

Anticuerpos a la carta combinando expresión *in vitro* de proteínas, tecnología de despliegue en fagos y arrays de anticuerpos

Rodrigo Barderas, Ingrid Babel, Iván Cristobo, José Ignacio Casal

Laboratorio de Proteómica Funcional. Centro de Investigaciones Biológicas, c/ Ramiro de Maeztu, 9 28040 Madrid

Los anticuerpos constituyen una importante herramienta para determinar la compartimentalización celular y la función de sus proteínas diana y para el análisis de interacciones proteína-proteína. Actualmente, los anticuerpos se utilizan para el diagnóstico de enfermedades mediante inmunoensayos como ELISA, arrays de anticuerpos,... y, para el tratamiento de enfermedades, como por ejemplo el anti-HER2

(Herceptin) en cáncer de mama. De hecho, los anticuerpos constituyen aproximadamente el 50% de los medicamentos aprobados por la FDA y la EMEA.

El objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de un nuevo método de obtención de anticuerpos *in vitro* utilizando solo 5 µg de proteína mediante la combinación de diferentes técnicas pro-

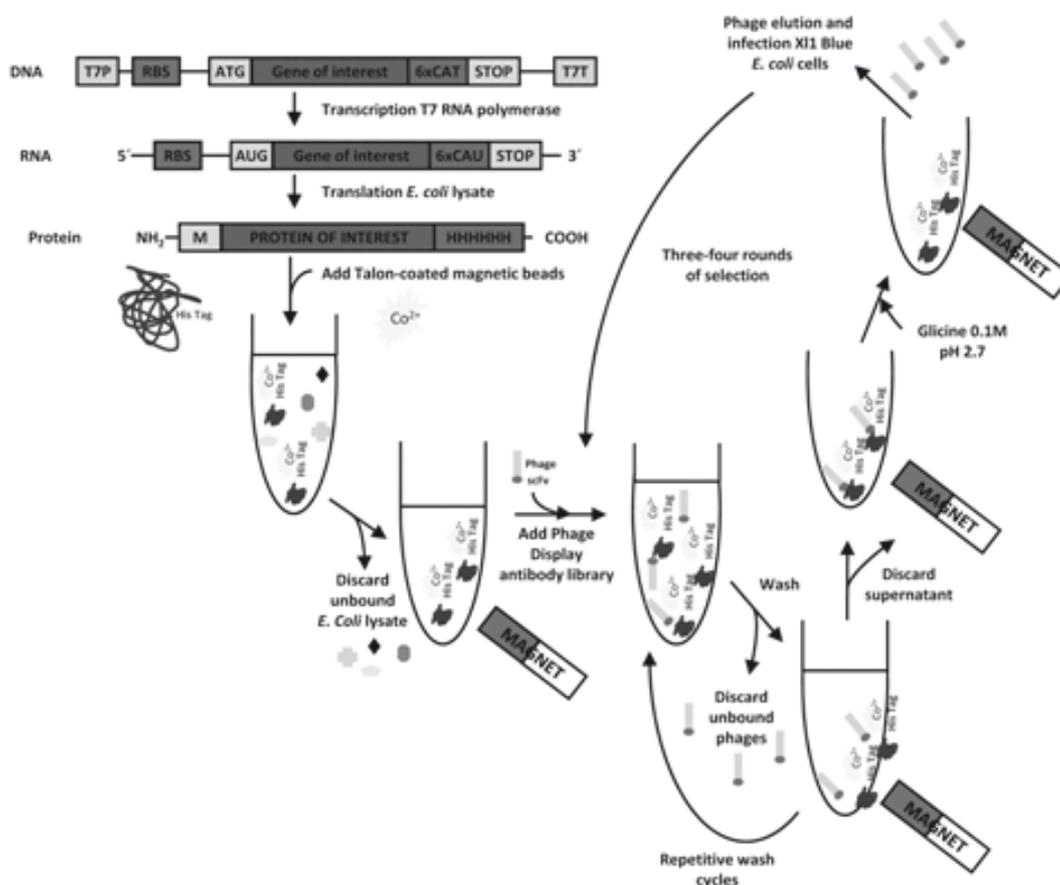


Figura 1. Esquema de expresión, purificación y selección de anticuerpos a la carta. Las proteínas se expresaron *in vitro* y purificaron usando bolitas magnéticas Dynabeads® TALON™. Alternativamente, las proteínas se eluyeron y dializaron frente a PBS para su marcaje con AlexaFluor 647 o, se utilizaron para la selección de anticuerpos recombinantes usando las librerías de scFvs humanas Mehta I y II.

teómicas: expresión y purificación de proteínas *in vitro*, selección utilizando Despliegue en Fagos y, finalmente, identificación de anticuerpos recombinantes mediante el cribaje de array de anticuerpos con la proteína marcada con AlexaFluor 647.

La aplicación de esta metodología nos ha permitido obtener anticuerpos monoclonales humanos recombinantes (scFvs) frente a cuatro proteínas -tiorredoxina, GFP, p53 y STK4- de diferente masa molecular (10-70 kDa), siendo p53 y STK4 proteínas difíciles de expresar. El proceso de expresión, purificación y selección de los anticuerpos aparece resumido en la Figura 1. El procedimiento completo incluye diferentes pasos. El primer paso consiste en la expresión de las proteínas *in vitro* utilizando vectores codificantes para las proteínas como fuente de DNA y un sistema de expresión *in vitro* (Roche) que permite realizar la transcripción y la traducción en un solo paso. La purificación a homogeneidad de las proteínas se realizó utilizando bolitas magnéticas Talon, mediante el Tag de Histidinas que incorporan las proteínas en su extremo C-terminal. El segundo paso consistió en la selección de los anticuerpos monoclonales recombinantes, que se realiza en solución utilizando las proteínas unidas a las bolitas magnéticas y la librería de anticuerpos humanos Mehta I y II [1-3]. En total, se realizaron 4 rondas de selección y se picaron 200 colonias individuales procedentes de la 3ª y 4ª ronda de selección de anticuerpos frente a cada proteína. Así, se testaron 400 clones individuales y 1600 clones en total para identificar scFvs frente a cada proteína. Finalmente, el tercer paso consistió en la identificación de las scFvs específicas de cada proteína que se realizó imprimiendo arrays de nitrocelulosa con los 1600 clones diferentes usando un robot de impresión Omnigridd. La selección de los clones positivos se realizó cribando los arrays de anticuerpos impresos en nitrocelulosa con las proteínas expresadas *in vitro* marcadas con el fluoróforo AlexaFluor 647. Finalmente, las scFvs identificadas se testaron por ELISA, inmunodetección en membrana e inmunofluorescencia.

Creemos que esta nueva metodología para obtener anticuerpos monoclonales humanos recombinantes por combinación de la expresión *in vitro* de proteínas, el uso de librerías de anticuerpos humanos desplegados en fagos y microarrays de anticuerpos

scFvs podría convertirse fácilmente en un sistema de alto rendimiento para obtener anticuerpos monoclonales frente a cualquier antígeno. El proceso completo requiere solo 5µg de proteínas, solucionando el cuello de botella habitual para la obtención de anticuerpos, dado que se necesitan grandes cantidades de proteína para la inmunización de animales y para el cribaje e identificación de los anticuerpos específicos de cada proteína. El nuevo procedimiento descrito nos permitió obtener anticuerpos frente a las cuatro proteínas utilizadas en el estudio STK4, p53, GFP y tiorredoxina que presentaban funcionalidad tras su impresión en arrays de nitrocelulosa (arrays de anticuerpos) y en ELISA, inmunofluorescencia e inmunodetección en membrana.

En resumen, esta nueva aproximación podría ser usada para la obtención de anticuerpos humanos de alta afinidad útiles en diagnóstico de patologías –dada su funcionalidad en arrays de anticuerpos– e incluso con fines terapéuticos si el antígeno usado en la selección de los anticuerpos fuese una diana terapéutica.

Agradecimientos

Rodrigo Barderas, PhD, tiene un Contrato Postdoctoral de Perfeccionamiento del FIS. Este trabajo se ha realizado gracias al Programa de Biotecnología del Ministerio de Educación y Ciencia BIO2006-07689.

Referencias

- [1] Sui J, Li W, Murakami A, Tamin A, Wong SK, Moore MJ, et al., Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human Mab to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:2536-2541.
- [2] Barderas R, Desmet J, Timmerman P, Meloen R, Casal JI. Affinity maturation of antibodies assisted by *in silico* modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:9029-9034.
- [3] Barderas R, Shochat S, Timmerman P, Hollestelle MJ, Martínez-Torrecuadrada JL, Höppener JW, et al., Designing antibodies for the inhibition of gastrin activity in tumoral cell lines. *Int J Cancer* 2008;122:2351-2359.