inducido; 21-22: Clon 4 sin inducir, inducido; 23-24: Clon 5 sin inducir, inducido. La banda que se correspondería con el MBP-scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

Posteriormente se realizaron cultivos de un clon de ambas cepas para evaluar la expresión de la proteína recombinante de forma soluble o como cuerpos de inclusión. Para ello se eligieron los clones 4 de la cepa de BL21 DE3 C41 y el clon 1 de la cepa de Rosetta2 DE3 pLysS. Se realizaron cultivos líquidos inducidos a 16°C durante 24 h que luego fueron lisados por sonicación. Luego, las muestras fueron centrifugadas, y una alícuota del sobrenadante y el *pellet* resuspendido en PBS, fueron sembradas en un SDS-PAGE (**Figura 52**). Se observó que en las dos cepas se produjeron proteínas de forma insoluble, pero en caso de la cepa BL21 DE3 C41 en una menor proporción.

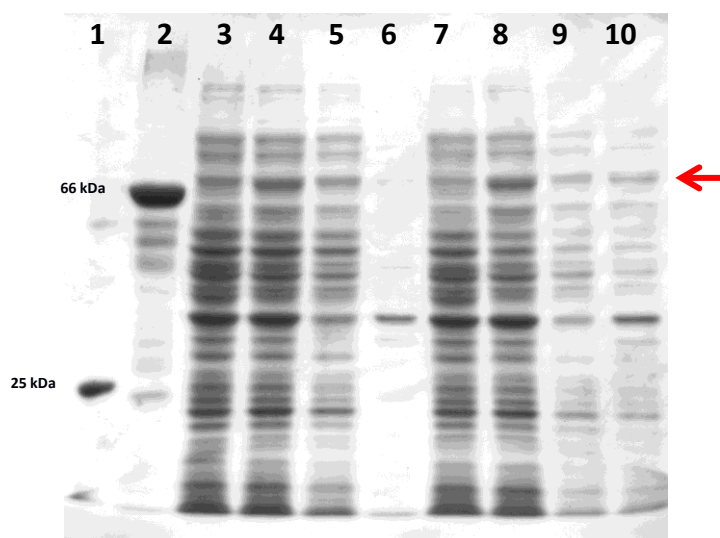


Figura 52. SDS-PAGE de un ensayo de solubilidad de MBP-scFv128.1-2016. Calle 1: TEV (25 kDa); 2: BSA (66 kDa); BL21 DE3 C41 – MBP-scFv 128.1, 3: cultivo sin inducir; 4: cultivo inducido; 5: sobrenadante del sonificado; 6: *pellet* del sonificado; Rosetta2 DE3 pLysS-MBP-scFv128.1, 7: cultivo sin inducir; 8: cultivo inducido; 9: sobrenadante del sonificado; 10: *pellet* del sonificado. La banda que se correspondería al MBP-scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

Se realizó un cultivo del clon BL21 DE3 C41 para la producción del MBP-scFv128.1-2016 bajo las mismas condiciones ensayadas anteriormente. Se realizó una purificación por IMAC utilizando una columna de níquel (**Figura 53**) y muestras de las fracciones obtenidas se sembraron en un SDS-PAGE (**Figura 54**). Se observó una banda predominante del peso molecular esperado para la proteína de fusión en las muestras luego de la elución de la columna. También se observaron otras bandas de menor peso molecular que podrían tratarse de proteínas contaminantes o de productos de degradación del MBP-scFv128.1-2016.

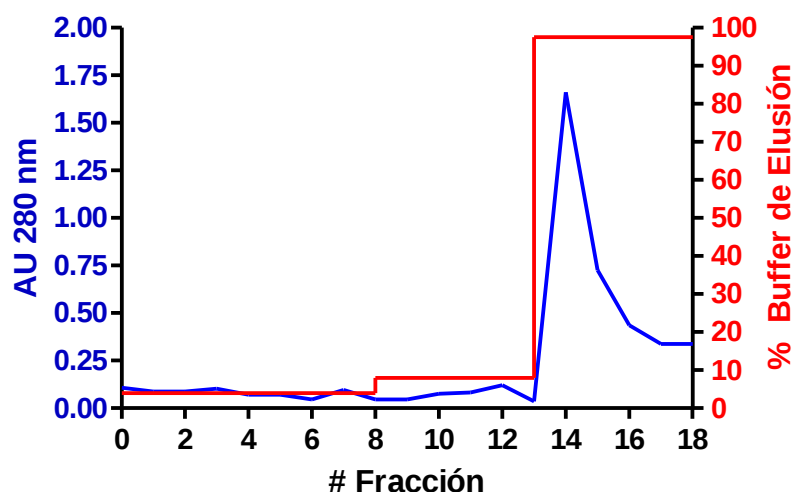


Figura 53. Cromatograma de una purificación de MBP-scFv128.1-2016 por IMAC. Se muestra una de las purificaciones de la proteína de fusión MBP-scFv128.1-2016 por IMAC utilizando una columna de níquel. En azul se muestra las unidades de absorbancia de 280 nm y en rojo la rampa del porcentaje de *buffer* de elución (500 mM de imidazol) utilizados.

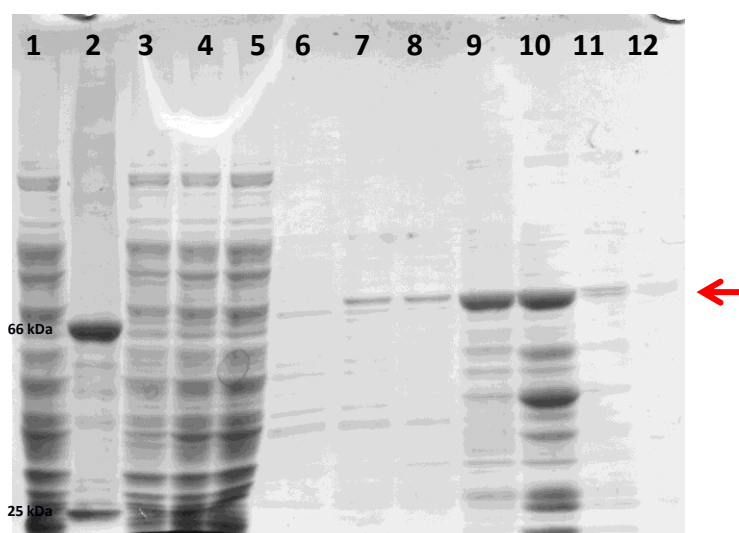


Figura 54. SDS-PAGE en condiciones reductoras de la purificación por IMAC de MBP-sc128.1-2016 como proteína soluble. Calle 1: muestra antes de la inyección en la columna de níquel; calle 2: TEV+BSA (25 kDa y 66 kDa); calles 3-6: Lavados con 20 mM Imidazol #1, 3, 5 y 7; calles 7-8: lavados 40 mM Imidazol #9 y 12; calles 9-12: Eluciones #14-17. La banda que se correspondería al MBP-scFv128.1-2016 se indica con una flecha roja.

Posteriormente, se realizó una purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna MBP-trap de las fracciones eluidas de la IMAC de MBP-scFv128.1-2016. Se pudo observar que luego de realizar la elución con maltosa y correr las muestras de las fracciones por SDS-PAGE, no se observó ninguna banda en las fracciones con maltosa (datos no mostrados).

4.2.8. Purificación del fragmento Fab del anticuerpo ch128.1 (Fab128.1) mediante digestión con papaína

Debido a que no fue posible producir el fragmento monovalente con la secuencia variable Fv2016, de forma soluble con buen rendimiento y pureza; y tampoco como proteína de fusión con MBP, se decidió purificar fragmentos Fab del anticuerpo ch128.1 producidos mediante digestión con papaína (Fab128.1). El fragmento fue producido por la digestión con papaína del anticuerpo ch128.1 con isotipo IgG1 y fue provisto por la Dra. Tracy Daniels-Wells de la UCLA. El Fab128.1 fue purificado por SEC observando a 280 nm un pico predominante de aproximadamente 1600 unidades de absorbancia (**Figura 55**).

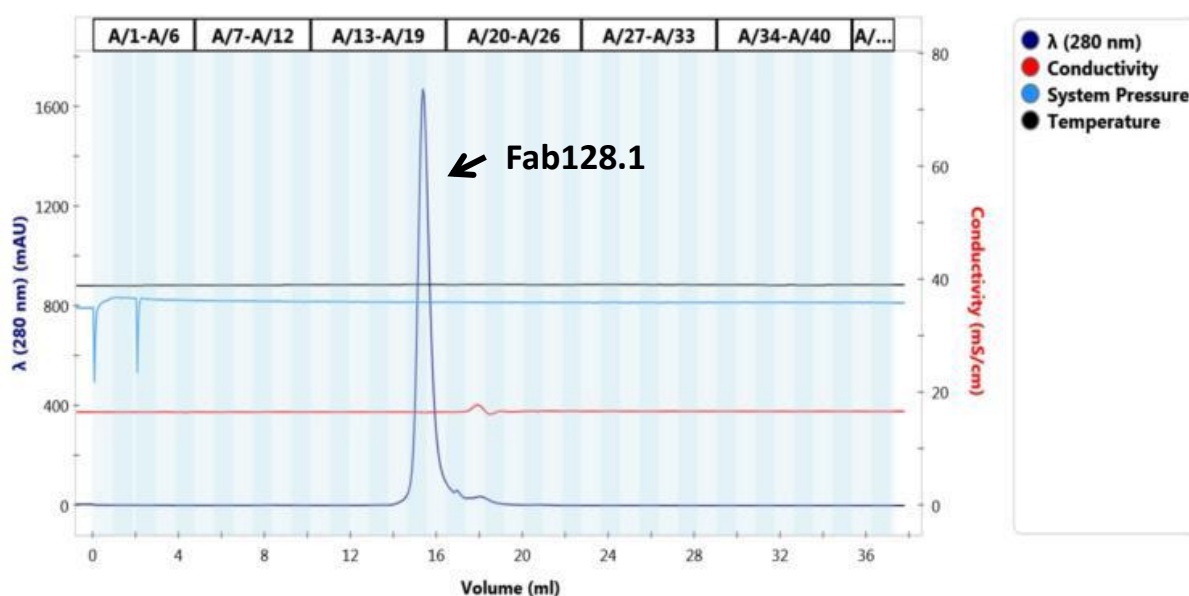


Figura 55. Cromatograma de una SEC del Fab128.1. Una muestra de ch128.1 isotipo IgG1 digerida con papaína se purificó utilizando SEC. En azul se grafican las unidades de absorbancia a 280 nm, en rojo la conductancia y en celeste la presión del sistema.

Posteriormente, las fracciones número 18 y 19 que contenían solo el pico predominante se juntaron y se sembraron en un SDS-PAGE en condiciones no reductoras junto con una muestra del Fab128.1 antes de la purificación por SEC (**Figura 56**). Curiosamente, pudo observarse una banda de aproximadamente 28 kDa en la muestra de Fab128.1 antes de realizar la SEC, lo cual sugiere que las cadena liviana y pesada no se encontraban covalentemente unidas por el puente disulfuro intercatenario, presentando una conformación $V_H-SH + HS-V_L$. Sin embargo, luego de la SEC se observó en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, la banda con un peso molecular total aproximado de 50 kDa correspondiente al Fab128.1 de la forma $V_H-S-S-V_L$. Esto sugiere que las condiciones de purificación favorecieron la regeneración del puente disulfuro entre ambas cadenas.

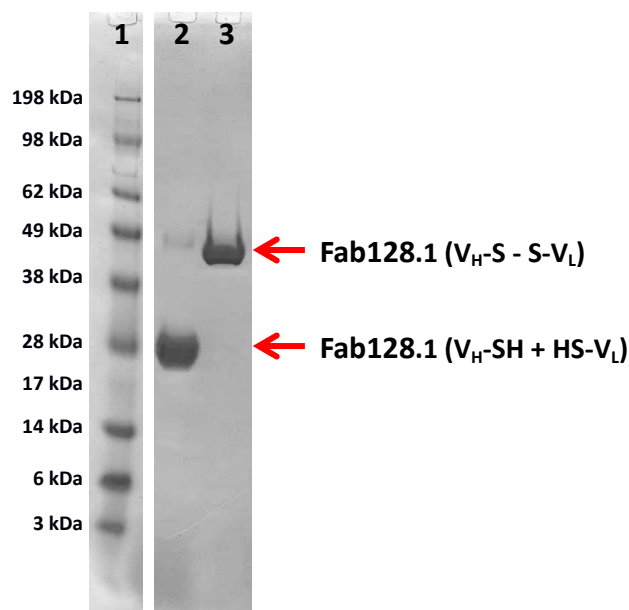


Figura 56. SDS-PAGE en condiciones no reductoras del Fab128.1 antes y después de la SEC, gel pre-empacado. Calle 1: marcador de peso molecular; calle 2: Fab128.1 antes de purificación con SEC; calle3: Fab128.1 luego de la purificación por SEC.

Posteriormente, se evaluó si el Fab128.1 mantenía la capacidad de unirse al hTfR1 luego de ser purificada por SEC. Para ello, se realizó un ELISA *sándwich* como se detalló en la sección 3.8.1 y se observó que el Fab128.1 se une al hTfR1 soluble (**Figura 57**).

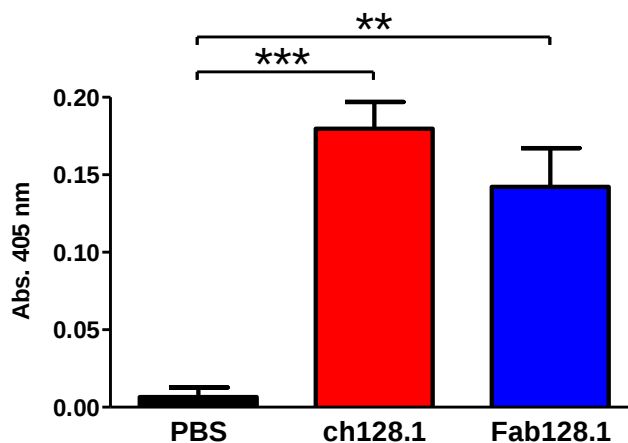


Figura 57. Ensayo de ELISA sándwich, unión del Fab128.1 al sTfR1 humano. Se realizó un ELISA sándwich decorando la placa con sTfR1 y luego incubando con Fab128.1 (100 nM), ch128.1 (50 nM) y PBS. La placa fue revelada mediante un anticuerpo anti- κ humano conjugado a PA. Se muestra la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se indican comparando cada tratamiento vs PBS (**P<0,01; ***P<0,001; Test t de Student para datos no apareados).

Para evaluar la unión del Fab128.1 al sTfR1, pero esta vez en solución, se realizó una SEC del complejo. Para lo cual, se reunieron ambas moléculas a similar concentración, se incubó durante 1 h

a temperatura ambiente y luego la solución fue inyectada en el sistema de SEC como se describe en la sección 3.8.3. Por otro lado, se procedió a realizar una SEC de ambas moléculas por separado para poder comparar los volúmenes de retención de los picos de todos los cromatogramas. De acuerdo a lo esperado, se detectó la presencia de picos a menores volúmenes de retención correspondientes al complejo Fab128.1-sTfR1 (**Figura 59, A**). Para comparación, en la **Figura 59, B y C** se muestran los cromatogramas de las SECs de Fab128.1 y sTfR1 por separado, respectivamente.

Para confirmar la presencia del complejo Fab128.1-sTfR1 se realizó un SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras de las fracciones obtenidas por SEC. Se pudieron observar dos bandas correspondientes a Fab128.1 (49 kDa) y sTfR1 (62 kDa) (**Figura 58**). Estos resultados sugieren que el Fab128.1 se une al sTfR1 humano en solución.

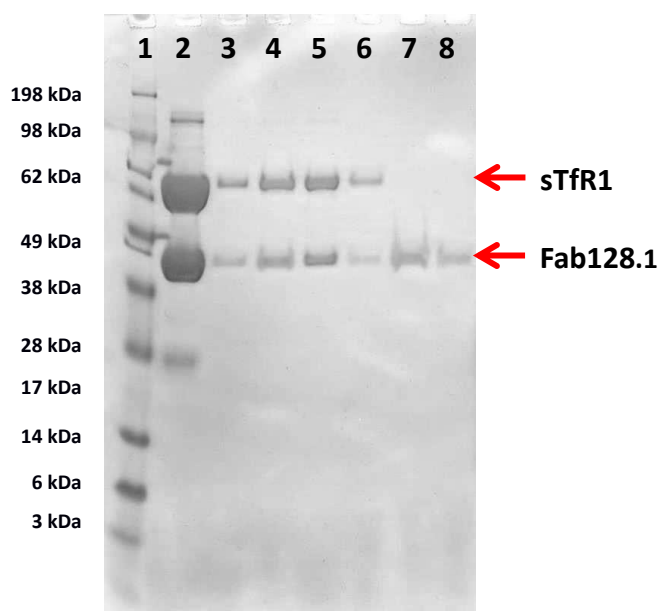


Figura 58. SDS-PAGE en condiciones no reductoras de Fab128.1 + sTfR1 humano después de SEC, gel pre-empacado. Calle 1: marcador de peso molecular; calle 2: solución Fab128.1 + sTfR1 antes de ser inyectada en la SEC; calles 3-8: Fracciones de la SEC # 12, 13, 14, 15, 18, 19.

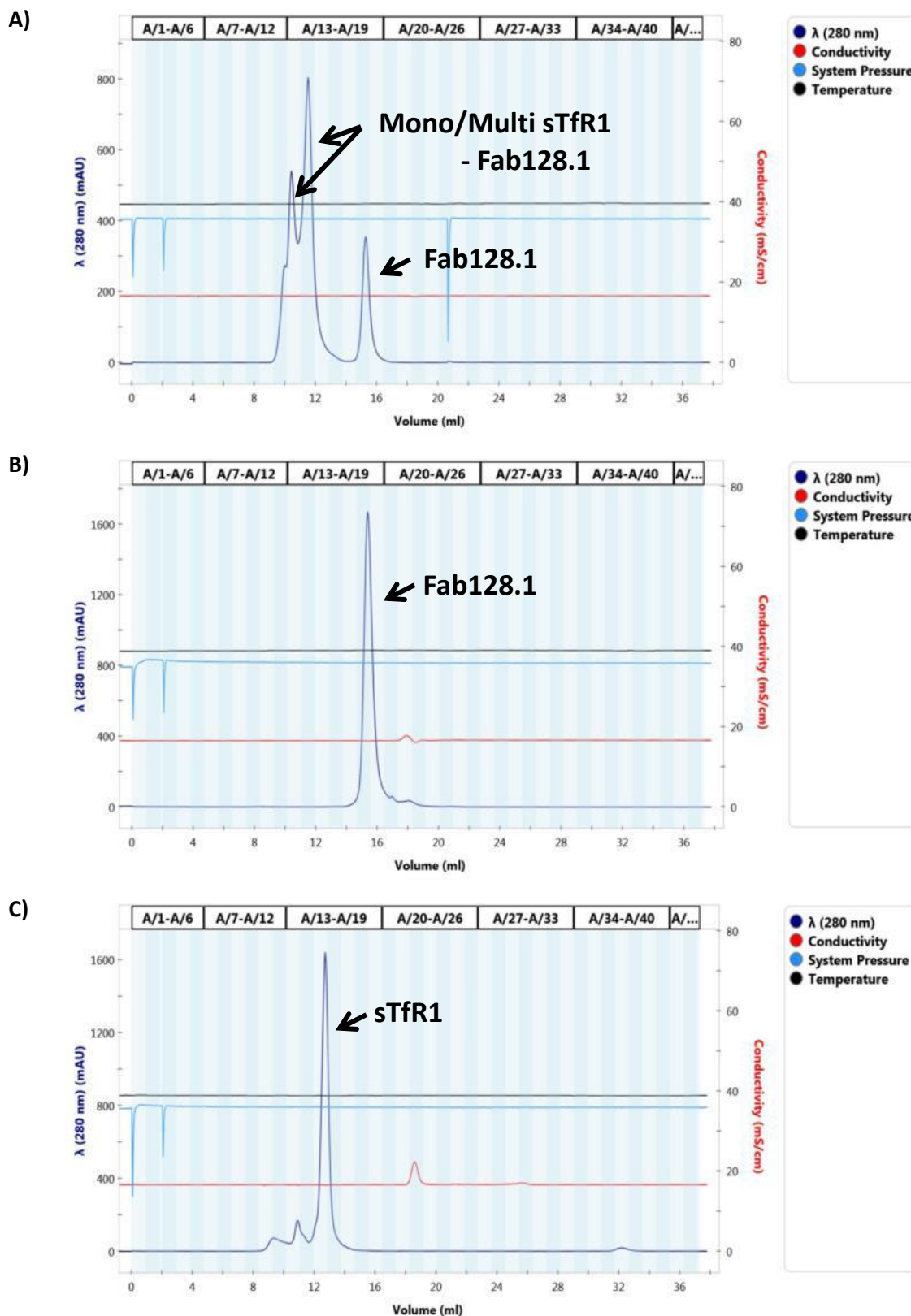


Figura 59. Cromatogramas de las SECs del complejo Fab128.1+sTfR1, Fab128.1 y sTfR1. Se muestran los cromatogramas de las SEC del complejo Fab128.1+sTfR1 (A), Fab128.1 (B) y sTfR1 (C). En azul se grafican las unidades de absorbancia a 280 nm, en rojo la conductancia y en celeste la presión del sistema.

Posteriormente, se evaluó la especificidad y la capacidad del Fab128.1 de unirse al hTfR1 *in vitro* sobre la membrana celular. Para este ensayo se utilizó una línea celular de ratón CHO-K1 y una línea transgénica CHO TRVb-1 que fue transformada para expresar hTfR1 en la superficie celular de forma estable [193]. Cabe recordar que el anticuerpo ch128.1 no es capaz de unirse al mTfR1, por lo tanto, el fragmento Fab128.1 solo podría unirse a las células CHO TRVb-1. Las células se incubaron con el Fab128.1, ch128.1, o un anticuerpo inespecífico y luego la presencia de los anticuerpos se midió por citometría de flujo según lo detallado en la sección 3.8.2. Se observó que el fragmento Fab128.1 se unió específicamente a la superficie de las células CHO TRVb-1 que expresan hTfR1 (Figura 60).

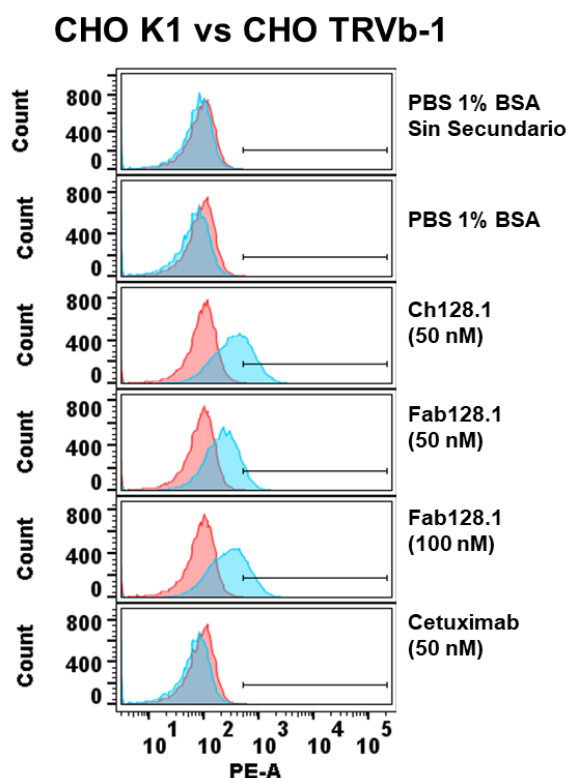


Figura 60. Unión del fragmento de anticuerpo Fab128.1 en células CHO-K1 y CHO TRVb-1. Células CHO-K1 (en rojo) y CHO TRVb-1 (en azul) se incubaron durante 2 días con medio completo. La unión del anticuerpo ch128.1 (50nM), Fab128.1 (50 y 100 mM) y anticuerpo control (Cetuximab 50 nM) fue medida utilizando un anticuerpo secundario (Anti-Human Ig kappa Light chain) conjugado a PE y citometría de flujo.

Además, se evaluó la capacidad de los anticuerpos de interactuar sobre la superficie de células HEK-293T que expresan en condiciones nativas el hTfR1, bajo las mismas condiciones. Esta línea celular humana es la utilizada para la producción y los ensayos de internalización de

pseudovirus. Al igual que con la línea CHO TRVb-1, el Fab128.1 se unió a la superficie de las células HEK-293T (Figura 61).

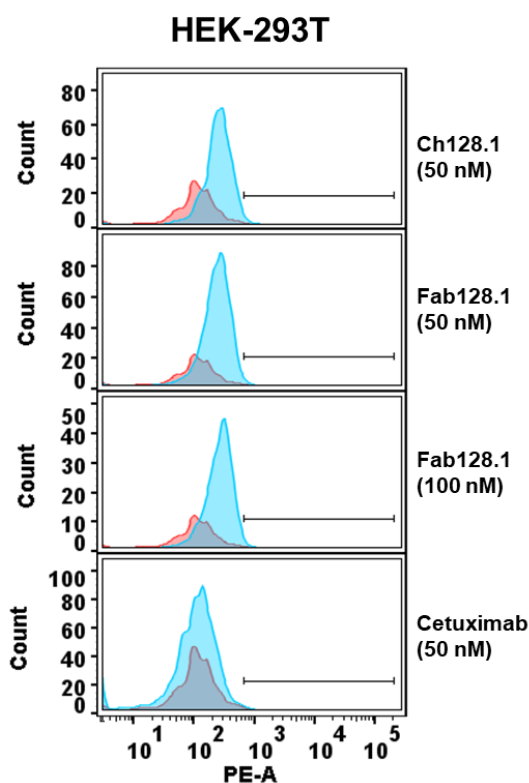


Figura 61. Unión del fragmento de anticuerpo Fab128.1 en células HEK-293T. Células HEK-293T se incubaron durante 2 días con medio completo. La unión de los anticuerpos ch128.1 (50nM) y Fab128.1 (50 y 100 mM) y control negativo (Cetuximab 50 nM) fue medida utilizando un anticuerpo secundario (Anti-Human Ig kappa Light chain) conjugado a PE y citometría de flujo. En rojo se muestran las células control incubadas con anticuerpo secundario solo y en celeste las células tratadas más anticuerpo secundario.

Hasta aquí, se demostró que el fragmento monovalente Fab128.1 se une al sTfR1 humano por ELISA, en solución por SEC y sobre la superficie de células HEK-293T por citometría de flujo. También se observó que, al igual que ch128.1, el Fab128.1 es específico sobre hTfR1 debido a que no se une a las células CHO-K1 y si sobre la línea CHO TRVb-1 que lo expresa de forma recombinante y de forma estable. Los siguientes pasos consistieron en evaluar la habilidad del Fab128.1 para inhibir la internalización de los pseudovirus de las FHS.

4.2.9. Bloqueo de la entrada de pseudovirus de los Mamarenavirus causantes de las FHS en una línea celular humana

Como modelo *in vitro* de infección para evaluar la capacidad del Fab128.1 de bloquear la internalización de cada uno de los Mamarenavirus causantes de las FHS y con un Mamarenavirus del

Viejo Mundo como control (LASV), utilizamos el modelo de pseudovirus empleado anteriormente en este trabajo para evaluar el plasma de pacientes convalecientes de FHA. Las células se incubaron en presencia de Fab128.1, ch128.1 y anticuerpo control inespecífico junto con cada uno de los pseudovirus de las FHS y LASV. El porcentaje de internalización de pseudovirus en células HEK-293T se midió por citometría de flujo según lo detallado en la sección 3.2.2. Se observó que el fragmento monovalente Fab128.1 fue capaz de bloquear significativamente la internalización de pseudovirus de JUNV ($82 \pm 4\%$), MACV ($87 \pm 1\%$), GTOV ($88 \pm 1\%$), SABV ($99 \pm 1\%$) y CHAV ($95 \pm 9\%$) pero no de LASV el cual no tiene al hTfR1 como vía de entrada (**Figura 62**). Estos estudios confirman que el fragmento monovalente Fab128.1 es capaz de bloquear la entrada de todos los Mamarenavirus causantes de las FHS *in vitro* al igual que el AcM completo ch128.1. Esto sugiere que el efecto de crosslinking producto de la bivalencia del ch128.1 no tendría un rol importante en la capacidad de inhibir la internalización de los pseudovirus.

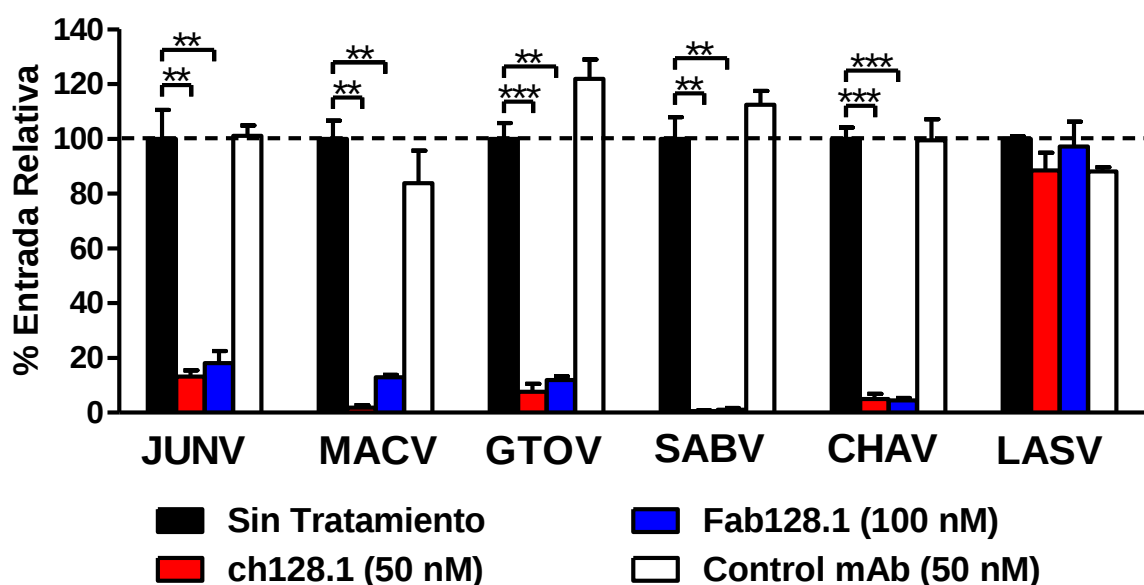


Figura 62. Porcentaje de entrada relativa de pseudovirus de JUNV, MACV, GTOV, CHAV y SABV en células HEK-293T en presencia de Fab128.1, ch128.1. Células HEK-293T fueron tratadas con Fab128.1 (100 nM), ch128.1 (50 nM) o AcM control inespecífico (Cetuximab 50 nM). Luego de 30 min de incubación con cada uno de los tratamientos, se adicionaron pseudovirus decorados con el complejo GP1/GP2 de JUNV, MACV, GTOV, CHAV y SABV diseñados para expresar GFP una vez internalizado. Luego de 48 h, las células fueron fijadas y la fluorescencia medida por citometría de flujo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD. Los datos fueron normalizados al 100% con las células sin tratamiento y las diferencias significativas se indican comparando Fab128.1, ch128.1 vs sin tratamiento (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Test t de Student para datos no apareados).

Posteriormente, se realizó un ensayo similar pero utilizando concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 nM de Fab128.1 para construir un gráfico de dosis respuesta y poder determinar las concentraciones IC_{50} (**Figura 63**). Se obtuvieron valores de IC_{50} para cada pseudovirus de 1,63 nM

para JUNV, 5,18 nM para MACV, 1,84 nM para GTOV, 2,58 nM para SABV y de 2,01 nM para CHAV. Estos valores son más altos que los observados para el ch128.1 [92] lo que sugiere que la avidéz producto de la bivalencia del anticuerpo completo ch128.1 favorecería el bloqueo de la internalización de los pseudovirus.

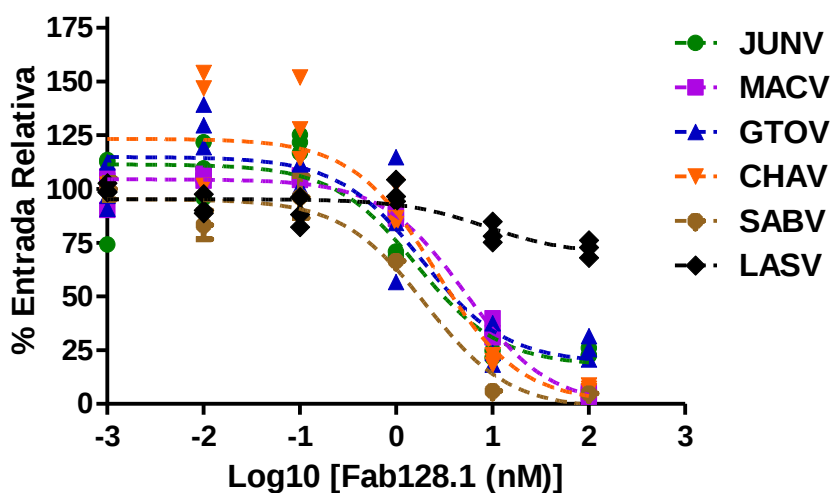


Figura 63. Gráfico de dosis respuesta del Fab128.1 sobre la internalización de pseudovirus de JUNV, MACV, GTOV, CHAV y SABV en células HEK-293T. Células HEK-293T fueron tratadas con concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 de Fab128.1 y pseudovirus decorados con el complejo GP1/GP2 de los virus JUNV, MACV, GTOV, CHAV y SABV. La internalización de los pseudovirus se cuantificó por citometría de flujo. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD y fueron normalizados al 100% con las células sin tratamiento (medio). Las líneas de ajuste para el cálculo de la IC_{50} del Fab128 para cada uno de los pseudovirus se muestran en líneas punteadas y fueron realizadas con GraphPad Prism 5.

4.3. Determinación de la estructura de la región variable del anticuerpo ch128.1 y propuesta de un modelo de su unión con el hTfR1 que explique el bloqueo de la entrada de los Mamarenavirus de las FHS

4.3.1. Estudio de cristalizabilidad de las proteínas con región variable del anticuerpo ch128.1

Se realizó un análisis *in silico* de la cristalizabilidad utilizando la herramienta informática *XtalPred* que permitió evaluar la probabilidad de obtener cristales de cada una de las proteínas diseñadas con la región variable del anticuerpo ch128.1 con o sin digerir con la proteasa TEV. En la **TABLA 10** se muestran los resultados de EP y RF para todas las proteínas recombinantes completas y luego de digerir con la proteasa TEV, y para el Fab128.1 producido por la digestión con papaína del anticuerpo completo ch128.1 con isotipo IgG1. Se observó que en líneas generales las proteínas no poseen valores muy promisorios de cristalizabilidad, mostrando valores de EP y RF muy cercanos a 5 y 11 respectivamente (**TABLA 10**). De todas las estudiadas, el scFv128.1-2014 con o sin digerir con TEV y el producto de la digestión con TEV de la proteína de fusión MBP-scFv128.1-2016 serían las que tienen mayor probabilidad de cristalizar. Es interesante destacar la diferencia en los perfiles de cristalizabilidad entre los scFv con la región variable Fv2014 con respecto al Fv2016. Este último presentó valores de RF dos puntos superiores a los obtenidos con el scFv128.1-2014. Por lo tanto el scFv con la región variable Fv2016 presentaría menor probabilidad de formar cristales con respecto al Fv2014.

Nombre	EP	RF	Digerido con TEV	
			EP	RF
scFv128.1-2014	4	8	4	8
scFv128.1-2016	4	10	4	10
MBP-scFv128.1-2016	4	11	4	8
Fab128.1 por digestión con papaína	4	11	-	-

TABLA 10. Valores de EP y RF *crystallization classes* para cada una de las proteínas recombinantes diseñadas con la región variable del anticuerpo ch128.1 o la porción Fab del anticuerpo, con y sin digerir con la proteasa TEV.

4.3.2. Cristalografía de rayos X del Fab128.1

Con el fin de determinar la estructura tridimensional de los CDRs del anticuerpo ch128.1 y dilucidar el mecanismo por el cual es capaz de bloquear la entrada de pseudovirus de los Mamarenavirus sudamericanos patógenos, se utilizó la técnica de cristalografía de rayos X. Debido a que no fue posible generar una proteína recombinante con la región variable Fv2016 con alta productividad y con una pureza mínima del 95% (condiciones necesarias para realizar los experimentos de cristalografía de rayos X), se utilizó el fragmento Fab producido mediante la digestión con papaína del anticuerpo ch128.1 con isotipo IgG1 y purificado por SEC.

Pese a la bajas chances de cristalizabilidad predichas por el análisis *in silico*, se lograron generar cristales del Fab128.1 utilizando la técnica de difusión de vapor de gota colgante a 18°C. Se evaluaron 576 condiciones distintas de cristalización según lo detallado en la sección 3.10 y se obtuvieron cristales en varias de las condiciones ensayadas. Los cristales simples se congelaron en nitrógeno líquido y sus patrones de difracción de rayos X fueron obtenidos en la línea 24-ID-E del sincrotrón APS. El cristal utilizado para la obtención de la estructura se muestra en la **Figura 64, A** y uno de los patrones de difracción colectados con datos de hasta 2,4 Å de resolución se muestra en la **Figura 64, B**.

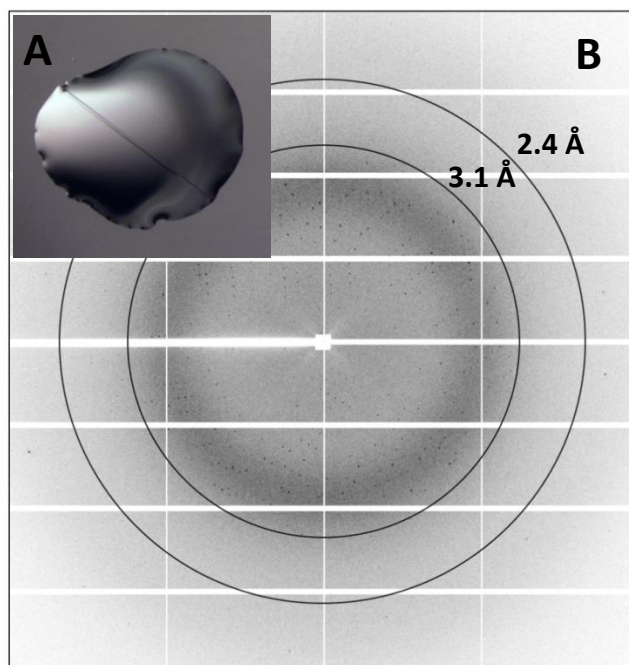
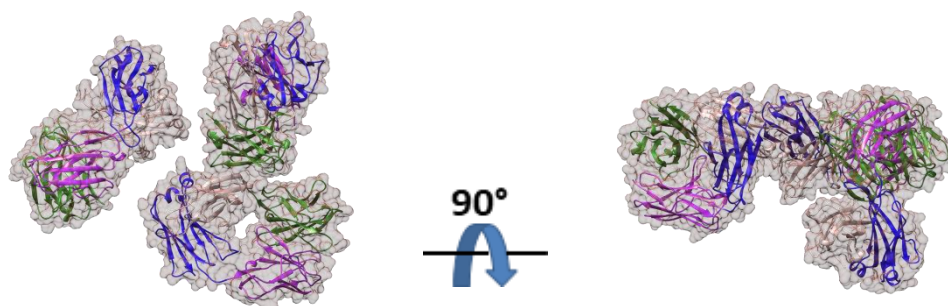


Figura 64. Cristalografía de rayos X del Fab128.1. A) Gota de solución de cristalización con un cristal de Fab128.1 obtenido a través de un sistema de difusión de vapor de gota colgante. B) Patrón de difracción de rayos X del cristal en A) obtenido mediante la línea 24-ID-E del sincrotrón APS.

Los parámetros de celda unitaria fueron de $a = b = 126.7 \text{ \AA}$ y $c = 94.85 \text{ \AA}$ y ángulos de 90° , 90° , 120° con un grupo espacial $P3_1$ (#144). La unidad asimétrica estuvo conformada por tres fragmentos Fab128.1 (**Figura 65**, A) y la celda unitaria se constituyó por tres unidades asimétricas (**Figura 65**, B). La resolución de las fases se realizó por reemplazo molecular utilizando el programa *Phaser* y como templado la estructura del Fab anti-FPR Fpro0165 (PDB: 4UV4) que posee una homología del 69,8% con respecto al Fab128.1. La visualización y el ajuste del esqueleto carbonado dentro de los mapas de densidad electrónica se realizaron con el programa COOT (**Figura 66**). Se llevaron a cabo 21 ciclos de refinamiento de la estructura utilizando el programa REFMAC5. Las estadísticas de los datos colectados y del refinamiento se muestran en la **TABLA 11**. Se pudo resolver la estructura con una resolución de $2,599 \text{ \AA}$ y valores de los factores residuales R y R_{free} de 0,2352 y 0,2624, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de 0.2 a 0.6 aceptable para macromoléculas.

A)



B)

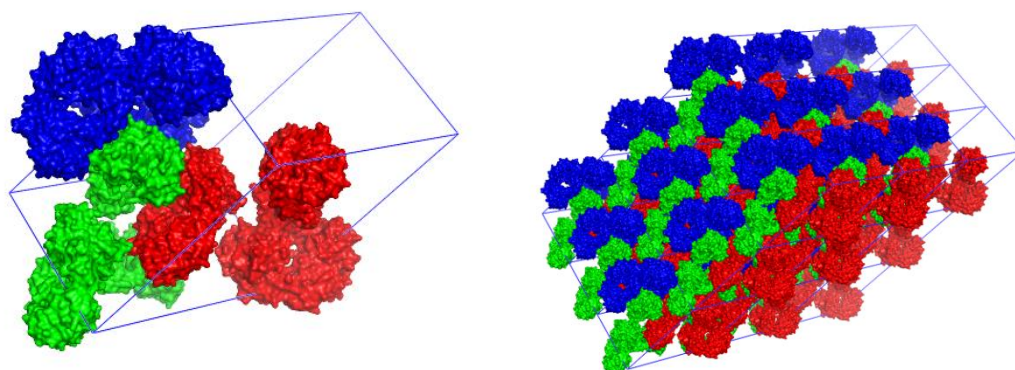


Figura 65. Estructura del cristal de Fab128.1. A) Unidad asimétrica del cristal de Fab128.1. Se muestra en verde la región V_H , en violeta la región V_L , en azul la región C_L y en gris la región C_H . B) Izquierda, Celda unitaria (1, 1, 1). Cada celda unitaria está compuesta por tres unidades asimétricas (cada una se muestra en color verde, azul y rojo). Derecha, estructura espacial de un cristal constituido por 27 celdas unitarias (3, 3, 3).

Posteriormente, se realizó el análisis por distribución de Ramachandran de los residuos resueltos como se indica en la **TABLA 11**, donde se observa que 96,5% están en regiones favorecidas, el 3% en regiones permitidas y el 0,5% en valores atípicos (**Figura 67**). Es importante resaltar la calidad de la estructura resuelta, ya que más del 99% de los residuos se ubican en la región favorable y/o permitida, con solo 7 residuos con valores atípicos (*outliers*). Como es de esperar, 6 de estos residuos son prolinas, el aminoácido con mayor grado de torsión en el esqueleto carbonado de la cadena peptídica, mientras que solo un residuo de arginina se encontró dentro de los valores atípicos.

TABLA 11.
Datos colectados, estadística de refinamiento para Fab128.1 y gráfico de Ramachandran

Parámetros	Valores
Colección de Datos	
Grupo Espacial	P3 ₁
Dimensión de la celda unitaria a, b, c	126.27 Å , 126.27 Å , 94.85 Å
Dimensión de la celda unitaria α , β , γ	90°, 90°, 120°
Longitud de onda	0,978 Å
Resolución	71.652–2.599 Å
I/ σ I	11.5
Compleitud	99.58%
Número de reflexiones observadas	269987
Número de reflexiones únicas	51628
Número de reflexiones posibles	52387
Rmerge	12.5%
Refinamiento	
Resolución	71.652–2.599 Å
Número de reflexiones usadas	46691
Número de átomos	9992
Número de residuos	1406
R	0,2352
R _{free}	0,2624
Largo de unión	0,0076 Å
Ángulo de unión	1.2769°
Gráfico de Ramachandran	
Número de residuos en región favorecida (%)	1233 (96.5%)
Número de residuos en región permitida (%)	38 (3.0%)
Número de residuos con valores atípicos (%)	7 (0,5%)
No permitido (%)	0 (0%)

La estructura de Fab128.1 tiene dominios plegables de inmunoglobulina comunes a todas las estructuras Fab de anticuerpos. La región variable de la cadena pesada de Fab128.1 tiene 118 residuos, mientras que la región variable de la cadena liviana tiene 106. Los seis lazos CDR (H1:22-35, H2:49-66, H3:99-107, L1:23-33, L2:49-55 y L3:87-96) que forman el sitio de reconocimiento de antígeno mostraron densidades electrónicas bien definidas como así también el resto de la molécula de Fab128.1 (**Figura 68**).

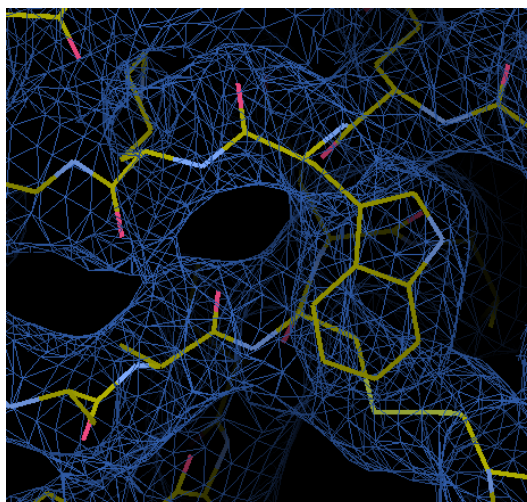


Figura 66. Imagen de la densidad electrónica del Fab128.1 mediante el programa COOT. En azul se muestra la densidad electrónica obtenida luego de la difracción de rayos X, la sustitución molecular y el refinamiento, utilizando el programa COOT.

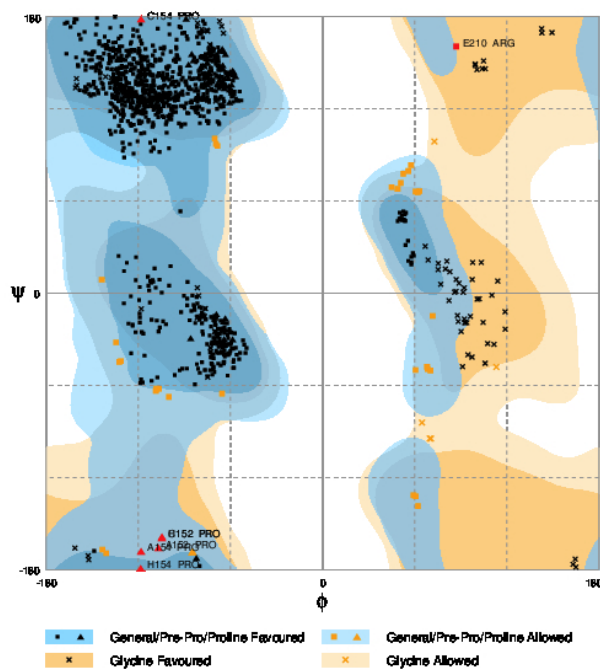


Figura 67. Gráfico de Ramachandra. Se muestra las combinaciones de ángulos diédricos Ψ (psi) contra Φ (phi) de los aminoácidos que forman parte de la conformación de la estructura del Fab128.1.

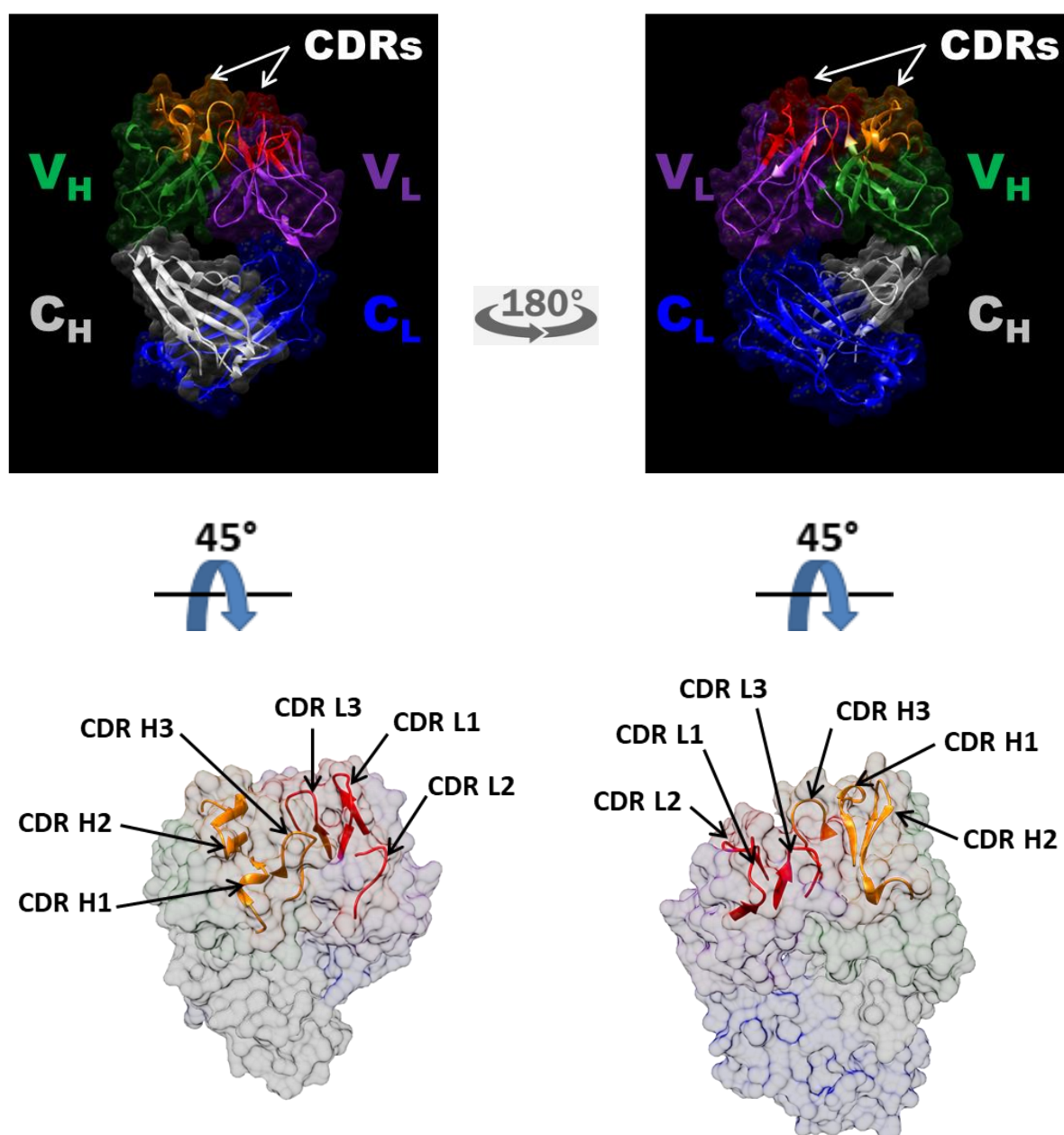


Figura 68. Estructura atómica del Fab128.1. De arriba hacia abajo, se muestran ambos laterales de una representación de la estructura atómica del Fab128.1 obtenida por cristalografía de rayos X y visualizado con el programa Chimera. Abajo se muestran los respectivos CDRs de cadena pesada y liviana. En amarillo se muestran los CDRs de la cadena pesada y en rojo los de cadena liviana, en verde la región V_H, en violeta la región V_L, en azul la región C_L y en gris la región C_H.

Un parámetro útil para predecir superficies de interacción entre proteínas es el análisis de potencial electrostático de superficie, ya que es un buen predictor de especificidad intermolecular [194, 195]. El potencial de superficie electrostática del Fab128.1 con su sitio de unión al antígeno se calculó usando la función *APBS Electrostatics* de PyMOL (**Figura 69**). Es interesante destacar que el

parátipo del Fab128.1 tiene la gran mayoría de su área de superficie cargada positivamente, incluyendo los lazos H1, H2, H3, L1, y L3. Como solamente el lazo L2 no presenta carga de superficie positiva, esto indicaría que el epítipo reconocido por Fab128.1 en la superficie de hTfR1 debería presentar una distribución de carga superficial predominantemente negativa.

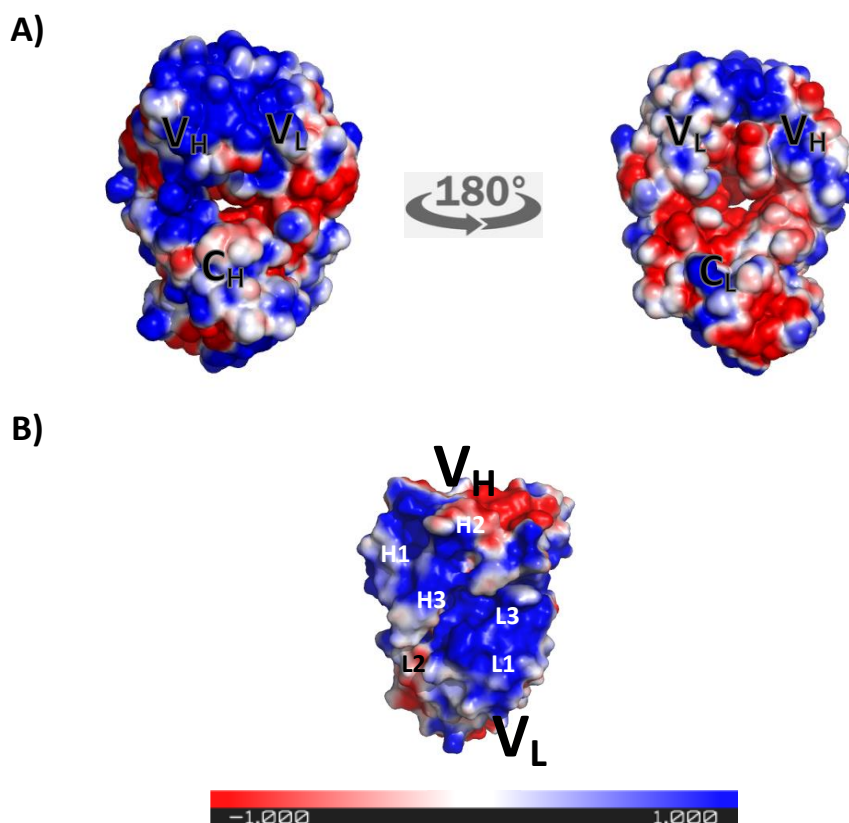


Figura 69. Modelado del potencial electrostático de superficie del Fab128.1. Se muestra el potencial de superficie electrostática sobre los laterales del Fab128.1 (A) y sobre las regiones del sitio de unión al antígeno que contienen los CDRs (B). Se representa desde carga negativa (rojo) hasta carga positiva (azul) en un rango de -1.000 a +1.000 T/e.

La técnica de cristalografía de rayos X también permite confirmar la secuencia de la proteína cuya estructura estamos estudiando [196]. Por lo tanto, se realizó un alineamiento de la secuencia obtenida a partir de la estructura resuelta del Fab128.1 por cristalografía de rayos X y la de la región variable Fv2016 (**Figura 70**). Se observó un 100% de identidad entre ambas secuencias. Por lo tanto, la secuencia Fv2016 sería la secuencia de región variable correcta del anticuerpo 128.1.

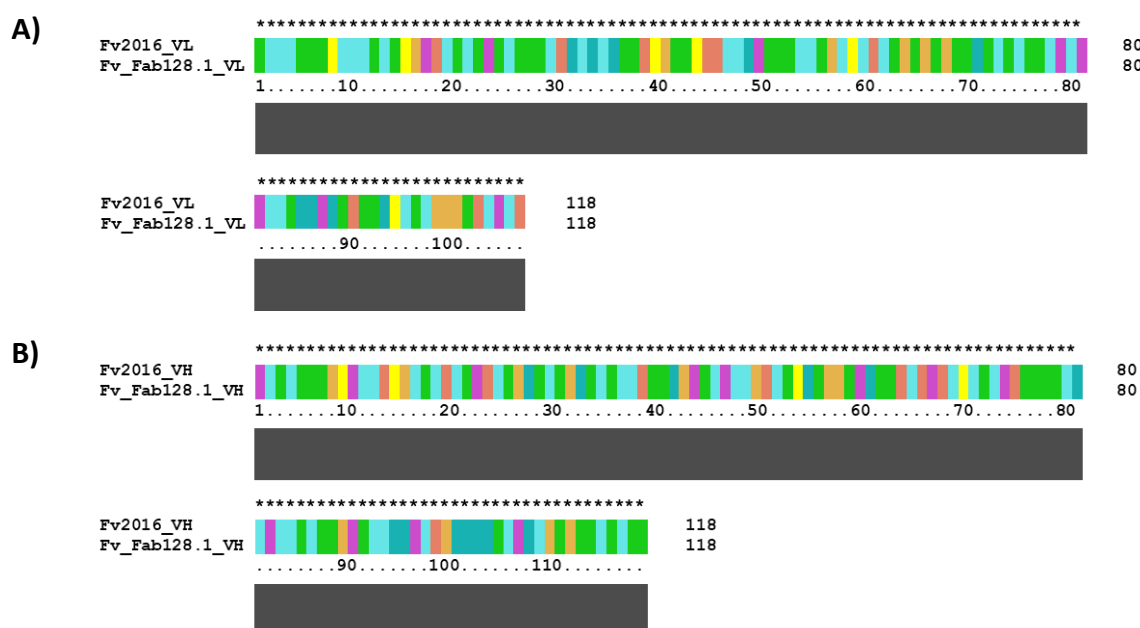


Figura 70. Alineamiento de secuencias Fv2016 y la obtenida del Fab128.1 luego de resolver su estructura atómica por cristalografía de rayos X. Se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región variable del anticuerpo 128.1, secuencia Fv2016 y la secuencia obtenida luego de la resolución de la estructura atómica del fragmento Fab128.1 producido por la digestión con papaína del anticuerpo ch128.1 con isotipo IgG1 por cristalografía de rayos X.

4.3.3. Modelado del acoplamiento Fab128.1 con el dominio apical del sTfR1 humano

Para entender el mecanismo por el cual el Fab128.1 logra reconocer el dominio apical de hTfR1 y bloquear la interacción de la GP1 de los Mamarenavirus de las FHS, se usaron métodos *in silico* para predecir el epítipo molecular sobre el hTfR1. Esto se realizó en combinación con los datos de mutagénesis descriptos en el trabajo de Helguera y col. 2012 [92] mostrados anteriormente y estudios de cristalografía del complejo hTfR1-GP1MACV (PDB: 3KAS). Se modeló por cuerpo rígido el acoplamiento de la estructura atómica del Fab128.1 con la estructura del hTfR1 utilizando ClusProV2.0. Esto se realizó incluyendo una máscara de atracción con los datos de mutagénesis dirigida donde se determinó que el segmento con los residuos S324-S368 del dominio apical de hTfR1 es crítico para la unión del anticuerpo ch128.1 (ver **Figura 12**, sección 1.3).

En la **Figura 71** se representa con modelo de cinta la estructura de hTfR1 donde se identificaron los residuos de superficie con la función *FindSurfaceResidues* de PyMOL con una línea de corte de 2,5 Å. Allí se indica la secuencia S324-S368 identificada mediante los experimentos de mutagénesis y se indican en color azul residuos en la superficie accesibles al Fab128.1 y que cumplirían un rol en su unión al hTfR1. Este listado se empleó para construir la máscara de atracción de hTfR1 para el modelado con ClusPro (aa-324 aa-325 aa-326 aa-327 aa-328 aa-329 aa-330 aa-331

aa-332 aa-339 aa-340 aa-343 aa-344 aa-346 aa-347 aa-348 aa-349 aa-350 aa-351 aa-352 aa-353 aa-354 aa-355 aa-356 aa-357 aa-358 aa-359 aa-360 aa-361 aa-362 aa-364 aa-365 aa-366 aa-367 aa-368). Esta máscara de atracción se incluyó en el modelado de acoplamiento de ClusPro en función “anticuerpo”.

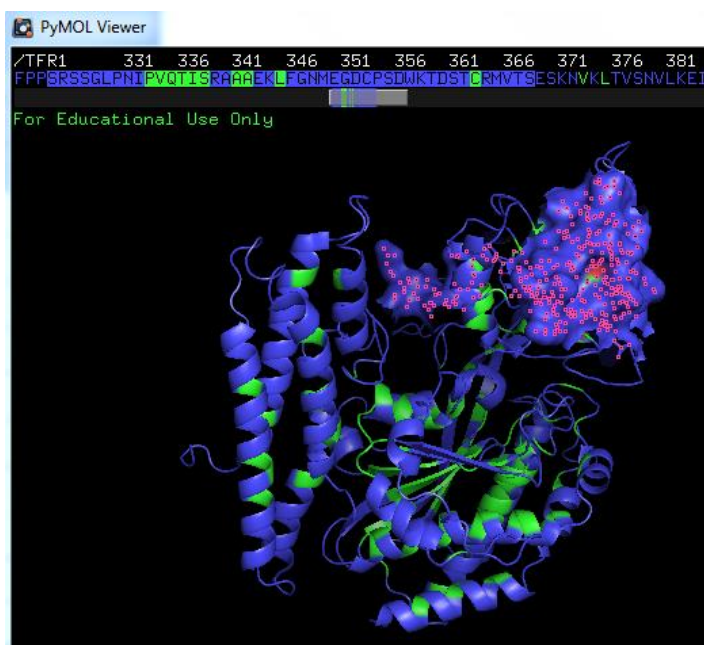


Figura 71. Estudio de los aminoácidos incluidos en la máscara de atracción. Se muestra una imagen de la ventana de PyMOL con el diagrama de cintas de hTfR1 donde se identifican residuos de superficie con una línea de corte de 2,5 Å que cumplirían un rol en la unión de ch128.1 al receptor. Estos residuos fueron identificados mediante experimentos de mutagénesis dirigida [92]. En verde se marcan los residuos internos y en azul los de superficie.

En la **TABLA 12** y **Figura 72** se muestran los tres mejores *clusters* de modelos ranqueados por el número de miembros de *cluster* en un radio de 9 Å RMSD entre los 1.000 modelos generados con menor *score*. En los tres modelos, el Fab128.1 se une en la región apical de hTfR1. El *cluster* 000 con mayor número de miembros incluyó 166 modelos. Es necesario notar que, pese a que los *scores* ponderados de los *clusters* 001 y 002 fueron menores que los del *cluster* 000, la población de modelos en *clusters* es el mejor indicador del sitio de unión, ya que el algoritmo PIPER de *score* no está optimizado para resolver las componentes energéticas particulares de los ligandos con su sitio de unión [186]. Sin embargo, este algoritmo permite generar modelos de cuerpo rígido con muy buena coordinación anticuerpo-antígeno.

TABLA 12.
Análisis de acoplamiento con ClusProV2.0

<i>Cluster</i>	Número de miembros	Representante	<i>Score ponderado</i>
000	166	Centro Menor Energía	-523,7 -586,8
001	109	Centro Menor Energía	-605,4 -609,8
002	108	Centro Menor Energía	-581,7 -599,5

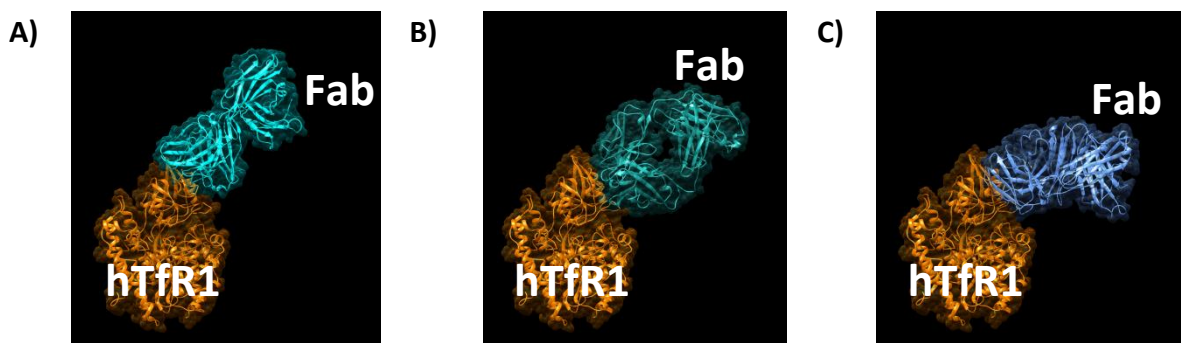


Figura 72. Resultados ClusPro. A) cluster 000, B) 001, C) 002.

Por lo tanto, el modelo de interacción hTfR1 y Fab128.1 mejor ranqueado con ClusPro (*Cluster* 000) fue utilizado como punto de partida para un posterior modelado con la opción de refinamiento de acoplamiento local y flexibilización de los esqueletos carbonados de los bucles de los CDRs de las regiones V_H y V_L utilizando el servidor Rosetta SnugDock [187]. En la **Figura 73**, A se muestra el gráfico de *score* de interface de 1.000 modelos generados para el refinamiento de acoplamiento en función del RMSD respecto al modelo de partida utilizando Rosetta SnugDock del *clusters* con mayor tamaño obtenido con ClusPro, el *cluster* 000. En la **Figura 73**, B se muestra el modelo de acoplamiento entre la región apical del hTfR1 con el fragmento variable del Fab128.1 que se corresponde con el modelo de menor *score* de interface (-10 I_{sc}) del Rosetta SnugDock. Utilizando la función *InterfaceResidues* de PyMOL se identificaron en este modelo un total de 29 residuos en la superficie de hTfR1 que interaccionarían con el Fab128.1 (**Figura 73**, C; izquierda). Por otro lado, se identificaron un total de 24 residuos del Fab128.1 que estarían en contacto con el hTfR1, de los cuales 15 están en la región V_H (CDR-H1: 1; CDR-H2: 11; CDR-H3: 3) y 9 en la región V_L (FR-L1: 1; CDR-L1: 4; CDR-L2: 0; CDR-L3: 4) (**Figura 73**, C; derecha), y sólo uno de los residuos no se encuentra en los CDRs (**Figura 73**, E; flecha roja). También se calculó el potencial de cargas sobre la superficie de ambas interfaces utilizando la función *APBS Electrostatic* de PyMOL (**Figura 73**, D) en donde se puede apreciar que la superficie del Fab128.1 que interacciona con el hTfR1 se encuentra casi en su totalidad con una densidad de carga positiva mientras que la región sobre el hTfR1 se encuentra, de acuerdo a lo esperado, predominantemente con una distribución de carga negativa. Es interesante

resaltar que sólo las regiones CDR con carga negativa que se encuentran sobre la superficie del Fab128.1 son el CDR-L2 y el CDR-H2, en donde el primero no interviene en el contacto con hTfR1 y el segundo interacciona con una porción de carga positiva sobre el hTfR1 (**Figura 73, D y E**).

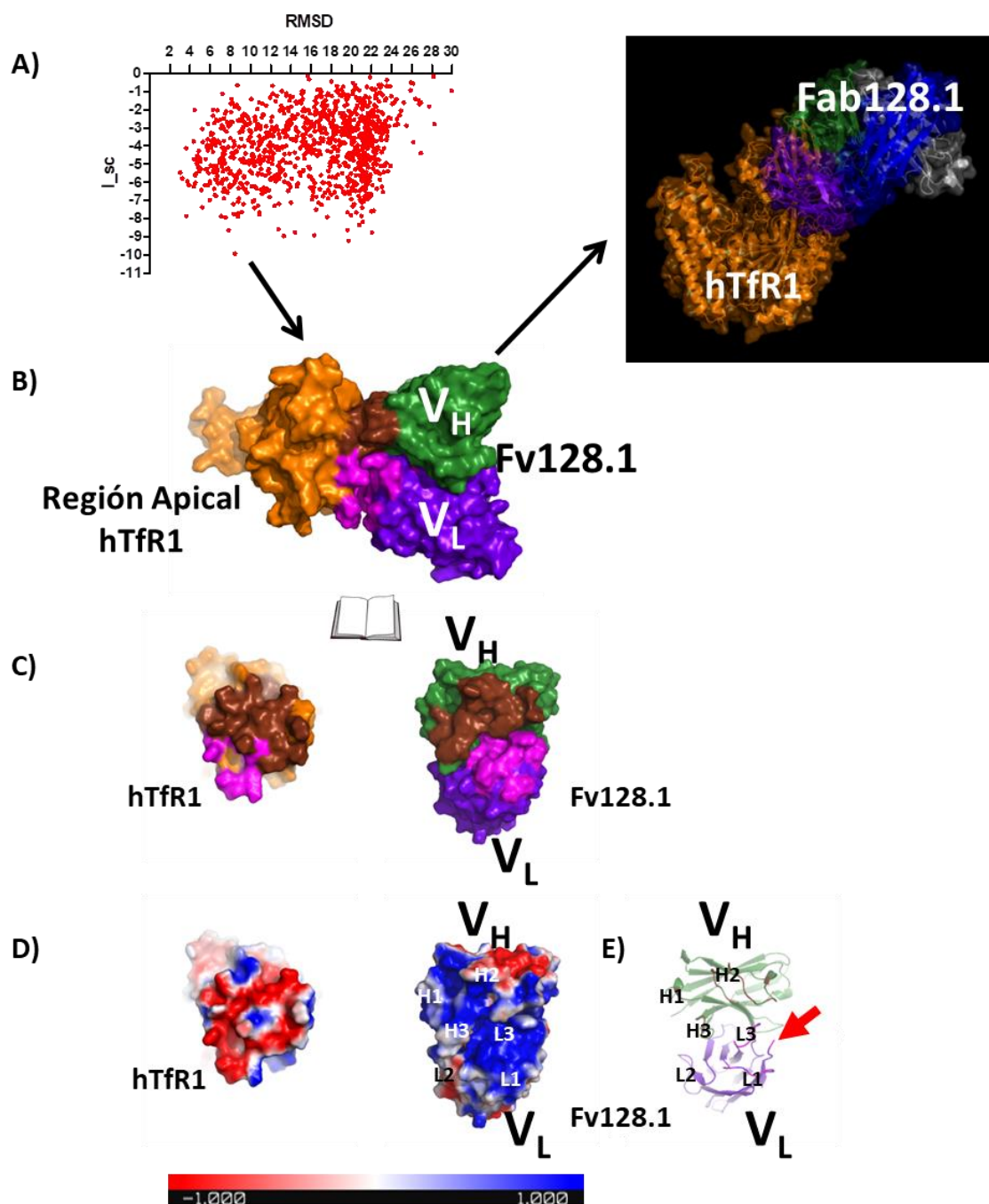


Figura 73. Resultado de Rosetta SnugDock para el complejo hTfR1-Fab128.1 y Potencial de superficie electrostática en la interface. A) Se representan con puntos cada uno de los 1.000 modelos evaluados por el servidor Rosetta SnugDock para el mejor resultado hTfR1-Fab128.1 del ClusPro: *cluster 000*. B) vista lateral del mejor modelo generado por Rosetta SnugDock (región apical de hTfR1 se muestra en naranja, la porción V_H en verde la V_L en violeta) con los aminoácidos implicados en la unión entre ambas moléculas que se muestran en marrón para la cadena pesada y magenta para la cadena liviana. C) Vista de las regiones implicadas en la unión entre las dos proteínas. D) Potencial de cargas superficie de ambas regiones (Se representa desde carga

negativa (rojo) hasta carga positiva (azul) en un rango de -1.000 a +1.000 T/e). E) representación de la misma región del Fv128.1 de (D) donde se muestra la molécula con esquema de cintas y se pueden apreciar los bucles que corresponden a cada uno de las regiones CDR. Con una flecha roja se marca el aminoácido que interviene en la unión con el hTfR1 y no se encuentra dentro de las regiones CDR de V_L.

El análisis de la interacción hTfR1-Fab128.1 también permitió identificar el solapamiento de 11 residuos de los sitios de unión de Fab128.1 y de GP1MACV con hTfR1 (**Figura 74**, A, B y C), donde la totalidad de los residuos sobre Fab128.1 que interaccionan se encuentran en la cadena pesada del Fv (**Figura 74**, D).

Luego se realizó un estudio de los aminoácidos del hTfR1 que serían claves en la unión con Fab128.1 según el modelo de docking hTfR1-Fab128.1 y los hallados en el experimento de mutagénesis dirigida realizando en el trabajo de Helguera y col. 2012 [92] (**Figura 75**). Se observó que de los 29 residuos sobre la superficie del hTfR1 que estarían involucrados en la interacción con el Fab128.1 según el modelo de docking que realizamos (**Figura 75**, A) 21 residuos se superponen con la región murina S324-S368 en la quimera hTfR1-mTfR1 de los experimentos de mutagénesis (**Figura 75**, C). Realizando un alineamiento entre las secuencias del hTfR1 y el mTfR1 (**Figura 76**), se pudo observar que de los 21 residuos que se superponen, 8 de ellos son diferentes en las secuencias de mTfR1 y hTfR1 (N348, D352, S355, D356, K358, T359, T362, R364) (**Figura 75**, E). Esto sugeriría que estos aminoácidos son críticos para la unión del anticuerpo ch128.1 sobre la superficie del hTfR1.

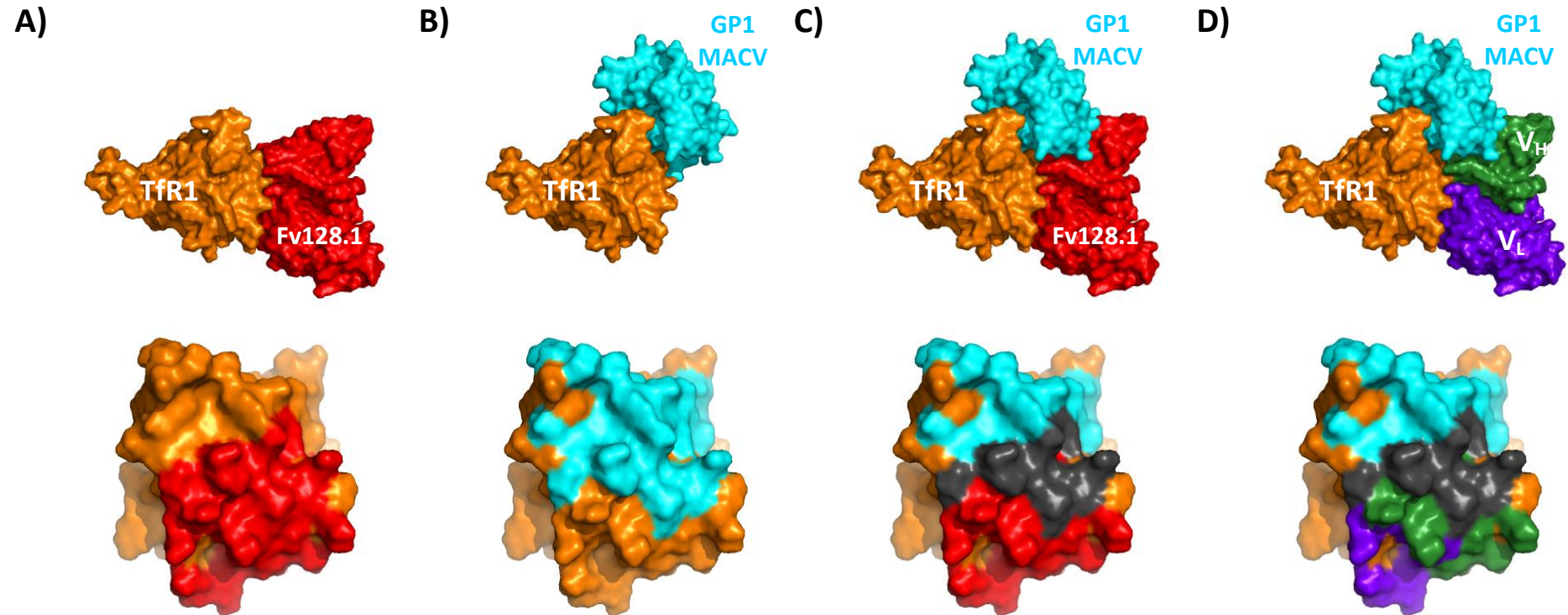


Figura 74. Regiones sobre la región apical del hTfR1 que interaccionan con el Fab128.1 y la GP1 de MACV. Se muestra la región apical del hTfR1 en color naranja, el Fab128.1 en rojo y la GP1 de MACV en Celeste. Arriba se muestran las interacciones entre el Fab128.1 y GP1 de MACV con la región apical del hTfR1. Abajo se muestran las regiones sobre la superficie del hTfR1 donde se une el Fab128.1 según los resultados finales de acoplamiento entre hTfR1-Fab128.1 en color rojo (29 aa) (A), la región sobre la superficie del hTfR1 donde se une la GP1 de MACV en color celeste (26 aa) (B), ambas regiones de unión en simultaneo sobre la superficie del hTfR1 donde se puede apreciar el solapamiento en los sitios de unión de ambas proteínas en color gris (11 aa) (C), la participación de la región V_H (verde) y V_L (violeta) sobre la unión al hTfR1 y el solapamiento del sitio de unión con la GP1 de MACV.

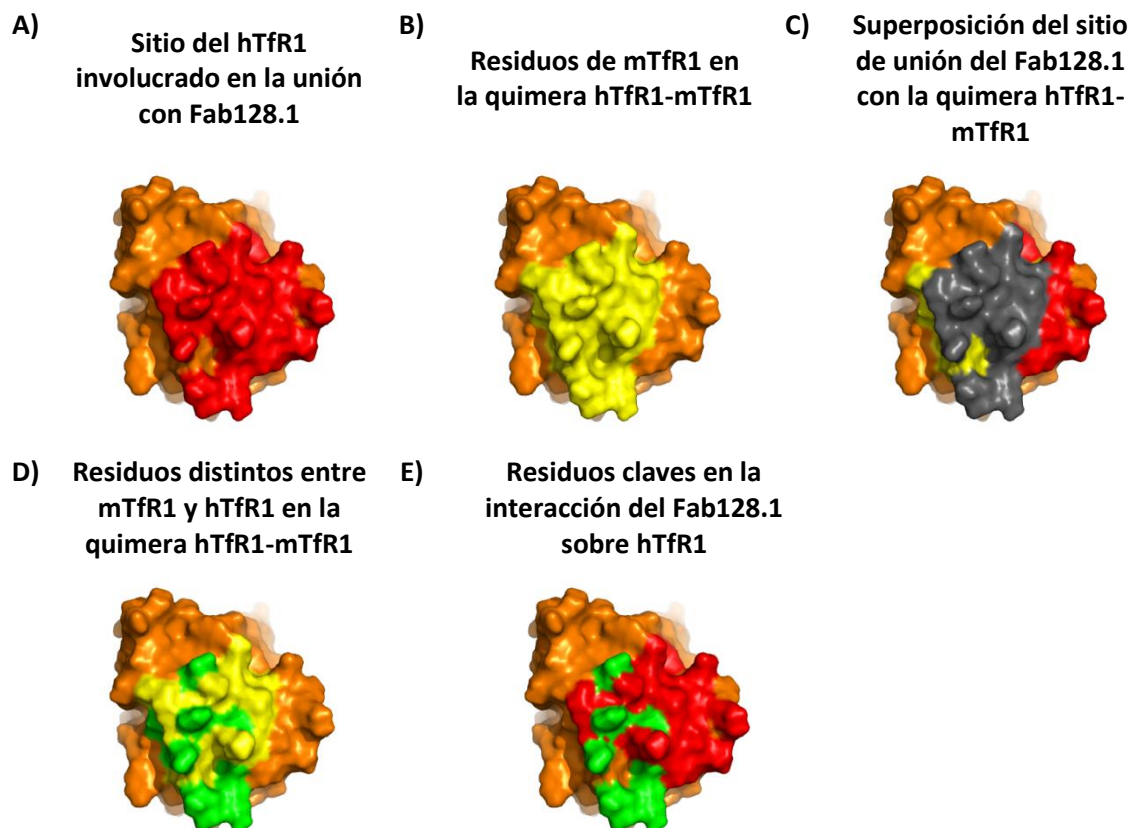


Figura 75. Estudio de los aminoácidos claves en la unión del Fab128.1 sobre el hTfR1 según los experimentos de mutagénesis dirigida y el modelado del complejo hTfR1-Fab128.1. Se muestra: A) la región involucrada en la unión del hTfR1 con el Fab128.1. Los aminoácidos que intervienen en la unión se señalan en color rojo (29 aa); B) Residuos de mTfR1 sobre la región apical del hTfR1 de la quimera hTfR1-mTfR1 utilizada en los experimentos de mutagénesis dirigida y que estarían involucrados en la unión con ch128.1. Los aminoácidos involucrados se muestran en color amarillo (45 aa); C) La superposición de A con B en donde los residuos compartidos por ambas regiones se muestran en color gris (21 aa); D) la misma región que en B, con los aminoácidos distintos entre las secuencias de mTfR1 con respecto a la secuencia de hTfR1, en color verde (12 aa); E) la región del hTfR1 involucrada en la unión con el Fab128.1 (color rojo) y los residuos que son diferentes en mTfR1 y además intervienen en dicha unión (color verde, 8 aa).

Por otro lado, utilizando la estructura cristalográfica del Fab128.1 se modeló por homología utilizando el programa SWISS MODEL la estructura de la secuencia variable Fv2014, la cual difieren en 8 residuos (ver **Figura 28**). Esto permitió estudiar el rol de estas pocas diferencias en la región variable entre las dos estructuras (**Figura 77**). De forma similar a lo realizado anteriormente, se realizó un estudio del potencial de cargas electrostáticas en la superficie utilizando la función *APBS Electrostatic* de PyMOL. Se pudo apreciar un cambio importante en la densidad de cargas sobre las regiones de ambas proteínas que interaccionarían con el hTfR1.

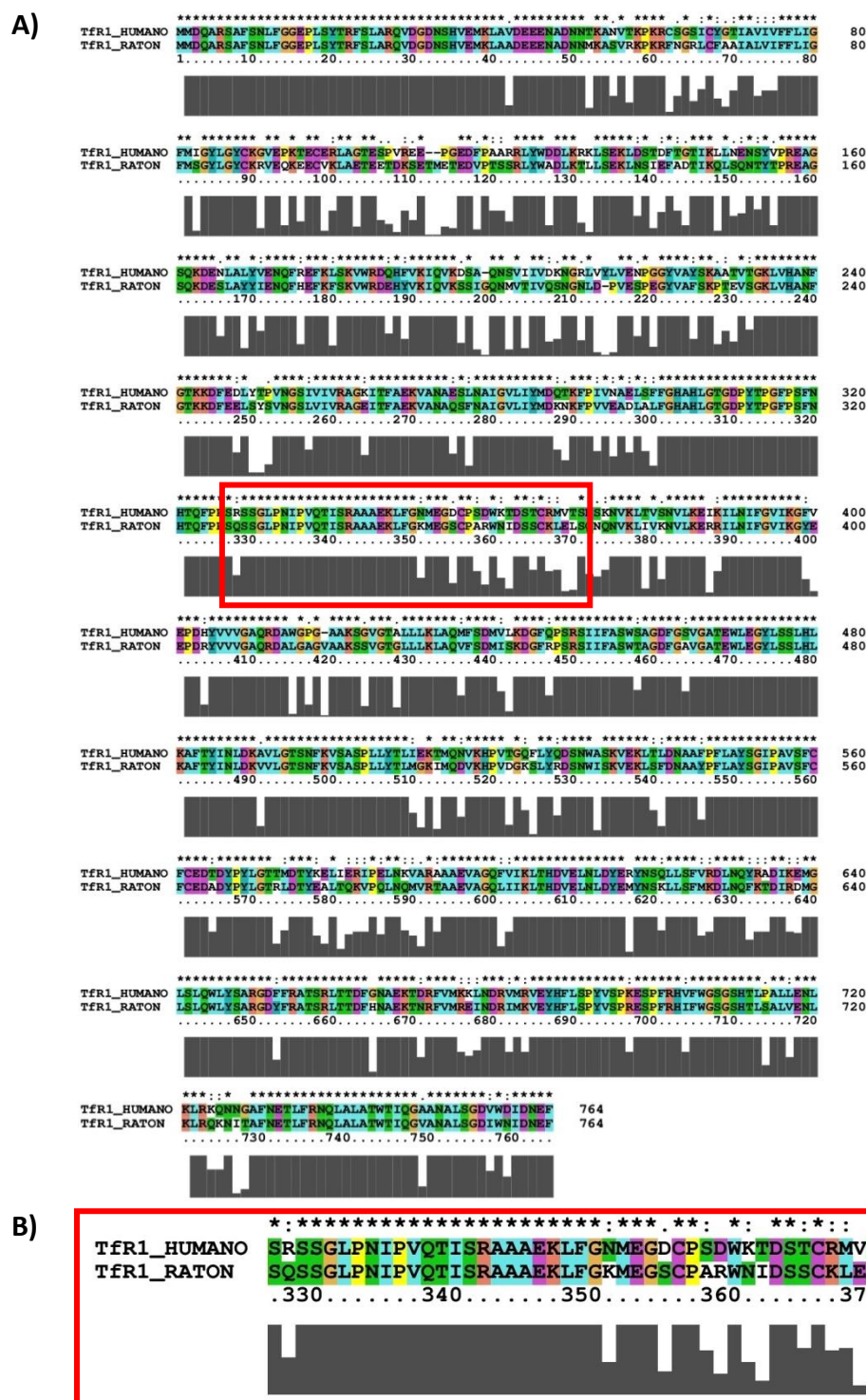


Figura 76. Alineamiento de secuencias hTfR1 vs mTfR1. A) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del hTfR1 (UniProtKB - P02786) vs mTfR1 (UniProtKB - Q62351) utilizando el programa CLUSTALX2.1. B) Región del hTfR1 implicada en la unión del anticuerpo ch128.1 según los experimentos de mutagénesis dirigida de Helguera y col. 2012 (región S324-S368) [92].

Sobre el Fv2014 se observó una región con densidad de carga negativa sobre el CDR-L1 mientras que para el Fv2016 el mismo bucle se encuentra con densidad de carga positiva. Este cambio drástico en la densidad de carga se debe a la mutación de un solo residuo: un ácido aspártico

(D30) por una Arginina (R30), los cuales poseen propiedades fisicoquímicas opuestas (el ácido aspártico es ácido y posee carga negativa mientras que la Arginina es básico y tiene carga positiva). Esto sugiere que el solo cambio de este residuo en la posición 30 podría explicar la pérdida de la capacidad de unión del Fv2014 sobre el hTfR1.

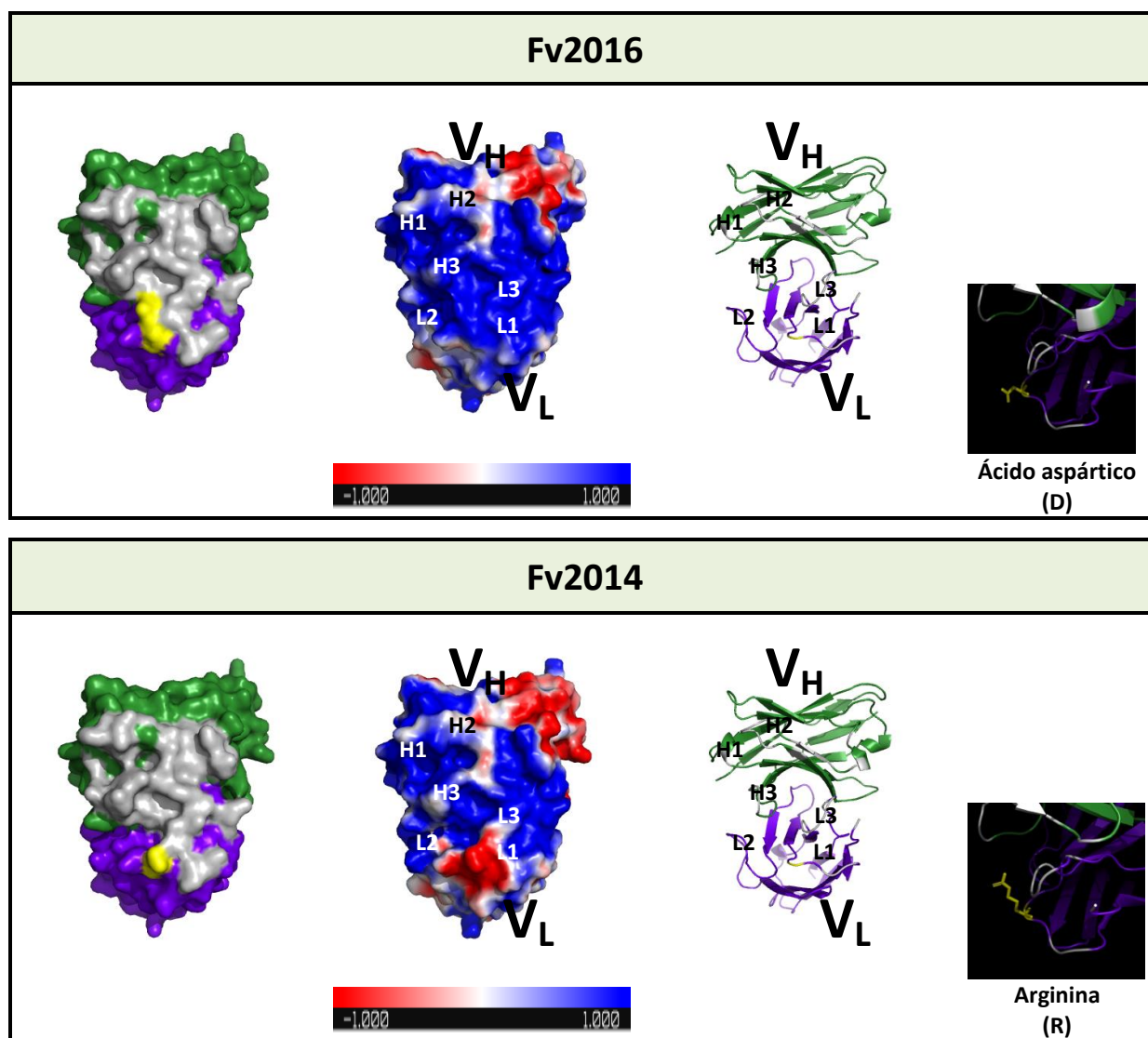


Figura 77. Estudio de las diferencias en el potencial electrostático de superficie sobre las estructuras de las dos secuencias Fv del anticuerpo ch128.1 (Fv2014 y Fv2016). La región que interviene en la unión entre el hTfR1 y el Fab128.1 (color gris) que posee la secuencia Fv2016, se comparó con la región homóloga sobre la estructura de un modelo del Fv2014 generado utilizando como templado la estructura cristalográfica del Fab128.1 con el servidor *SWISS MODEL*. El residuo que interviene en la unión con el hTfR1 y que se encuentra mutado en el Fv2014 con respecto al Fv2016 se muestra en amarillo. El potencial de cargas superficie de ambas regiones se representa desde carga negativa (rojo) hasta carga positiva (azul) en un rango de -1.000 a +1.000 T/e.

5. DISCUSION

Las FHS son una familia de graves enfermedades infecciosas que incluyen las Fiebres Hemorrágicas Boliviana, Chapare, Venezolana, Brasileña y FHA, y sus agentes etiológicos son los Mamarenavirus MACV, CHAV, GTOV, SABV y JUNV, respectivamente. Todos estos Mamarenavirus pertenecen a la clase B de los Mamarenavirus del Nuevo Mundo. Debido a su capacidad de propagarse de persona a persona, su alta infectividad y mortalidad, constituyen una seria amenaza como potenciales agentes de bioterrorismo, por lo que son clasificados como agentes patógenos de Categoría A por el NIAID de los EE.UU. [4]. A esto se suma que no hay tratamientos eficaces ni vacunas para las FHS causadas por los virus MACV, GTOV, CHAV y SABV [5]. Solo hay una vacuna llamada CANDID #1 [197, 198] y tratamiento eficaz para la FHA, la cual consiste en la inmunoterapia pasiva con el plasma de pacientes convalecientes [199, 200].

Debido al riesgo asociado a la realización de estudios con las cepas patogénicas de estos virus, es necesario para su manipulación utilizar protocolos de máxima seguridad en instalaciones de bioseguridad nivel 4. Esto requiere infraestructura con muy alto costo por el riesgo de infección de los operadores, por lo tanto, es conveniente utilizar un modelo no patogénico que permita el estudio de los virus con seguridad para el operador y a un menor costo con bioseguridad nivel 2 [201]. Los modelos de pseudovirus no patogénicos decorados con las proteínas del virus que participan en la unión con la célula diana son ampliamente utilizados. Estos se han generado y tienen gran aplicación para estudiar la biología celular y molecular del Ébola [189, 202], la Malaria [190], las FHS [71, 92] y la Influenza A [203] entre otras enfermedades infecciosas. También estos sistemas, tienen la ventaja de ser genéticamente similares, mejorando la precisión y la reproducibilidad de los ensayos [204]. En nuestro laboratorio contamos con un sistema de pseudovirus proporcionado por la Dra. Choe que consiste en partículas pseudovirales decoradas con el complejo GP1/GP2 de cada uno de los Mamarenavirus patógenos causantes de las FHS y que tienen la capacidad de inducir la expresión de una proteína fluorescente (GFP) una vez que son internalizados en las células huésped [71, 92]. Este modelo ha sido utilizado anteriormente en varios trabajos para el estudio de los mecanismos de entrada de los virus a la célula huésped, establecer los determinantes estructurales que intervienen en este mecanismo, y para el diseño racional de fármacos que protejan contra estos agentes infecciosos. Sin embargo, hasta el momento el sistema de pseudovirus nunca habían sido empleado para el estudio *in vitro* de la respuesta al tratamiento con inmunoterapia pasiva con el plasma de pacientes convalecientes del JUNV. En estos plasmas, el título de AcNT se define como la inversa de la dilución de plasma que es capaz de reducir la formación de placas en un 80% utilizando una cepa atenuada de JUNV [199].

En este trabajo se evaluó el modelo de internalización de pseudovirus de JUNV en células humanas HEK-293T, en presencia de diluciones seriadas de plasmas de pacientes convalecientes con

títulos de AcNT de 10.240 y de 320. Se observó una inhibición significativa de la internalización en células humanas de los pseudovirus de JUNV en diluciones de hasta 1:2.000 y 1:200 para los plasma con título 10.240 y de 320, respectivamente (**Figura 24**). Hay que destacar que utilizando el modelo de pseudovirus obtuvimos un 80% de bloqueo de la internalización por cálculo de EC_{80} con una dilución aproximada de 1:3300 del plasma con título 10.240 y una dilución de 1:76 para el plasma con título 320. Por lo tanto, la relación entre nuestro modelo de pseudovirus y el ensayo de infectividad mediante formación de placas en células Vero, que es el ensayo utilizado en la actualidad para la determinación del título de AcNT en los plasmas de pacientes convalecientes de FHA, es de aproximadamente 3,5 veces menor. Esto sugiere que el modelo *in vitro* de pseudovirus es un modelo adecuado para evaluar la respuesta a agentes terapéuticos contra la FHA, aunque con menor sensibilidad que el ensayo de formación de placas.

Sin embargo, el sistema de pseudovirus tiene la ventaja de permitir comparar un mismo tratamiento con distintos virus de la misma familia. En este sentido y con el fin de comparar la actividad cruzada del plasma de pacientes convalecientes de FHA sobre los otros miembros de la familia de las FHS; realizamos el mismo experimento de internalización de pseudovirus pero utilizando esta vez partículas pseudovirales decorados con el complejo GP1/GP2 de MACV, GTOV, SABV y CHAV. En este caso, se observó que el plasma de pacientes convalecientes de FHA previene en mucha menor medida, la internalización de pseudovirus de MACV y GTOV, con respecto a JUNV. Con estos pseudovirus solo se observó efecto a diluciones 1:20; mientras que para CHAV y SABV no se observaron diferencias significativas en todas las diluciones. Estos resultados sugieren que el tratamiento cruzado con inmunoterapia pasiva utilizando plasma de pacientes convalecientes para la FHA no sería eficaz contra las Fiebres Hemorrágicas Boliviana y Venezolana. Esto es debido a que los volúmenes de plasma estimados para lograr alcanzar similares porcentajes de bloqueo que para JUNV serían mayores para tratar la FHB y la FHV. La ausencia actividad sobre la internalización de pseudovirus de SABV y CHAV sugiere también que las Fiebres Hemorrágicas Brasileña y de Chapare tampoco podrían tratarse de forma eficaz con el plasma de pacientes convalecientes de FHA. En este sentido, es interesante que al estudiar la identidad de las secuencias de las GP1 de estos Mamarenavirus con respecto a JUNV se pudo observar una correlación significativa entre la identidad de las secuencias de las GP1 de MACV, GTOV, SABV, CHAV y la JUNV, con la capacidad del plasma de pacientes de FHA de bloquear la internalización de pseudovirus.

Pese a ser al único tratamiento eficaz que existe en la actualidad para el tratamiento de la FHA, el plasma de pacientes convalecientes presenta limitaciones significativas: a) no muestra eficacia en pacientes con más de 8 días de evolución [38]; b) plantean el riesgo de enfermedades transmitidas por transfusión [39]; c) no es eficaz para los pacientes gravemente enfermos que progresan a una

fase neurológica-hemorrágica [9]; y d) se plantean dificultades para mantener un stock adecuado de plasma inmune [9, 34]. En los últimos años se siguen reportando casos de FHA con un promedio 20 muertos por año, lo que equivale a 7% de mortalidad en los últimos 8 años [17-20, 22-25]. El hecho que el plasma de pacientes de FHA no funciona en la instancia en que la enfermedad evoluciona a una fase neurológica grave, podría ser debido a que los Mamarenavirus de las Fiebres Hemorrágicas tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica e infectar a las células del sistema nervioso central [205, 206]. Se observó que en modelos *in vivo* el tratamiento con plasma de pacientes no reduce la carga viral en el sistema nervioso central comparado con los ratones tratados con plasma sin título de AcNT [205]. Aunque la IgG sérica atraviesa la barrera hematoencefálica, se encuentra en el líquido cefalorraquídeo a 0,1-0,01% de la concentración encontrada en el suero [207, 208]; la experiencia clínica junto a las pruebas en el modelo de cobayo indican que la concentración reducida es insuficiente para el beneficio terapéutico. Esto sugiere que nuevas terapias contra las FHS sean necesarias.

Debido al rol fundamental que cumplen las GP1 virales en la interacción con el receptor hTfR1 sobre la superficie de las células hospedadoras, los AcNT se dirigen en su mayoría contra la superficie de GP1 en las regiones que interactúan con el hTfR1 [40]. Actualmente, los esfuerzos de investigación se centran en el desarrollo de anticuerpos monoclonales neutralizantes seleccionados contra las GP1 del virus Junín; los cuales son eficaces contra JUNV, pero no contra MACV, CHAV, GTOV y SABV [34, 40, 209]. Hay evidencia que sugiere que la pobre reactividad cruzada de AcNT entre Mamarenavirus de esta familia podría deberse a que las glicoproteína de los miembros de esta familia presentan diferencias en la accesibilidad al sitio de unión con el receptor de entrada [41]. Nuestros estudios aquí presentados con plasma policlonal de pacientes convalecientes de FHA muestran muy baja reactividad cruzada con los pseudovirus de las otras FHS. Esto, sumado a la baja identidad de secuencia de las GP1 de los Mamarenavirus patogénicos **Figura 26**, sugiere que sería muy difícil generar un anticuerpo monoclonal neutralizante dirigido hacia un epítipo conservado en la región de las GP1 de todos los Mamarenavirus patógeno que interacciona con el TfR1 que tenga reactividad cruzada y así tratar de forma polivalente a todas las FHS.

El descubrimiento de que la entrada a la célula de los Mamarenavirus Sudamericanos patógenos ocurre vía endocitosis uniéndose al hTfR1 [71], convirtió a este receptor en un atractivo blanco molecular para el desarrollo de agentes bloqueantes inhibidores de entrada de virus. Con este propósito, recientemente se ha reportado el desarrollo de aptámeros (ADN simple cadena) que se unen al dominio apical de hTfR1 y pueden bloquear hasta 90% internalización de MACV, pero solo el 70% de JUNV y no ha sido probado contra otros Mamarenavirus [96]. Por otro lado, se demostró que el AcM ch128.1 contra hTfR1 tiene actividad inhibidora de entrada de virus polivalente, ya que es

capaz de bloquear en más de 90% la internalización de pseudovirus de MACV, JUNV, CHAV, GTOV y SABV; y reducir la infectividad de una cepa atenuada de JUNV [92]. Este anticuerpo se une al dominio apical de hTfR1 [92] y no compete con transferrina y HFE, que son los ligandos naturales del receptor [86, 101-103]. Sin embargo ch128.1 se diseñó con isotipo inmunoglobulina IgG3 humano, y un inhibidor de entrada de virus dirigido a un target ubicuo como hTfR1 con este isotipo tendría grandes desventajas debido a que tanto las IgG3 inducen una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) [108]. Por lo tanto, en esta tesis se propuso generar anticuerpos anti-hTfR1 con la secuencia variable del anticuerpo ch128.1 con mínima o nula actividad efectora para utilizarse como un inhibidor de entrada de virus polivalente para MACV, CHAV, GTOV, SABV y JUNV. Este abordaje para el tratamiento de enfermedades virales es novedoso debido a que no existen hasta el momento muchos ejemplos de esta estrategia. El único anticuerpo que actúa como inhibidor de entrada de virus que se encuentra en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento del HIV es el llamado Ibalizumab. Este anticuerpo Inhibe la internalización del virus de HIV mientras conserva o incluso aumenta los recuentos de células T CD4 como se demostró *in vitro* y en estudios *in vivo* [210-212]. Ibalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 dirigido contra CD4, que es el receptor celular primario sobre la célula target para la entrada del VIH-1 [213]. Ibalizumab interfiere con la entrada viral del VIH previniendo que la proteína del virus gp120 unida a CD4 interactúe con CCR5 o CXCR4 [214]. Los primeros ensayos clínicos han demostrado una eficacia antiviral significativa con una reducción menor a 1 log₁₀ en la carga viral cuando se administran en monoterapia. Su larga vida media, que permite la dosificación semanal, y su administración como una infusión intravenosa, lo diferencian de otros agentes antirretrovirales actualmente disponibles [215].

Siguiendo los antecedentes de Ibalizumab, nos propusimos generar un anticuerpo completo con isotipo IgG4 con la región variable del anticuerpo ch128.1 como inhibidor de entrada de virus para el tratamiento de las FHS. Desarrollamos los vectores para la producción del anticuerpo con isotipo IgG4 y con regiones variables del anticuerpo ch128.1 (Fv2014), que denominamos ch128.1g4, utilizando un sistema de expresión de anticuerpos utilizado anteriormente para la producción de anticuerpos en células en suspensión [216]. Se construyeron los vectores, pero luego de transformar y seleccionar clones resistentes al marcador de selección, no se logró obtener clones con una productividad lo suficientemente alta como para poder detectarlos por ELISA sándwich. Debido al alto costo de producción de los anticuerpos completos en células de mamífero y la baja productividad del sistema de expresión de anticuerpos con el que contábamos, sumado al problema que presentan los anticuerpos con isotipo IgG4 de tienden intercambiar cadenas pesadas (*arm-swap*) con otros anticuerpos con isotipo IgG4 de distinta especificidad, dando lugar a anticuerpos

biespecíficas [217], y a que se ha demostrado que anticuerpos contra el hTfR1 son capaces de pasar la barrera hematoencefálica con mayor eficiencia cuando se encuentra como una molécula monomérica debido al fenómeno de *crosslinking* producido por las moléculas bivalentes [218]; se decidió generar moléculas monovalentes simple cadena de regiones variables (scFv) del anticuerpo 128.1.

Los scFvs cuentan con algunas características que resultan convenientes para nuestra estrategia dirigida a un receptor humano con respecto al anticuerpo completo: 1) Al carecer del dominio Fc, no inducirían citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) [108], actividades inflamatorias que pueden dañar a células sanas que expresan hTfR1; 2) no tienen sitio de glicosilación, por lo tanto, pueden ser expresados en bacterias disminuyendo así los costos de desarrollo y producción; 3) como son moléculas monovalentes no inducirían una regulación negativa de hTfR1 en membrana producto del fenómeno de *crosslinking*, lo que beneficiaría también el paso de la barrera hematoencefálica con mayor eficiencia [218].

El impacto de la ausencia del dominio Fc se reflejaría negativamente en una significativa reducción de peso molecular (~27 kDa) y en que, a diferencia de una IgG completa, los fragmentos de anticuerpo no son capaces de unirse al FcRn, el receptor de retención de las inmunoglobulinas, por lo que su vida media es mucho más corta, llegando al término de horas en lugar de días [108]. Sin embargo, estas limitaciones eventualmente se podrían resolver incorporando una transformación química de PEGuilación de la proteína para extender así su vida media, estrategia ampliamente utilizada para extender la vida media de biofármacos de bajo peso molecular [219, 220]. Un ejemplo de ello, es el anticuerpo Cimzia (Certolizumab pegol, UCB) un Fab anti-TNF α PEGuilado que fue aprobado en 2008 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn [133].

Por otro lado, los anticuerpos monovalentes exhiben una disminución de la avidéz, comparada con las IgG completas [108], pero que en nuestro caso no tendría mayor impacto dada la alta afinidad, en el rango nanomolar, de la región variable de ch128.1 [92]. También se ha reportado que anticuerpos anti-hTfR1 en la forma bivalente ch128.1 y en la tetravalente ch128.1-Av puede inducir *crosslinking* y reducir los niveles de receptor en la superficie en células que sobre-expresan hTfR1, induciendo citotoxicidad y afectando los niveles de hierro en éstas células [101, 103-105], pero no en otros tipos celulares que expresan el receptor en bajos niveles [101-103]. Debido a esto, una hipótesis posible para explicar el efecto de disminución de la internalización de los pseudovirus de los Mamarenavirus patógenos en presencia del anticuerpo ch128.1, es que su efecto no se deba al bloqueo de la interacción del virus con el receptor, sino que ch128.1 induzca el *crosslinking* del

hTfR1, disminuya la disponibilidad de receptor funcional en la superficie y de esta forma reduzca la interacción con las GP1 virales, resultando en la inhibición de la internalización observada.

Teniendo en cuenta las ventajas, limitaciones y riesgos de abordar el desarrollo de un fragmento de anticuerpo como inhibidor de entrada de virus contra las FHS, se optó por generar un scFv en células procariotas. Los dominios V_H y V_L se pueden fusionar genéticamente a través de un péptido flexible enlazador en un módulo único (aprox. 30 kDa), llamado scFv. En un scFv, la asociación y orientación apropiadas de los dominios V_H y V_L para formar el parátipo de unión al epítipo, dependen casi en su totalidad por la interfaz hidrofóbica entre los dos dominios variables. Las caras hidrofóbicas de los dominios V_H y V_L pueden disociarse entre sí y asociarse con otras superficies hidrofóbicas. Esto limita la solubilidad de scFvs y aquí subyace en algunos casos su inestabilidad y tendencia inherente a agregarse [221]. Debido a estos problemas, en la literatura hay mucha variabilidad con respecto a los protocolos a seguir para la producción de scFv en *E. coli*. Hay trabajos donde los producen en forma soluble [222, 223], como cuerpos de inclusión [191, 224], fusionados a péptido como MBP en citoplasma [225] o en el periplasma [226]; o también co-expresando el scFv con proteínas chaperonas [227]. Esto podría estar asociado a la naturaleza de cada región variable en particular y también, se ha descripto que el ambiente en el cual se expresa el scFv es importante al momento de producir scFv de forma soluble en *E. coli* [228].

En este contexto en este trabajo se desarrollaron scFvs del anticuerpo 128.1 utilizando las dos secuencias Fv2014 y Fv2016 que contábamos para la región variable de cadena pesada y liviana, optimizando los vectores para su expresión en el espacio periplásmico de bacterias *E. coli*. Ambas secuencias difieren en 1 delección y 7 mutaciones, pero 2 de las mutaciones se encuentran en las regiones CDRs, con lo cual podían afectar la unión del anticuerpo con el hTfR1. Se desarrollaron los vectores para producir el scFv128.1-2014, se expresó la proteína en *E. coli* y se purificó, pero al evaluar su unión sobre el sTfR1 por ELISA se determinó que el fragmento no era capaz de unirse al hTfR1. Esto nos sugirió que la secuencia Fv2014 no era la secuencia correcta, pero en esta instancia no fue posible establecer el rol de los aminoácidos mutados en la pérdida de la especificidad contra el hTfR1.

A continuación se construyó el vector para generar el fragmento simple cadena con la región variable Fv2016 del anticuerpo 128.1, se transformaron bacterias, se indujo su expresión, pero no se logró purificar el scFv128.1-2016 de forma soluble con buena productividad y pureza. Solo se logró purificar con alta rendimiento y pureza el scFv128.1-2016 desnaturalizado proveniente de cuerpos de inclusión. Sin embargo, el procedimiento con alta concentración de urea y diálisis para renaturalizar la proteína a su conformación nativa en forma soluble, no logró prevenir la formación de agregados.

Como ya se mencionó anteriormente, el scFv128.12014 y el scFv128.12016 se diferencian en tan solo una delección y 7 mutaciones de un total de 252 residuos. Sin embargo al momento de producir el scFv en el espacio periplásmico de bacterias *E. coli*, fue posible generar proteína soluble de scFv128-2014 mientras que utilizando las mismas condiciones de cultivo, no fue posible obtener al scFv128.1-2016 de forma soluble. Uno de los indicios de estos cambios es la diferencia del pI con un pI=7,3 para el scFv128.1-2014 a un pI=8,0 para el scFv128.1-2016. Estos experimentos sugieren que esas mutaciones lograron cambiar las propiedades fisicoquímicas de las moléculas del scFv, dando origen a los problemas de estabilidad.

En la literatura se ha reportado que la fusión de péptidos ayuda en muchos casos a aumentar la solubilidad de los scFvs [225]. Por lo tanto, con el fin de favorecer la producción del scFv128.2016 en forma soluble, se construyó el vector para generar una proteína de fusión del scFv128-2016 con MBP para la expresión en citoplasma de *E. coli*. Sin embargo, luego de la transformaron de las bacterias y selección de clones resistentes al factor de selección; se indujo la expresión de la proteína recombinante, pero no se lo logró purificar debido a la presencia de varias proteínas contaminante en las eluciones luego de la purificación utilizando columnas de cromatografía de afinidad.

Ante las dificultades enfrentadas para producir la proteína recombinante del fragmento monovalente con la región variable de ch128.1 en células procariotas, se optó por realizar los estudios de prueba de concepto con el fragmento monovalente Fab producido por la digestión con papaína del anticuerpo ch128.1 con isotipo IgG1. El fragmento Fab128.1 se obtuvo en forma soluble y se observó que se une al hTfR1 de diferentes formas: de forma soluble (sTfR1) por ELISA y por cromatografía de exclusión por tamaño, sobre células que expresan hTfR1 en la superficie en forma recombinante (CHO TRVb-1) y en forma nativa en células humanas (HEK-293T). La unión del Fab128.1 al hTfR1 bajo distintas condiciones sugiere que la falta de avidéz producto de la monovalencia no afectaría la capacidad de interactuar efectivamente con hTfR1. A continuación se estudió la capacidad de inhibir la internalización de pseudovirus de FHS con el mismo ensayo antes descripto para el plasma de pacientes convalecientes, pero esta vez incubando a los pseudovirus en presencia del fragmento monovalente Fab128.1. Se pudo observar que el Fab128.1 fue capaz de inhibir la internalización de todos los Mamarenavirus causantes de las FHS *in vitro* y que esta inhibición alcanzó valores de IC₅₀ entre 1.63 – 5.18 nM. Por lo tanto, estos estudios sugieren que pese a su menor avidéz, un anticuerpo monovalente sería suficiente para inhibir la internalización de virus y que su mecanismo de acción consistiría principalmente en competición por el sitio de unión de las GP1 de los Mamarenavirus responsables de las FHS. Por otra parte, el rol del fenómeno de *crosslinking* no sería fundamental para la inhibición de la internalización de los pseudovirus en la línea humana HEK-293T utilizada. Sería interesante realizar estos estudios en otras líneas con

distintos niveles de hTfR1 para establecer el rol del *crosslinking* en la inhibición de la internalización de los pseudovirus. Estos estudios sugieren que sería factible generar un anticuerpo monovalente con la región variable del anticuerpo ch128.1 que constituya una terapia eficaz y segura contra los Mamarenavirus causantes de todas las FHS: MACV, GTOV, CHAV, SABV y JUNV.

Los estudios descriptos hasta ahora han provisto evidencia de que una proteína con la región variable de ch128.1 puede bloquear la internalización de pseudovirus de los Mamarenavirus de las FHS, pero aún no permiten entender como realizan esta actividad. La amplia aplicación que tienen los anticuerpos monoclonales en la investigación biomédica es debido a su complementariedad estereoquímica con antígenos específicos. La determinación de la base estructural de la especificidad anticuerpo-antígeno es importante para comprender el mecanismo de reconocimiento inmune y el diseño racional de biofármacos, vacunas sintéticas y anticuerpos con nuevas selectividades. Algunos aspectos del proceso de reconocimiento siguen sin estar claros. La determinación de las estructuras cristalinas de rayos X de varios anticuerpos no ligados, de antígenos aislados y de sus complejos han permitido una comprensión avanzada de la naturaleza de las interacciones anticuerpo-antígeno [195, 229, 230]. Dichos estudios han demostrado que los enlaces de hidrógeno, puentes salinos y fuerzas de van der Waals tienen un papel crítico en el reconocimiento, pero pueden también requerirse cambios conformacionales inducidos en el anticuerpo, en el antígeno o en ambos [181]. La creciente comprensión de las relaciones secuencia-estructura en anticuerpos, y los avances en el modelado computacional de proteínas, han permitido el progreso hacia métodos *in silico* que pueden ayudar a rediseñar anticuerpos para mejorar su afinidad u otras modificaciones deseadas [231]. En los casos en que se desconoce la interacción de unión entre anticuerpo y antígeno, los métodos de acoplamiento proteína-proteína pueden usarse para predecir la estructura de complejos, aunque esto sigue siendo un desafío, especialmente cuando se usan estructuras modeladas por homología para el anticuerpo o el antígeno [232]. También, usando estructuras determinadas experimentalmente o predichas del complejo anticuerpo-antígeno, los métodos computacionales pueden usarse para predecir mutaciones que pueden mejorar la afinidad de unión, la especificidad u otras propiedades tales como la solubilidad [233].

La interpretación mecánica de la interacción antígeno-anticuerpo con frecuencia requiere detalles a nivel atómico, que idealmente se obtienen mediante cristalografía de rayos X. Con este propósito, se evaluó *in silico* la cristalizabilidad de todas las proteínas diseñadas con la región variable del anticuerpo ch128.1 (scFv128.1-2014, scFv128.1-2016, MBP-scFv128.1-2016 y el Fab128.1). Se pudo observar que, en líneas generales, ninguna de las proteínas es fácil de cristalizar debido a que presentan valores muy cercanos a los límites que describen una menor probabilidad de obtener cristales. Sin embargo, es interesante remarcar las diferencias en estos parámetros entre las

proteínas con la región variable Fv2016 y la Fv2014 que presenta unas pocas mutaciones en su secuencia la cual presentó valores de cristalizabilidad más promisorios. Esto es una clara evidencia de cómo unos pequeños cambios en la secuencia de la proteína pueden cambiar las propiedades fisicoquímicas y marcar la diferencia a la hora de la obtención de cristales [234]. Sin embargo, pese a los bajos valores de cristalizabilidad predichos para el Fab128.1, se lograron generar cristales de esta proteína de la suficiente calidad para obtener una densidad electrónica con una resolución de 2,599 Å. De esta forma, se pudieron conocer las estructuras de los CDRs de la región variable del anticuerpo 128.1, y por modelado de cargas electrostáticas de superficie se identificó un bolsillo electropositivo en la región variable que incluye a 5 de los 6 CDRs. La técnica de cristalografía de rayos X permite también identificar la secuencia de la proteína cuya estructura estamos estudiando [196]. Con la información estructural del Fab128.1 se realizó un alineamiento de su secuencia con la de la región variable Fv2016, observando un 100% de identidad. De esta forma se confirmó que la secuencia Fv2014 era la incorrecta y que la falta de unión del scFv128.1-2014 sobre el hTfR1 se debería a las mutaciones que presentaba respecto a la secuencia de scFv128.1-2016, que coincide con la del Fab128.1.

En nuestro caso particular, la interacción de ch128.1 con el dominio apical de hTfR1 tiene particular relevancia, ya que sería la responsable de bloquear la interacción de los GP1 de los Mamarenavirus responsables de las FHS con el receptor y la identificación de los residuos de los ligandos que participan en esta interacción explicaría esta actividad funcional. Sin embargo, como no tenemos disponible el cristal de este complejo, una opción disponible es la utilización de métodos de modelado computacional para acoplamiento o “docking” [235]. Estos modelos computacionales emplean algoritmos que a partir de las estructuras de las proteínas componentes, intentan determinar la estructura de sus complejos, con una precisión cercana a la proporcionada por la cristalografía de rayos X [151]. En este trabajo de tesis se utilizaron métodos *in silico* para predecir el epítipo molecular, en combinación con datos de mutagénesis dirigida sobre hTfR1 y estudios de cristalografía del complejo hTfR1-GP1MACV que se encuentra en bases de datos en línea (*Protein Data Bank código* 3KAS). La estructura cristalina de Fab128.1 se usó para modelar el *docking* con la estructura de hTfR1 utilizando el servidor ClusProV2.0. Esto se realizó incluyendo una máscara de atracción con los datos de mutagénesis dirigida publicados previamente [92] donde se determinó que el segmento con los residuos S324-S368 del dominio apical de hTfR1 es crítico para la unión del anticuerpo ch128.1. ClusPro realiza tres pasos computacionales: (i) docking de cuerpo rígido mediante el muestreo exhaustivo de 10^9 - 10^{10} conformaciones utilizando PIPER [161], un programa de acoplamiento basado en el enfoque de correlación de transformada rápida de Fourier (FFT); (ii) agrupamiento basado en la raíz cuadrada-media cuadrada (RMSD) de las 1.000 estructuras

generadas que muestren menor energía, para encontrar los *clusters* más grandes que representarán los modelos más probables del complejo; y (iii) refinamiento de las estructuras seleccionadas utilizando minimización de energía [186].

Para refinar el modelo del complejo generado por Cluspro, posteriormente se tomó el mejor resultado obtenido con este servidor (cluster 000) y se realizó un nuevo paso de acoplamiento proteína-proteína pero esta vez utilizando el servidor Rosetta SnugDock. Este servidor tiene la opción de refinamiento de acoplamiento local y flexibilización de las cadenas de los bucles de los CDRs de las regiones V_H y V_L [187]. Tomando el modelo con menor *score* de energía generado con Rosetta SnugDock y el análisis con el programa Pymol, se pudo identificar el sitio que participaría en la interacción entre el TfR1 y el Fab128.1. Se identificaron 24 residuos del Fab128.1 que interaccionarían con 29 residuos del dominio apical del hTfR1; también según este modelo de acoplamiento, se pudo observar que el CDR-L2 no tendría una participación activa en la unión con el hTfR1. Esto coincidiría con el modelado de carga electrostática de superficie ya que el CDR-L2 sería el único que exhibe una carga neutra.

El bloqueo del sitio de unión de un anticuerpo a una proteína que actúa como ligando sobre un receptor puede estar dada por varios mecanismos: a) Puede existir un solapamiento de las regiones que intervienen en la unión entre ambas proteínas [236] o b) estas regiones pueden no solaparse en absoluto y sin embargo las proteínas pueden competir por el sitio de unión sobre la superficie del receptor producto de un impedimento estérico entre ambas moléculas [237]. En este trabajo luego de los análisis *in silico* para encontrar la región que participa en la unión en el complejo Fab128.1-hTfR1 y la comparación del sitio de unión de la GP1 de MACV sobre hTfR1, pudimos identificar 11 residuos del sitio de unión del Fab128.1 que se solapan con el sitio de unión de la GP1 de MACV sobre hTfR1. Esto sugiere que el Fab128.1 compite por el sitio de unión con la GP1 de los Mamarenavirus patogénicos a través de un solapamiento de su sitio de unión.

Por otro lado, se utilizó, la información de los estudios de mutagénesis dirigida [92], los residuos que estarían implicados en la unión con el hTfR1 a Fab128.1 y el alineamiento de secuencias de hTfR1 y mTfR1, para realizar un estudio de los aminoácidos críticos que evitan la unión del ch128.1 sobre el mTfR1. Se pudo observar, en primer lugar, que casi la totalidad de los residuos sobre la superficie del hTfR1 que estarían involucrados en la interacción con el Fab128.1 y los residuos de ratón implicados en la quimera hTfR1-mTfR1 en los experimentos de mutagénesis se superponen (21 de 24 residuos) de los cuales 8 de ellos son diferentes en las secuencias de mTfR1 y de humano. Este estudio sugiere que uno o varios de estos 8 residuos serían claves en la unión del anticuerpo ch128.1 sobre el hTfR1.

Si no se cuenta con la información estructural de una proteína, existen herramientas computacionales que nos permiten diseñar modelos estructurales tomando como referencias bases de datos de estructuras resueltas conocidas [238]. Se realizó un modelo por homología de la región variable Fv2014 utilizando la estructura del Fab128.1 como templatado utilizando el servidor SWISS-MODEL [239]. Se pudo observar que el residuo de arginina R30 presente en Fv2016 no coincide en la secuencia del Fv2014 donde en esta posición se ubica un residuo de ácido aspártico. Esta mutación (R30D) se ubica en el CDR-L1 y daría como resultado el intercambio de un residuo electropositivo por uno electronegativo. Un análisis de modelado del potencial electrostático de superficie revela la aparición de un parche electronegativo que perturbaría dramáticamente la región que participaría en la interacción con el hTfR1. Este análisis podría explicar la ausencia de especificidad del scFv128.1-2014 por el hTfR1.

Los inhibidores de entrada de virus constituyen un abordaje novedoso para el tratamiento de enfermedades infecciosas. La identificación de las moléculas de membrana responsables de la internalización de los virus y los avances en la ingeniería de anticuerpos monoclonales ha permitido llevar a esta estrategia a la clínica, mostrando evidencia de la factibilidad de este abordaje terapéutico. En este trabajo hemos demostrado la factibilidad de desarrollar un fragmento de anticuerpo dirigido contra el hTfR1 que permita bloquear la entrada de una familia de Mamarenavirus causantes de las FHS (**Figura 78**). Los estudios estructurales realizados proveen la base para futuras mejoras en las características de la región variable del anticuerpo, y para su eventual humanización. Queda pendiente la realización de estudios *in vivo* para estudiar la optimización de la vida media y potencial toxicidad, y donde se demuestre la eficacia en modelos relevantes. Sin embargo, estos estudios sientan las bases para el desarrollo de una terapia segura contra una familia de graves enfermedades infecciosas de impacto regional.

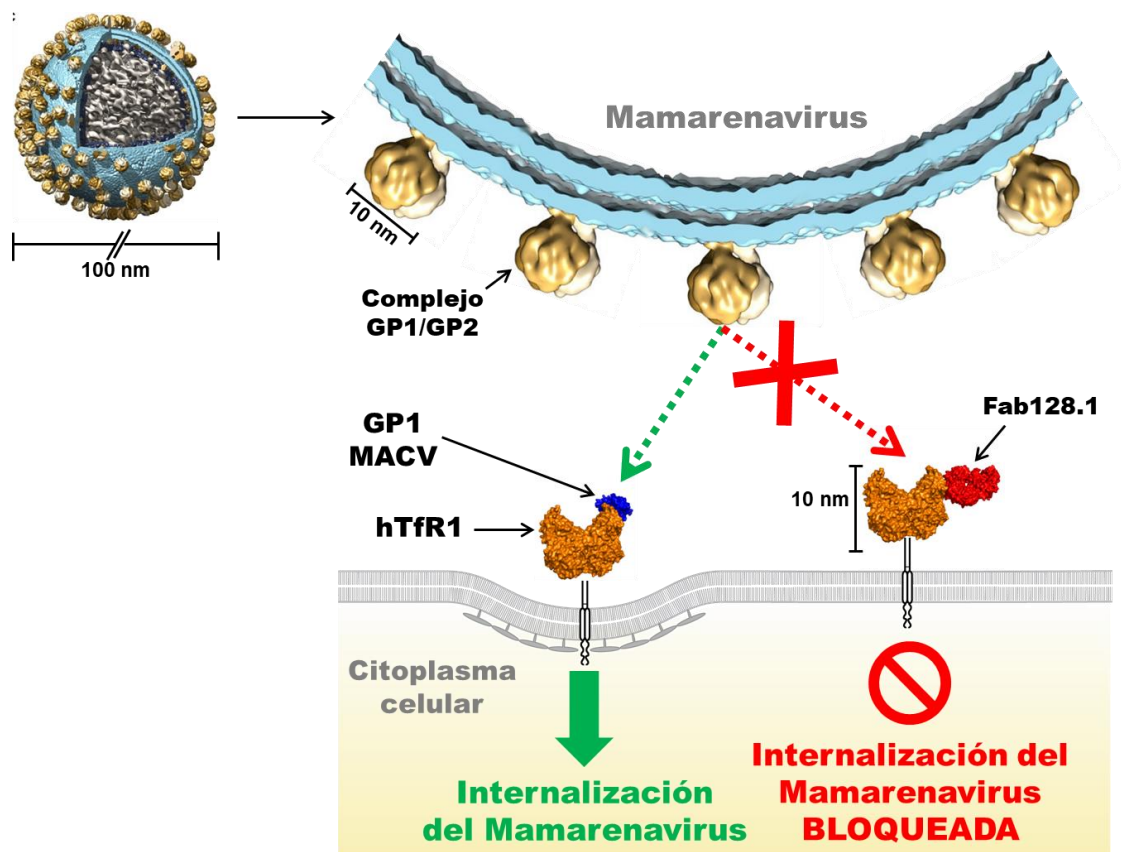


Figura 78. Modelo de bloqueo de la internalización de los Mamarenavirus causantes de las FHS por Fab128.1. El fragmento monovalente Fab128.1 se une específicamente sobre el hTfR1 y compite con la GP1 de los Mamarenavirus causantes de las FHS por su sitio de unión; bloqueando, de esta forma, la internalización de los Mamarenavirus y evitando la infección de la célula huésped. Se muestran las estructuras de los complejos hTfR1-GP1 de MACV (PDB: 3KAS), hTfR1-Fab128.1 (modelo de docking, hTfR1 3KAS vs. estructura del Fab128.1 resuelta en este trabajo). También se muestra la estructura del complejo GP1/GP2 de LASV conformada por tres subunidades GP1/GP2 (diferentes tonos de marrón) y la superficie de LASV y abierto (≈ 100 nm de diámetro) [240], destacando la organización irregular de los complejos GP1/GP2 de membrana, capa Z y densidad RNP (gris). Tanto el Mamarenavirus como los complejos GP1/GP2 y el hTfR1 (lateral de ≈ 10 nm) se muestran a escala.

6. CONCLUSIONES

- El plasma de pacientes de FHA previene significativamente la internalización de pseudovirus de JUNV hasta una dilución de 1:2.000 (84%). Esto sugiere que el modelo *in vitro* de pseudovirus es un modelo adecuado para evaluar la respuesta a agentes terapéuticos contra la FHA a pesar de su menor sensibilidad con respecto al ensayo de formación de placas.
- Por otro lado, se observó que el plasma de pacientes de FHA previene en mucho menor medida la internalización de pseudovirus de MACV y GTOV solo en una dilución 1:20 (60 y 28%, respectivamente). Esto sugiere que no sería factible el tratamiento eficaz de los pacientes con FHB y Venezolana con este plasma.
- En contraste, no se observó una actividad significativa sobre la internalización de pseudovirus de CHAV y SABV en presencia del plasma de pacientes FHA.
- Se determinó una correlación significativa entre la identidad de las secuencias de las GP1 de MACV, GTOV, SABV y CHAV con respecto a la de JUNV, con la capacidad del plasma de pacientes de FHA de bloquear su internalización.
- El sistema de pseudovirus sería una alternativa para detectar títulos de AcNT en plasmas de pacientes convalecientes de las distintas FHS.
- Se construyeron los vectores para generar un anticuerpo completo con isotipo IgG4 con la región variable Fv2014 del anticuerpo 128.1 contra el hTfR1, se transformaron células CHO-K1 y se seleccionaron clones resistentes pero que no alcanzó una productividad detectable por ELISA.
- Se construyó el vector para generar un fragmento simple cadena con la región variable Fv2014 del anticuerpo 128.1, se transformaron bacterias, se indujo su expresión y luego de análisis *in silico* de su carga, se logró optimizar las condiciones para su purificación del scFv128.1-2014 por cromatografía de afinidad.
- Estudios por ELISA competitivo permitieron establecer que el scFv128.1-2014 no se une al hTfR1. Por lo tanto, esto sugiere que hay diferencias en aminoácidos que impide la interacción con el receptor.
- Se construyó el vector para generar un fragmento simple cadena con la región variable Fv2016 del anticuerpo 128.1, se transformaron bacterias, se indujo su expresión, pero no se logró purificar el scFv128.1-2016 de forma soluble con buena productividad y pureza.
- Se logró purificar con alta rendimiento y pureza el scFv128.1-2016 desnaturalizado proveniente de cuerpos de inclusión. Sin embargo, no se logró renaturalizar la proteína a su conformación nativa en forma soluble.
- Se construyó el vector para generar una proteína de fusión del scFv128-2016 con MBP. Se transformaron bacterias, se indujo su expresión, pero no se lo logró purificar de forma soluble.

- Se logró purificar el fragmento monovalente del anticuerpo ch128.1 IgG1 (Fab128.1) con alta pureza por cromatografía de afinidad seguido de SEC.
- El fragmento Fab128.1 se une a sTfR1 por ELISA y por SEC, y a células que expresan hTfR1 en la superficie en forma recombinante (CHO TRVb-1) y en forma nativa en células humanas (HEK-293T).
- En contraste con lo observado con el plasma de pacientes convalecientes de FHA, el fragmento Fab128.1 inhibe la internalización de pseudovirus de todos los Mamarenavirus causantes de las FHS: MACV, GTOV, CHAV, SABV y JUNV.
- Se determinó en una curva dosis-respuesta que el Fab128.1 bloquea la internalización de los pseudovirus de MACV, GTOV, CHAV, SABV y JUNV con un IC_{50} entre 1.63 – 5.18 nM.
- Se generaron cristales del fragmento Fab128.1 y mediante difracción de rayos X se resolvió su estructura atómica con una resolución de 2,599 Å.
- Con esta estructura y la secuencia resuelta, se pudo determinar que la secuencia correcta de la región variable del anticuerpo 128.1 es la Fv2016.
- Se determinó la estructura de los CDRs de la región variable del anticuerpo 128.1, y por modelado de cargas electrostáticas de superficie se identificó un bolsillo electropositivo en la región variable que incluye a 5 de los 6 CDRs.
- Se realizó el modelado por acoplamiento entre el Fab128.1 y el hTfR1 utilizando ClusPro y Rosetta SnugDock y se identificó el sitio que participaría en la interacción entre ambas moléculas. Se identificaron 24 residuos del Fab128.1 que interaccionarían con 29 residuos del dominio apical del hTfR1.
- Según este modelo de acoplamiento, el CDR-L2 no participaría en la unión con el hTfR1. Esto coincidiría con el modelado de carga electrostática de superficie donde sería el único que exhibe una carga neutra.
- El análisis computacional del modelado de acoplamiento de Fab128.1 con hTfR1, con la estructura del complejo GP1MACV-hTfR1, permitió identificar que 11 residuos del sitio de unión del Fab128.1 se solapan con el sitio de unión de la GP1 de MACV sobre hTfR1. Esto sugiere que el Fab128.1 competiría por el sitio de unión con la GP1 de los Mamarenavirus patogénicos.
- Estos estudios de estructura-función proveen evidencia de un posible mecanismo por el cual el anticuerpo monovalente contra el hTfR1 puede bloquear la interacción de los Mamarenavirus patogénicos con el receptor de entrada, y explicaría el bloqueo de la internalización de los pseudovirus en presencia de los anticuerpos Fab128.1 y el ch128.1.

- Se realizó el modelado por homología de la secuencia Fv2014 utilizando la estructura del Fab128.1 como templado. Se pudo observar que el residuo R30 presente en Fv2016 no coincide en la secuencia del Fv2014 donde en esta posición se ubica un ácido aspártico (R30D).
- La mutación R30D se ubica en el CDR-L1 y consiste en el intercambio de un residuo electropositivo por uno electronegativo. Un análisis de modelado del potencial electrostático de superficie revela la aparición de un parche electronegativo que perturbaría dramáticamente la región que participaría en la interacción con el hTfR1. Este análisis podría explicar la ausencia de especificidad del scFv128.1-2014 por el hTfR1.

REFERENCIAS

1. Radoshitzky, S.R., et al., *Past, present, and future of arenavirus taxonomy*. Arch Virol, 2015. **160**(7): p. 1851-74.
2. Zong, M., I. Fofana, and H. Choe, *Human and host species transferrin receptor 1 use by North American arenaviruses*. J Virol, 2014. **88**(16): p. 9418-28.
3. Wolff, S., et al., *The New World arenavirus Tacaribe virus induces caspase-dependent apoptosis in infected cells*. J Gen Virol, 2016. **97**(4): p. 855-66.
4. Zapanta, P.E. and S. Ghorab, *Age of Bioterrorism: Are You Prepared? Review of Bioweapons and Their Clinical Presentation for Otolaryngologists*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2014. **151**(2): p. 208-14.
5. Borio, L., et al., *Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management*. JAMA, 2002. **287**(18): p. 2391-405.
6. Kenyon, R.H., et al., *Aerosol infection of rhesus macaques with Junin virus*. Intervirology, 1992. **33**(1): p. 23-31.
7. Miller Judith, Engelberg Stephen, and B.W. J., *Germs: Biological Weapons and America's Secret War*, ed. Waterville. 2001: Simon & Schuster.
8. Parodi, A.S., et al., *[Isolation of the Junin virus (epidemic hemorrhagic fever) from the mites of the epidemic area (Echinolaelaps echidninus, Barlese)]*. Prensa Med Argent, 1959. **46**: p. 2242-4.
9. Enria, D.A., A.M. Briggiler, and Z. Sanchez, *Treatment of Argentine hemorrhagic fever*. Antiviral Res, 2008. **78**(1): p. 132-9.
10. Mackenzie, R.B., et al., *Epidemic Hemorrhagic Fever in Bolivia. I. A Preliminary Report of the Epidemiologic and Clinical Findings in a New Epidemic Area in South America*. Am J Trop Med Hyg, 1964. **13**: p. 620-5.
11. Johnson, K.M., et al., *Virus Isolations from Human Cases of Hemorrhagic Fever in Bolivia*. Proc Soc Exp Biol Med, 1965. **118**: p. 113-8.
12. Salas, R., et al., *Venezuelan haemorrhagic fever*. Lancet, 1991. **338**(8774): p. 1033-6.
13. Lisieux, T., et al., *New arenavirus isolated in Brazil*. Lancet, 1994. **343**(8894): p. 391-2.
14. Delgado, S., et al., *Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia*. PLoS Pathog, 2008. **4**(4): p. e1000047.
15. González García, G., et al., *Informe para la XXI Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2006: Santa Rosa, La Pampa Argentina.
16. Ocaña, G., et al., *Informe para la XXIII Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2008: Azul, Buenos Aires, Argentina.
17. Manzur, J.L., et al., *Informe para la XXIV Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2010: Marcos Juárez, Córdoba, Argentina.
18. Gollan, D.G., et al., *Informe para la XXIX Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2015: Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
19. Manzur, J.L., et al., *Informe para la XXV Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2011: Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
20. Manzur, J.L., et al., *Informe para la XXVI Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2012: Rosario, Santa Fe, Argentina.
21. González García, G., et al., *Informe para la XXVII Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2007: Casilda, Santa Fe, Argentina.
22. Manzur, J.L., et al., *Informe para la XXVII Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2013: Córdoba, Córdoba, Argentina.
23. Manzur, J.L., et al., *Informe para la XXVIII Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2014: Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

24. Lemus, J.D., et al., *Informe para la XXX Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2016: Rosario, Santa Fé, Argentina.
25. Lemus, J.D., et al., *Informe para la XXXI Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina*, 2017: Villa María, Cordoba, Argentina.
26. Patterson, M., A. Grant, and S. Paessler, *Epidemiology and pathogenesis of Bolivian hemorrhagic fever*. *Curr Opin Virol*, 2014. **5**: p. 82-90.
27. Paredes Vargas, H., *Fiebre hemorrágica venezolana Fiebre de guaranito*, 2012.
28. Ellwanger, J.H. and J.A. Chies, *Keeping track of hidden dangers - The short history of the Sabia virus*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2017. **50**(1): p. 3-8.
29. Zapata, J.C. and M.S. Salvato, *Arenavirus variations due to host-specific adaptation*. *Viruses*, 2013. **5**(1): p. 241-78.
30. Kerber, R., et al., *Research efforts to control highly pathogenic arenaviruses: a summary of the progress and gaps*. *J Clin Virol*, 2015. **64**: p. 120-7.
31. Practice, B.B. *South American haemorrhagic fevers*. 2017; Available from: <http://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/1612>.
32. Basler, C.F., *Molecular pathogenesis of viral hemorrhagic fever*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(5): p. 551-561.
33. McLay, L., Y. Liang, and H. Ly, *Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World arenavirus infections*. *J Gen Virol*, 2014. **95**(Pt 1): p. 1-15.
34. Zeitlin, L., et al., *Monoclonal antibody therapy for Junin virus infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(16): p. 4458-63.
35. Harrison, L.H., et al., *Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever*. *Clin Infect Dis*, 1999. **28**(5): p. 1091-4.
36. Pfau, C.J., *Arenaviruses*, in *Medical Microbiology*, S. Baron, Editor. 1996: Galveston (TX).
37. Maiztegui, J.I., et al., *Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group*. *J Infect Dis*, 1998. **177**(2): p. 277-83.
38. Enria, D.A. and J.I. Maiztegui, *Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever*. *Antiviral Res*, 1994. **23**(1): p. 23-31.
39. Saavedra, M.C., et al., *[Prevalence of hepatitis C antibodies in plasma donors for the treatment of Argentine hemorrhagic fever]*. *Medicina (B Aires)*, 1997. **57**(3): p. 287-93.
40. Mahmutovic, S., et al., *Molecular Basis for Antibody-Mediated Neutralization of New World Hemorrhagic Fever Mammarenaviruses*. *Cell Host Microbe*, 2015. **18**(6): p. 705-13.
41. Brouillette, R.B., et al., *Differences in Glycoprotein Complex Receptor Binding Site Accessibility Prompt Poor Cross-Reactivity of Neutralizing Antibodies between Closely Related Arenaviruses*. *J Virol*, 2017. **91**(7).
42. Sanchez, A., et al., *Junin virus monoclonal antibodies: characterization and cross-reactivity with other arenaviruses*. *J Gen Virol*, 1989. **70** (Pt 5): p. 1125-32.
43. Resources, B. *Monoclonal Anti-Junin Virus*. 2018; Available from: https://www.beiresources.org/Catalog.aspx?f_instockflag=In+Stock%23~%23Discontinued%23~%23Temporarily+Out+of+Stock&q=junin.
44. Wang, D., S. Bayliss, and C. Meads, *Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children: a systematic review and additional economic modelling of subgroup analyses*. *Health Technol Assess*, 2011. **15**(5): p. iii-iv, 1-124.
45. Buchmeier, M.J., *Arenaviruses: protein structure and function*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. **262**: p. 159-73.
46. Charrel, R.N. and X. de Lamballerie, *Arenaviruses other than Lassa virus*. *Antiviral Res*, 2003. **57**(1-2): p. 89-100.

47. Jay, M.T., C. Glaser, and C.F. Fulhorst, *The arenaviruses*. J Am Vet Med Assoc, 2005. **227**(6): p. 904-15.
48. Meyer, B.J., J.C. de la Torre, and P.J. Southern, *Arenaviruses: genomic RNAs, transcription, and replication*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **262**: p. 139-57.
49. Auperin, D.D., M. Galinski, and D.H. Bishop, *The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of pichinde arenavirus*. Virology, 1984. **134**(1): p. 208-19.
50. Salvato, M.S. and E.M. Shimomaye, *The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein*. Virology, 1989. **173**(1): p. 1-10.
51. Lenz, O., et al., *The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12701-5.
52. Kunz, S., et al., *Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions*. Virology, 2003. **314**(1): p. 168-78.
53. Buchmeier, M.J., et al., *Site-specific antibodies define a cleavage site conserved among arenavirus GP-C glycoproteins*. J Virol, 1987. **61**(4): p. 982-5.
54. Wilson, S.M. and J.C. Clegg, *Sequence analysis of the S RNA of the African arenavirus Mopeia: an unusual secondary structure feature in the intergenic region*. Virology, 1991. **180**(2): p. 543-52.
55. Pinschewer, D.D., M. Perez, and J.C. de la Torre, *Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4519-26.
56. Shao, J., Y. Liang, and H. Ly, *Human hemorrhagic Fever causing arenaviruses: molecular mechanisms contributing to virus virulence and disease pathogenesis*. Pathogens, 2015. **4**(2): p. 283-306.
57. Perez, M., R.C. Craven, and J.C. de la Torre, *The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12978-83.
58. Pinschewer, D.D., M. Perez, and J.C. de la Torre, *Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3882-7.
59. Garcin, D. and D. Kolakofsky, *Tacaribe arenavirus RNA synthesis in vitro is primer dependent and suggests an unusual model for the initiation of genome replication*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1370-6.
60. Fuller-Pace, F.V. and P.J. Southern, *Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 1938-44.
61. Garcin, D. and D. Kolakofsky, *A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 6196-203.
62. Kranzusch, P.J. and S.P. Whelan, *Architecture and regulation of negative-strand viral enzymatic machinery*. RNA Biol, 2012. **9**(7): p. 941-8.
63. Leung, W.C., M.F. Leung, and W.E. Rawls, *Distinctive RNA transcriptase, polyadenylic acid polymerase, and polyuridylic acid polymerase activities associated with Pichinde virus*. J Virol, 1979. **30**(1): p. 98-107.
64. Eichler, R., et al., *Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP)*. Virus Res, 2004. **100**(2): p. 249-55.
65. Strecker, T., et al., *Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]*. J Virol, 2003. **77**(19): p. 10700-5.
66. Borrow, P. and M.B. Oldstone, *Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells*. Virology, 1994. **198**(1): p. 1-9.

67. Martinez, M.G., S.M. Cordo, and N.A. Candurra, *Characterization of Junin arenavirus cell entry*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 6): p. 1776-84.
68. Vela, E.M., et al., *Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism*. Virology, 2007. **369**(1): p. 1-11.
69. Cao, W., et al., *Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2079-81.
70. Spiropoulou, C.F., et al., *New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 5140-6.
71. Radoshitzky, S.R., et al., *Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses*. Nature, 2007. **446**(7131): p. 92-6.
72. Leung, W.C., H.P. Ghosh, and W.E. Rawls, *Strandedness of Pichinde virus RNA*. J Virol, 1977. **22**(1): p. 235-7.
73. Raju, R., et al., *Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs*. Virology, 1990. **174**(1): p. 53-9.
74. Dalton, A.J., et al., *Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus*. J Virol, 1968. **2**(12): p. 1465-78.
75. Valerio, L.G., *Mammalian iron metabolism*. Toxicol Mech Methods, 2007. **17**(9): p. 497-517.
76. Jandl, J.H., et al., *Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes*. J Clin Invest, 1959. **38**(1, Part 1): p. 161-85.
77. Dautry-Varsat, A., A. Ciechanover, and H.F. Lodish, *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2258-62.
78. van Bockxmeer, F.M. and E.H. Morgan, *Identification of transferrin receptors in reticulocytes*. Biochim Biophys Acta, 1977. **468**(3): p. 437-50.
79. Seligman, P.A., R.B. Schleicher, and R.H. Allen, *Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta*. J Biol Chem, 1979. **254**(20): p. 9943-6.
80. Hamilton, T.A., H.G. Wada, and H.H. Sussman, *Identification of transferrin receptors on the surface of human cultured cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6406-10.
81. Lambert, L.A. and S.L. Mitchell, *Molecular evolution of the transferrin receptor/glutamate carboxypeptidase II family*. J Mol Evol, 2007. **64**(1): p. 113-28.
82. Daniels, T.R., et al., *The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(3): p. 291-317.
83. Ciechanover, A., et al., *Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents*. J Biol Chem, 1983. **258**(16): p. 9681-9.
84. Turkewitz, A.P., A.L. Schwartz, and S.C. Harrison, *A pH-dependent reversible conformational transition of the human transferrin receptor leads to self-association*. J Biol Chem, 1988. **263**(31): p. 16309-15.
85. Beguin, Y., *Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status*. Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 9-22.
86. Luria-Pérez, R., G. Helguera, and J.A. Rodríguez, *Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 2016. **73**(6): p. 372-379.
87. Eckenroth, B.E., et al., *How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(32): p. 13089-94.
88. Moretti, R., et al., *Rosetta and the Design of Ligand Binding Sites*. Methods Mol Biol, 2016. **1414**: p. 47-62.
89. Bennett, M.J., J.A. Lebron, and P.J. Bjorkman, *Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 46-53.

90. Geisbert, T.W. and P.B. Jahrling, *Exotic emerging viral diseases: progress and challenges*. Nat Med, 2004. **10**(12 Suppl): p. S110-21.
91. Daniels, T.R., et al., *The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer*. Clin Immunol, 2006. **121**(2): p. 144-58.
92. Helguera, G., et al., *An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic Fever arenaviruses*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 4024-8.
93. Radoshitzky, S.R., et al., *Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2664-9.
94. Martinez, M.G., S.M. Cordo, and N.A. Candurra, *Involvement of cytoskeleton in Junin virus entry*. Virus Res, 2008. **138**(1-2): p. 17-25.
95. Abraham, J., et al., *Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(4): p. 438-44.
96. Maier, K.E., et al., *A New Transferrin Receptor Aptamer Inhibits New World Hemorrhagic Fever Mammarenavirus Entry*. Mol Ther Nucleic Acids, 2016. **5**: p. e321.
97. Demogines, A., et al., *Dual host-virus arms races shape an essential housekeeping protein*. PLoS Biol, 2013. **11**(5): p. e1001571.
98. Kerr, S.A., et al., *Computational and Functional Analysis of the Virus-Receptor Interface Reveals Host Range Trade-Offs in New World Arenaviruses*. J Virol, 2015. **89**(22): p. 11643-53.
99. Martin, D.N. and S.L. Uprichard, *Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(26): p. 10777-82.
100. Gruszczyk, J., et al., *Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax*. Science, 2018. **359**(6371): p. 48-55.
101. Rodriguez, J.A., et al., *Lethal iron deprivation induced by non-neutralizing antibodies targeting transferrin receptor 1 in malignant B cells*. Leuk Lymphoma, 2011. **52**(11): p. 2169-78.
102. White, S., et al., *Combinations of anti-transferrin receptor monoclonal antibodies inhibit human tumor cell growth in vitro and in vivo: evidence for synergistic antiproliferative effects*. Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6295-301.
103. Ng, P.P., et al., *Molecular events contributing to cell death in malignant human hematopoietic cells elicited by an IgG3-avidin fusion protein targeting the transferrin receptor*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2745-54.
104. Rodriguez, J.A., et al., *Binding specificity and internalization properties of an antibody-avidin fusion protein targeting the human transferrin receptor*. J Control Release, 2007. **124**(1-2): p. 35-42.
105. Ng, P.P., et al., *An anti-transferrin receptor-avidin fusion protein exhibits both strong proapoptotic activity and the ability to deliver various molecules into cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10706-11.
106. Alt, F.W., T.K. Blackwell, and G.D. Yancopoulos, *Development of the primary antibody repertoire*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1079-87.
107. Helguera, G., et al., *Monoclonal antibodies, human, engineered*, in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, M.C. Flickinger, Editor. 2010, John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey. p. 3526-3542.
108. Payés, C.J., Daniels-Wells, T. R., Maffía, P. C., Penichet, M. L., Morrison, S. L. and Helguera, G., *Genetic Engineering of Antibody Molecules*, in *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. 2015, John Wiley & Sons, Inc.,. p. 1-52.
109. Dudley, D.D., et al., *Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 43-112.
110. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 1-22.

111. Rajewsky, K., I. Forster, and A. Cumano, *Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1088-94.
112. Radaev, S. and P.D. Sun, *Recognition of IgG by Fcγ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16478-83.
113. Arnold, J.N., et al., *The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 21-50.
114. Davis, A.C., K.H. Roux, and M.J. Shulman, *On the structure of polymeric IgM*. Eur J Immunol, 1988. **18**(7): p. 1001-8.
115. Wan, T., et al., *The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 681-6.
116. Strohl, W.R. and L.M. Strohl, *Therapeutic antibody classes*, in *Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry*. 2012, Woodhead Publishing: Sawston, Cambridge. p. 197-223.
117. Kuo, T.T. and V.G. Aveson, *Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics*. mAbs, 2011. **3**(5): p. 422-430.
118. Ghetie, V. and E.S. Ward, *Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 739-66.
119. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
120. Horton, H.M., et al., *Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 8049-57.
121. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 19-28.
122. Weiner, L.M., *Building better magic bullets--improving unconjugated monoclonal antibody therapy for cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 701-6.
123. Bruggemann, M., et al., *Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1351-61.
124. Reichert, J.M., *Marketed therapeutic antibodies compendium*. MAbs, 2012. **4**(3): p. 413-5.
125. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 170-9.
126. Kim, S.J., Y. Park, and H.J. Hong, *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies*. Mol Cells, 2005. **20**(1): p. 17-29.
127. Albrecht, H., et al., *Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand*. Bioconj Chem, 2004. **15**(1): p. 16-26.
128. Wesolowski, J., et al., *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. Med Microbiol Immunol, 2009. **198**(3): p. 157-74.
129. Hudson, P.J. and A.A. Kortt, *High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 177-89.
130. Perisic, O., et al., *Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment*. Structure, 1994. **2**(12): p. 1217-26.
131. Hu, S., et al., *Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts*. Cancer Res, 1996. **56**(13): p. 3055-61.
132. Ludwig, D.L., et al., *Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9097-106.
133. Nelson, A.L., *Antibody fragments: hope and hype*. MAbs, 2010. **2**(1): p. 77-83.
134. Tchong, J.E., *Dosing and administration of ReoPro (c7E3 Fab)*. J Invasive Cardiol, 1994. **6 Suppl A**: p. 29A-33A; discussion 51A-54A.
135. Reis, G.M., et al., *Incidence of Intraocular Pressure Elevation following Intravitreal Ranibizumab (Lucentis) for Age-related Macular Degeneration*. J Curr Glaucoma Pract, 2017. **11**(1): p. 3-7.

136. Vosko, M.R., et al., *Real-life experience with the specific reversal agent idarucizumab for the management of emergency situations in dabigatran-treated patients: a series of 11 cases*. J Thromb Thrombolysis, 2017. **43**(3): p. 306-317.
137. Hamatake, M., et al., *Inhibition of HIV replication by a CD4-reactive Fab of an IgM clone isolated from a healthy HIV-seronegative individual*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1504-9.
138. Bes, C., et al., *Mapping the paratope of anti-CD4 recombinant Fab 13B8.2 by combining parallel peptide synthesis and site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14265-73.
139. Reichert, J.M., *Antibodies to watch in 2016*. MAbs, 2016. **8**(2): p. 197-204.
140. Freeman, M.M., et al., *Crystal structure of HIV-1 primary receptor CD4 in complex with a potent antiviral antibody*. Structure, 2010. **18**(12): p. 1632-41.
141. Burley, S.K., et al., *Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive*. Methods Mol Biol, 2017. **1607**: p. 627-641.
142. McPherson, A., *Current approaches to macromolecular crystallization*. Eur J Biochem, 1990. **189**(1): p. 1-23.
143. Matthews, B.W., *Solvent content of protein crystals*. J Mol Biol, 1968. **33**(2): p. 491-7.
144. Friedrich, W., Knipping P., and Laue, M., *Structural Crystallography in Chemistry and Biology*, ed. J.P. Glusker. 1981, Stroudsburg, PA: Hutchinson & Ross.
145. Bragg, W.L., *The Structure of Some Crystals as Indicated by Their Diffraction of X-rays*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 1913. **89**(610): p. 248-277.
146. Chothia, C. and A.M. Lesk, *The relation between the divergence of sequence and structure in proteins*. EMBO J, 1986. **5**(4): p. 823-6.
147. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 235-42.
148. Hendrickson, W.A., *Stereochemically restrained refinement of macromolecular structures*. Methods Enzymol, 1985. **115**: p. 252-70.
149. Zhou, A.Q., C.S. O'Hern, and L. Regan, *Revisiting the Ramachandran plot from a new angle*. Protein Sci, 2011. **20**(7): p. 1166-71.
150. Comeau, S.R., et al., *ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W96-9.
151. Smith, G.R. and M.J. Sternberg, *Prediction of protein-protein interactions by docking methods*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(1): p. 28-35.
152. Halperin, I., et al., *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins, 2002. **47**(4): p. 409-43.
153. Ritchie, D.W., *Recent progress and future directions in protein-protein docking*. Curr Protein Pept Sci, 2008. **9**(1): p. 1-15.
154. Vajda, S. and D. Kozakov, *Convergence and combination of methods in protein-protein docking*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(2): p. 164-70.
155. Aloy, P., et al., *The relationship between sequence and interaction divergence in proteins*. J Mol Biol, 2003. **332**(5): p. 989-98.
156. Sinha, R., P.J. Kundrotas, and I.A. Vakser, *Protein docking by the interface structure similarity: how much structure is needed?* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31349.
157. Comeau, S.R., et al., *ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes*. Bioinformatics, 2004. **20**(1): p. 45-50.
158. Comeau, S.R., et al., *ClusPro: performance in CAPRI rounds 6-11 and the new server*. Proteins, 2007. **69**(4): p. 781-5.
159. Kozakov, D., et al., *Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19*. Proteins, 2010. **78**(15): p. 3124-30.

160. Kozakov, D., et al., *How good is automated protein docking?* Proteins, 2013. **81**(12): p. 2159-66.
161. Kozakov, D., et al., *PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials.* Proteins, 2006. **65**(2): p. 392-406.
162. Katchalski-Katzir, E., et al., *Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2195-9.
163. Gabb, H.A., R.M. Jackson, and M.J. Sternberg, *Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information.* J Mol Biol, 1997. **272**(1): p. 106-20.
164. Mandell, J.G., et al., *Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit.* Protein Eng, 2001. **14**(2): p. 105-13.
165. Chen, R. and Z. Weng, *Docking unbound proteins using shape complementarity, desolvation, and electrostatics.* Proteins, 2002. **47**(3): p. 281-94.
166. Kozakov, D., et al., *Optimal clustering for detecting near-native conformations in protein docking.* Biophys J, 2005. **89**(2): p. 867-75.
167. Chen, R., et al., *A protein-protein docking benchmark.* Proteins, 2003. **52**(1): p. 88-91.
168. Mintseris, J., et al., *Protein-Protein Docking Benchmark 2.0: an update.* Proteins, 2005. **60**(2): p. 214-6.
169. Hwang, H., et al., *Protein-protein docking benchmark version 3.0.* Proteins, 2008. **73**(3): p. 705-9.
170. Hwang, H., et al., *Protein-protein docking benchmark version 4.0.* Proteins, 2010. **78**(15): p. 3111-4.
171. Vajda, S. and C.J. Camacho, *Protein-protein docking: is the glass half-full or half-empty?* Trends Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 110-6.
172. Vajda, S., *Classification of protein complexes based on docking difficulty.* Proteins, 2005. **60**(2): p. 176-80.
173. Moretti, R., et al., *Web-accessible molecular modeling with Rosetta: The Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE).* Protein Sci, 2018. **27**(1): p. 259-268.
174. Sircar, A. and J.J. Gray, *SnugDock: paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models.* PLoS Comput Biol, 2010. **6**(1): p. e1000644.
175. Alzari, P.M., M.B. Lascombe, and R.J. Poljak, *Three-dimensional structure of antibodies.* Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 555-80.
176. Kunik, V. and Y. Ofran, *The indistinguishability of epitopes from protein surface is explained by the distinct binding preferences of each of the six antigen-binding loops.* Protein Eng Des Sel, 2013. **26**(10): p. 599-609.
177. Ponomarenko, J.V. and P.E. Bourne, *Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation.* BMC Struct Biol, 2007. **7**: p. 64.
178. Brenke, R., et al., *Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking.* Bioinformatics, 2012. **28**(20): p. 2608-14.
179. Chen, R., L. Li, and Z. Weng, *ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm.* Proteins, 2003. **52**(1): p. 80-7.
180. Krawczyk, K., et al., *Antibody i-Patch prediction of the antibody binding site improves rigid local antibody-antigen docking.* Protein Eng Des Sel, 2013. **26**(10): p. 621-9.
181. Sela-Culang, I., S. Alon, and Y. Ofran, *A systematic comparison of free and bound antibodies reveals binding-related conformational changes.* J Immunol, 2012. **189**(10): p. 4890-9.
182. Kuroda, D. and J.J. Gray, *Pushing the Backbone in Protein-Protein Docking.* Structure, 2016. **24**(10): p. 1821-1829.

183. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
184. Huston, J.S., et al., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5879-83.
185. Janson, G., et al., *PyMod 2.0: improvements in protein sequence-structure analysis and homology modeling within PyMOL*. Bioinformatics, 2017. **33**(3): p. 444-446.
186. Kozakov, D., et al., *The ClusPro web server for protein-protein docking*. Nat Protoc, 2017. **12**(2): p. 255-278.
187. Weitzner, B.D., et al., *Modeling and docking of antibody structures with Rosetta*. Nat Protoc, 2017. **12**(2): p. 401-416.
188. Kozakov, D., O. Schueler-Furman, and S. Vajda, *Discrimination of near-native structures in protein-protein docking by testing the stability of local minima*. Proteins, 2008. **72**(3): p. 993-1004.
189. Chandran, K., et al., *Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1643-5.
190. Barffour, M.A., et al., *Malaria exacerbates inflammation-associated elevation in ferritin and soluble transferrin receptor with only modest effects on iron deficiency and iron deficiency anaemia among rural Zambian children*. Trop Med Int Health, 2018. **23**(1): p. 53-62.
191. Xi, H., et al., *Purification and on-column refolding of a single-chain antibody fragment against rabies virus glycoprotein expressed in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2016. **126**: p. 26-32.
192. Fox, J.D. and D.S. Waugh, *Maltose-binding protein as a solubility enhancer*. Methods Mol Biol, 2003. **205**: p. 99-117.
193. Mehta, K., et al., *Characterisation of hepcidin response to holotransferrin treatment in CHO TRVb-1 cells*. Blood Cells Mol Dis, 2015. **55**(2): p. 110-8.
194. Weiner, P.K., et al., *Electrostatic potential molecular surfaces*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(12): p. 3754-8.
195. Ahmed, M., et al., *Humanized Affinity-matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Antitumor Activity and Binds to FG Loop of Tumor Antigen B7-H3*. J Biol Chem, 2015. **290**(50): p. 30018-29.
196. Kannan, K.K., *The x-ray crystallography technique in protein sequencing*. Mol Biol Biochem Biophys, 1977. **25**: p. 75-122.
197. McKee, K.T., Jr., et al., *Candid No. 1 Argentine hemorrhagic fever vaccine protects against lethal Junin virus challenge in rhesus macaques*. Intervirology, 1992. **34**(3): p. 154-63.
198. Ambrosio, A.M., et al., *Protocol for the Production of a Vaccine Against Argentinian Hemorrhagic Fever*. Methods Mol Biol, 2018. **1604**: p. 305-329.
199. Enria, D.A., et al., *Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma*. Lancet, 1984. **2**(8397): p. 255-6.
200. Bozzo, J. and J.I. Jorquera, *Use of human immunoglobulins as an anti-infective treatment: the experience so far and their possible re-emerging role*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2017. **15**(6): p. 585-604.
201. Devignot, S., et al., *A virus-like particle system identifies the endonuclease domain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. J Virol, 2015. **89**(11): p. 5957-67.
202. Wec, A.Z., et al., *A "Trojan horse" bispecific-antibody strategy for broad protection against ebolaviruses*. Science, 2016. **354**(6310): p. 350-354.
203. Qiu, C., et al., *Safe pseudovirus-based assay for neutralization antibodies against influenza A(H7N9) virus*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(10): p. 1685-7.

204. Mascola, J.R., et al., *Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10103-7.
205. Medeot, S.I., et al., *Neurovirulence of wild and laboratory Junin virus strains in animal hosts*. J Med Virol, 1990. **32**(3): p. 171-82.
206. Medeot, S.I., et al., *Experimental neuroinvasiveness of wild and laboratory Junin virus strains*. Res Virol, 1992. **143**(4): p. 259-67.
207. Reiber, H., *Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid*. Clin Chim Acta, 2001. **310**(2): p. 173-86.
208. Tabrizi, M., G.G. Bornstein, and H. Suria, *Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease*. AAPS J, 2010. **12**(1): p. 33-43.
209. Zeltina, A., et al., *Convergent immunological solutions to Argentine hemorrhagic fever virus neutralization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(27): p. 7031-7036.
210. Moore, J.P., et al., *A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+ cells*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 4784-93.
211. Reimann, K.A., et al., *A humanized form of a CD4-specific monoclonal antibody exhibits decreased antigenicity and prolonged plasma half-life in rhesus monkeys while retaining its unique biological and antiviral properties*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997. **13**(11): p. 933-43.
212. Song, R., et al., *Epitope mapping of ibalizumab, a humanized anti-CD4 monoclonal antibody with anti-HIV-1 activity in infected patients*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 6935-42.
213. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *HIV: cell binding and entry*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
214. Iacob, S.A. and D.G. Iacob, *Ibalizumab Targeting CD4 Receptors, An Emerging Molecule in HIV Therapy*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2323.
215. Bruno, C.J. and J.M. Jacobson, *Ibalizumab: an anti-CD4 monoclonal antibody for the treatment of HIV-1 infection*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(9): p. 1839-41.
216. Helguera, G. and M.L. Penichet, *Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer*. Methods Mol Med, 2005. **109**: p. 347-74.
217. Labrijn, A.F., et al., *Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(8): p. 767-71.
218. Villasenor, R., et al., *Sorting Tubules Regulate Blood-Brain Barrier Transcytosis*. Cell Rep, 2017. **21**(11): p. 3256-3270.
219. Dozier, J.K. and M.D. Distefano, *Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 25831-64.
220. Veronese, F.M. and A. Mero, *The impact of PEGylation on biological therapies*. BioDrugs, 2008. **22**(5): p. 315-29.
221. Worn, A. and A. Pluckthun, *Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments*. J Mol Biol, 2001. **305**(5): p. 989-1010.
222. Moradi-Kalbolandi, S., et al., *Soluble Expression and Characterization of a New scFv Directed to Human CD123*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016. **178**(7): p. 1390-1406.
223. Liu, Z., et al., *Expression and purification of soluble single-chain Fv against human fibroblast growth factor receptor 3 fused with Sumo tag in Escherichia coli*. Electronic Journal of Biotechnology, 2015. **18**(4).
224. Zang, C., et al., *Expression, purification and biological effect of a novel single chain Fv antibody and protamine fusion protein for the targeted delivery of siRNAs to FGFR3 positive cancer cells*. Electronic Journal of Biotechnology, 2017. **28**: p. 14-19.
225. Vaks, L. and I. Benhar, *Production of stabilized scFv antibody fragments in the E. coli bacterial cytoplasm, in Methods in Molecular Biology* 2014. p. 171-184.

226. Muramatsu, H., et al., *Production and characterization of an active single-chain variable fragment antibody recognizing CD25*. Cancer Letters, 2005. **225**(2): p. 225-236.
227. Maeng, B.H., D.H. Nam, and Y.H. Kim, *Coexpression of molecular chaperones to enhance functional expression of anti-BNP scFv in the cytoplasm of Escherichia coli for the detection of B-type natriuretic peptide*. World J Microbiol Biotechnol, 2011. **27**(6): p. 1391-8.
228. Sina, M., D. Farajzadeh, and S. Dastmalchi, *Effects of environmental factors on soluble expression of a humanized anti-TNF- α scFv antibody in escherichia coli*. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2015. **5**(4): p. 455-461.
229. Arevalo, J.H., M.J. Taussig, and I.A. Wilson, *Molecular basis of crossreactivity and the limits of antibody-antigen complementarity*. Nature, 1993. **365**(6449): p. 859-63.
230. Decanniere, K., S. Muyldermans, and L. Wyns, *Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes?* J Mol Biol, 2000. **300**(1): p. 83-91.
231. Karanicolas, J. and B. Kuhlman, *Computational design of affinity and specificity at protein-protein interfaces*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(4): p. 458-63.
232. Gray, J.J., *High-resolution protein-protein docking*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 183-93.
233. Kuroda, D., et al., *Computer-aided antibody design*. Protein Eng Des Sel, 2012. **25**(10): p. 507-21.
234. Birtley, J.R. and S. Curry, *Crystallization of foot-and-mouth disease virus 3C protease: surface mutagenesis and a novel crystal-optimization strategy*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005. **61**(Pt 5): p. 646-50.
235. Bourne, Y., et al., *Molecular characterization of monoclonal antibodies that inhibit acetylcholinesterase by targeting the peripheral site and backdoor region*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77226.
236. Hirschi, A., et al., *An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(9): p. 1051-7.
237. Dietrich, M.H., et al., *Structural Insights into Reovirus sigma1 Interactions with Two Neutralizing Antibodies*. J Virol, 2017. **91**(4).
238. Fiser, A., *Template-based protein structure modeling*. Methods Mol Biol, 2010. **673**: p. 73-94.
239. Biasini, M., et al., *SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Web Server issue): p. W252-8.
240. Li, S., et al., *Acidic pH-Induced Conformations and LAMP1 Binding of the Lassa Virus Glycoprotein Spike*. PLoS Pathog, 2016. **12**(2): p. e1005418.