



Albertó, Marina

Desarrollo y evaluación de formulaciones vacunales a partir de miméticos de carbohidratos tumorales para el tratamiento del cáncer



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:

Albertó, M. (2019). *Desarrollo y evaluación de formulaciones vacunales a partir de miméticos de carbohidratos tumorales para el tratamiento del cáncer. (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/20.500.11807/2341>*

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

Desarrollo y evaluación de formulaciones vacunales a partir de miméticos de carbohidratos tumorales para el tratamiento del cáncer

TESIS DOCTORAL

Marina Albertó

marina.alberto5@gmail.com

Resumen

La glicosilación aberrante es un fenómeno altamente descrito en la transformación maligna y la progresión tumoral. Las alteraciones en el patrón de glicosilación pueden adquirir una variedad de formas: la pérdida o excesiva expresión de ciertos glicanos, la expresión aumentada de glicanos incompletos o truncados y, menos frecuentemente, la aparición de glicanos novedosos.

Dentro de los glicanos relevantes en cáncer podemos mencionar a la glicoproteína PSGL-1, la cual se encuentra sobreexpresada en varios tipos de tumores. Esta expresión se encuentra asociada a progresión tumoral, metástasis y regulación inmune. Algunos glicanos de la familia Lewis, Sialyl Lewis X, Lewis X y Lewis A se encuentran sobreexpresados en distintos tipos de cáncer, donde se los ha asociado a metástasis a una pobre supervivencia en pacientes.

El glicano truncado STn se encuentra expresados en el más del 80% de todos los carcinomas humanos, donde su presencia se asocia con la progresión tumoral, metástasis y mal pronóstico en pacientes. STn ha sido blanco de desarrollo de terapias ya que no se suele encontrar en tejidos adultos sanos.

El glicolípido GD2 se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer embrional como neuroblastoma, tumores de cerebro, retinoblastoma, entre otros. Este gangliósido GD2 está involucrado en crecimiento celular, proliferación, invasión y apoptosis.

Teniendo en cuenta que estos glicanos se encuentran expresados de manera diferencial en las células tumorales en comparación con los tejidos sanos y que están implicados en funciones biológicas relacionadas con la progresión tumoral, estos antígenos son buenos blancos para el desarrollo de terapias.

Dentro de las terapias antitumorales, las inmunoterapias han ido adquiriendo relevancia en los últimos años. Dentro de este grupo de terapias se encuentran las vacunas antitumorales. Estas buscan activar y dirigir al sistema inmune contra un blanco o antígeno específico en el tumor; suelen tener baja toxicidad y son fáciles de administrar. El desarrollo de vacunas

antitumorales basadas en carbohidratos ha avanzado en los últimos años y varias han logrado, escalar hasta ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, no hay ninguna terapia de este tipo aprobada para su uso comercial.

Este tipo de vacunas debe superar ciertas dificultades para poder lograr activar mecanismos citotóxicos y poder tener una efectiva respuesta inmune antitumoral. Los carbohidratos son antígenos independientes de células T, por lo cual son frecuentemente pobres inmunógenos. En general, estos antígenos generan una respuesta inmune IgM débil, inadecuada para generar citotoxicidad antitumoral. Por otro lado la producción a gran escala de carbohidratos sigue siendo un proceso complejo.

Existe, sin embargo, otra estrategia para desarrollar vacunas antitumorales dirigidas a glicanos presentes en el tumor que podría superar estas dificultades: la de utilizar péptidos que mimeticen carbohidratos o partes de ellos. Los péptidos pueden generar respuestas inmunes fuertes y pueden ser amplificados con técnicas de ingeniería genética en grandes cantidades o simplemente sintetizados de manera química. Además estos péptidos son seguros, estables y pueden ser fusionados a distintos carriers para aumentar su inmunogenicidad.

Un método que se ha aplicado para seleccionar este tipo de péptidos es la utilización de bibliotecas de fagos que expresan en su superficie millones de péptidos con combinaciones al azar de aminoácidos. Al desafiar esta biblioteca contra anticuerpos específicos para el glicano de interés se seleccionarán péptidos que mimeticen el carbohidrato. Este tipo de mimética se denomina antigénica. Se espera que estos péptidos puedan actuar como vacunas antitumorales, generando una respuesta inmune con reactividad cruzada hacia el glicano de interés, fenómeno que se denomina “mimética inmunológica”.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar formulaciones vacunales basadas en péptidos miméticos de glicanos relevantes en cáncer, tales como PSGL-1, SLeX, LeX, LeA, STn y GD2. Para ello se seleccionaron péptidos miméticos utilizando una biblioteca de fagos y anticuerpos monoclonales específicos para los glicanos. Posteriormente, se fusionaron las secuencias de los péptidos al carrier bacteriano BLS (*Brucella Lumazina* sintetasa). Las quimeras de BLS resultantes exponen 10 copias del péptido y resultan altamente inmunogénicas. Por último se evaluaron distintos esquemas de inmunización con las quimeras de BLS en modelos murinos, de modo de analizar si la respuesta inmune generada tenía reactividad cruzada con los glicanos de interés.

Se lograron identificar péptidos capaces de ser reconocidos por el Ac anti-GD2, el Ac anti-SLeX, el Ac anti-PSGL-1 y el Ac anti-LeA. De esta primera serie de péptidos se logró seleccionar 4 candidatos para GD2, 2 para SLeX, 4 para PSGL-1 y 7 para LeA que lograron demostrar, en mayor o menor medida, tener mimética antigénica con los glicanos. Las secuencias de los candidatos GdC y SxA fueron fusionadas a la proteína carrier BLS generándose dos proteínas quiméricas. La quimera GdC logró ser expresada y purificada,

corroborándose su mimética antigénica con el gangliósido GD2. La quimera SxA logró ser expresada y se obtuvieron dos formulaciones de la misma: la quimera agregada por un lado y la quimera en 4M urea por el otro, ambas en buffer PBS. Esta quimera sólo mantuvo su mimética antigénica con el carbohidrato SLeX, en condiciones desnaturalizantes.

Por último, se evaluó la capacidad de la quimera GdC y de las dos formulaciones de la quimera SxA de generar una respuesta inmune con reactividad cruzada hacia los glicanos de interés. Para ello se ensayaron dos protocolos distintos de inmunización en tres cepas de ratones con distinto haplotipo de MHC: C57, BALB/c y CF1. En el caso de la quimera GdC, sólo se pudo detectar respuesta contra GD2 en el suero de un ratón C57 utilizando el protocolo 1 de inmunización, mediante ELISA contra el gangliósido puro y mediante citometría de flujo contra una línea celular positiva para GD2. Sin embargo este resultado no se pudo replicarse en otros ensayos de inmunización. Por otro lado, con respecto a la quimera SxA, sólo los sueros de dos ratones de la cepa CF1 lograron reconocer una línea celular tumoral positiva para SLeX utilizando la quimera agregada y el protocolo 1 de inmunización.

El fenómeno de mimética inmunológica es muy complejo y se han reportado varios casos como el nuestro, en donde péptidos que mostraron mimética antigénica, fallan a la hora de generar respuestas inmunes fuertes con reactividad cruzada hacia el glicano de interés. Esta es la primera vez que se utiliza este diseño experimental para el desarrollo de inmunoterapias antitumorales basadas en péptidos miméticos de glicanos en nuestro país. Aunque las inmunizaciones no hayan arrojado resultados satisfactorios concluyentes, esta experiencia sirvió para comprender mejor estos procesos de manera de optimizar, en el futuro, estrategias terapéuticas similares.

Universidad Nacional de Quilmes
Departamento de Ciencia y Tecnología
Laboratorio de Oncología Molecular

Trabajo de Tesis Doctoral

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE
FORMULACIONES VACUNALES A PARTIR DE
MIMÉTICOS DE CARBOHIDRATOS TUMORALES
PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

Aspirante al Título de Doctor en Ciencia y Tecnología:

Lic. Marina Albertó

Director: Dr. Mariano R. Gabri

Co-Director: Dr. Fernando A. Goldbaum

Índice

Introducción	11
El cáncer	13
Glicosilación aberrante en cáncer.....	14
Glicanos relevantes como blancos terapéuticos	16
Ligandos de selectinas	16
Glicanos de la familia Lewis	17
Glicanos truncados.....	19
Gangliósidos.....	20
Inmunoterapias para el tratamiento del cáncer: vacunas antitumorales basadas en carbohidratos.....	23
Péptidos miméticos de glicanos.....	26
Bibliotecas de fagos como herramienta de generación de péptidos miméticos	29
Lumazina sintetasa de <i>Brucella</i> spp. (BLS) como <i>carrier</i> en plataformas vacunales.	31
Objetivos.....	34
GENERAL	35
ESPECÍFICOS	35
Materiales y métodos generales	36
Líneas celulares y condiciones de cultivo	37
Anticuerpos.....	37
Animales.....	38
Capítulo I.....	39
Identificación y caracterización de péptidos miméticos de glicanos mediante una biblioteca de fagos.....	39

Objetivos	Capítulo I	40
Materiales y métodos	Capítulo I	42
1.1	Identificación de candidatos a péptidos miméticos de glicanos mediante una biblioteca de fagos.....	43
1.1.1	Biblioteca de fagos.....	43
1.1.2	Comprobación de la mimética antigénica mediante ELISA de los fagos obtenidos.....	45
1.2	Caracterización y evaluación de los candidatos seleccionados.....	45
1.2.1	Secuenciación de los péptidos candidatos.	45
1.2.2	Análisis de homologías de secuencia e hidrofobicidad de los péptidos candidatos.	45
1.2.3	Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los péptidos candidatos seleccionados.....	46
1.2.4	Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los péptidos candidatos seleccionados.	46
Resultados	Capítulo I.....	47
Selección de candidatos a péptidos miméticos del gangliósido GD2.....		48
Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.....		48
Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.		50
Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los candidatos seleccionados.		50
Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato SLeX.		52
Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.....		52
Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.		52
Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los candidatos seleccionados.		52

Selección de candidatos a péptidos miméticos de la glicoproteína PSGL-1.....	55
Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.....	55
Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.	55
Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los candidatos seleccionados.	57
Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato LeA.	58
Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.....	58
Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.	59
Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato LeX.	61
Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.....	61
Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato STn.	62
Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.....	62
Discusión Capítulo I	64
Conclusión Capítulo I.....	72
Capítulo II.....	74
Clonación y expresión de los candidatos GdC y SxA como quimeras de BLS.....	74
Objetivos Capítulo II	75
Materiales y métodos Capítulo II	77
2.1 Clonación de la secuencia de los péptidos candidatos y generación de las quimeras.....	78
2.2 Expresión de las quimeras.	79
2.2.1 Evaluación de la expresión de las quimeras en los distintos clones.....	79
2.2.2 Optimización de las condiciones de inducción y expresión de la quimera.	80
2.3 Purificación de las quimeras	80

2.3.1 Purificación de la quimera GdC a partir de la fracción citoplasmática...	80
2.3.2 Purificación de la quimera SxA a partir de cuerpos de inclusión.	81
2.4 Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras	81
2.4.1 Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras mediante ELISA.	81
2.4.1 Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras mediante Western Blot.....	82
2.5 Estructura tridimensional teórica de las quimeras.....	82
Resultados Capítulo II	83
Clonación de la secuencia de los péptidos candidatos y generación de las quimeras.....	84
Evaluación de la expresión de las quimeras en los distintos clones.....	86
Optimización de las condiciones de inducción y expresión de las quimeras.	87
Purificación de las quimeras	88
Purificación de la quimera GDC.....	88
Purificación de la quimera SxA	89
Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras	90
Estructura tridimensional teórica de las quimeras.....	92
Discusión Capítulo II	93
Conclusión Capítulo II.....	97
Capítulo III.....	99
Evaluación de la capacidad inmunogénica de las quimeras en modelos murinos.	99
Objetivos Capítulo III	100
Materiales y métodos Capítulo III	102
3.1 Inmunización de animales con las quimeras.	103
3.2 Obtención de suero.....	103
3.3 Evaluación de la respuesta inmune.	103

3.3.1 ELISA contra los glicanos puros.....	103
3.3.2 Citometría de flujo contra células con expresión de los glicanos.....	104
Resultados Capítulo III	105
Inmunizaciones con la quimera GdC.....	106
Inmunizaciones con la quimera SxA.	111
Discusión Capítulo III	116
Conclusión Capítulo II.....	126
Conclusión final y perspectivas a futuro	128
Anexo.....	131
Agradecimientos.....	134
Bibliografía.....	135

Introducción

El cáncer

El cáncer es un conjunto heterogéneo de enfermedades que resultan de la acumulación de alteraciones moleculares en células propias del organismo. Esta desregulación genética deriva en células que se describen como “transformadas”, las cuales poseen, característicamente, una proliferación anómala, independiente de las señales regulatorias que impone normalmente el microambiente tisular; esto desemboca en la formación anómala de “nuevos crecimientos” denominados neoplasias¹. Las neoplasias benignas son aquellas que se circunscriben a su localización original presentando un límite definido en la arquitectura tisular que las rodea, mientras que las neoplasias malignas están originadas por células agresivas con capacidad de invadir los tejidos circundantes, diseminarse y formar focos metastásicos en sitios distantes².

El proceso de carcinogénesis se define por el recorrido sobre múltiples pasos en los que se produce la transformación paulatina desde las células somáticas normales hacia las células cancerosas. Estas células malignas se caracterizan por su capacidad de proliferación desmedida, evasión de mecanismos supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular (apoptosis), adquisición de inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, evasión del sistema inmune, reprogramación del metabolismo energético y acceso a otros espacios tisulares, entre otras características. La ganancia de estas habilidades está asentada en un fenómeno de inestabilidad genómica, dado por la desregulación de mecanismos de control que sucede en la célula transformada en etapas tempranas de este proceso. La alta frecuencia de mutaciones en las células tumorales genera una diversidad genética entre las células que conforman la masa tumoral dando lugar a la selección de los clones que contengan un fenotipo adecuado para el ambiente tisular local. De esta manera, la progresión tumoral escalonada se puede explicar como una suma de expansiones clonales, cada una de las cuales está desencadenada por la adquisición azarosa de un genotipo mutante ventajoso³.

La progresión tumoral consta de varias etapas. En principio, como se mencionó anteriormente, una célula comienza a adquirir mutaciones que generarán una inestabilidad genética, la cual les permitirá a su vez, adquirir características genotípicas

y fenotípicas distintivas. Esto da lugar a un fenómeno de proliferación desmedida propio de la patología. Para mantener la proliferación exacerbada las células deben atravesar un proceso de inmortalización celular en el cual logran adquirir la capacidad de evadir los procesos de apoptosis y senescencia celular mediante mutaciones particulares. Además, el aumento de la masa celular demanda nutrientes y oxígeno por lo que se promueven los procesos de reclutamiento vascular. La adquisición de las capacidades de migración, de adhesión a la matriz extracelular y de degradación de la misma para invadir tejidos circundantes resumen los comportamientos principales que hacen que la neoplasia pueda acceder a tejidos vecinos.

La intravasación vascular linfática o sanguínea, junto a la suma de habilidades tales como la promoción de la trombosis y la evasión del sistema inmune, brinda el escenario para la diseminación a órganos distantes que en el marco de un microambiente favorable, será el espacio para el desarrollo de micrometástasis y tumores secundarios en estos órganos³⁻⁵. Durante esta progresión tumoral que llega a la metástasis, se establece una comunicación activa entre las células tumorales y el estroma, mediado por señales autócrinas, parácrinas o endócrinas mediante contactos célula-célula o señales de tipo factores de crecimiento y citoquinas, entablando una comunicación análoga a la establecida entre una célula epitelial y su ambiente durante el desarrollo embrionario⁴.

Una característica tumoral que está relacionada con muchos de los procesos de transformación maligna mencionados, es el fenómeno de glicosilación aberrante; el cual se discutirá en la siguiente sección⁶.

Glicosilación aberrante en cáncer

La glicosilación es el proceso de adición, mediante un enlace covalente, de diversas unidades de monosacáridos sobre proteínas, lípidos u otros compuestos orgánicos; utilizando como donores nucleótidos-azúcar específicos. Las cadenas de polisacáridos que se forman en este proceso suelen denominarse “glicano”; este término engloba cualquier azúcar o ensamblado de azúcares, encontrados ya sea de forma libre o unidos a otra molécula. Las enzimas que realizan estos enlaces covalentes se denominan glicosiltransferasas, dentro de este grupo podemos encontrar enzimas que unen ciertos

residuos en particular, como las sialiltransferasas o las fucosiltransferasas. Adicionalmente hay un número de transferasas que modifican los glicanos mediante la adición de grupos acetilo, metilo, fosfatos y sulfatos entre otros⁷.

La gran diversidad estructural de los glicanos, sumado al hecho de que forman parte de otras moléculas como glicoproteínas y glicolípidos, resulta en un espectro muy amplio de funciones. En principio tienen una función estructural, de protección, organización y estabilización, funcionando muchas veces como barrera celular. Pueden poseer propiedades moduladoras, estando involucrados en el almacenamiento de nutrientes u otras moléculas relevantes. Por otro lado, al encontrarse en la superficie exterior de la célula y en macromoléculas secretadas, los glicanos están en posición de modular o mediar una variedad de eventos claves en interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y célula-molécula. Estas interacciones suelen darse mediante la interacción con proteínas específicas de unión a carbohidratos que incluyen el grupo de las lectinas, selectinas y galectinas^{7,8}.

La glicosilación aberrante es un fenómeno altamente descrito en la transformación maligna y la progresión tumoral, constituyendo un elemento fundamental de las células tumorales⁶⁻¹⁰. Las alteraciones en el patrón de glicosilación pueden adquirir una variedad de formas: la pérdida o excesiva expresión de ciertos glicanos, la expresión aumentada de glicanos incompletos o truncados y, menos frecuentemente, la aparición de glicanos novedosos⁷. La presencia de glicosilación aberrante estaría dada por la expresión disminuida o aumentada de ciertas glicosiltransferasas. Estas enzimas podrían tener su actividad glicosídica alterada, estar desreguladas a un nivel epigenético, transcripcional o post-transcripcional; la actividad de la chaperona encargada de su correcto plegamiento podría estar alterada. Por otro lado, la expresión alterada del glicoconjugado aceptor junto la disponibilidad y abundancia de los donores nucleótidos-azúcar y la actividad alterada de los transportadores de estas moléculas también podrían afectar la actividad de las glicosiltransferasas^{6,10}.

Estos cambios en la glicosilación no son simplemente la consecuencia al azar de un proceso de biosíntesis alterado en las células tumorales; es sorprendente que sólo un grupo muy limitado de cambios están frecuentemente correlacionados con la transformación maligna y la progresión tumoral. Teniendo en cuenta que el cáncer es un proceso “microevolutivo” en el cual sólo las células más aptas sobreviven, es muy

probable que estos cambios específicos en los glicanos sean seleccionados durante la progresión tumoral⁷. La mayoría de estas alteraciones en la glicosilación están relacionadas con procesos de adhesión celular, transición epitelio-mesenquimal, migración, invasión, metástasis y resistencia a quimioterapia^{8,11,12}.

Teniendo en cuenta que ciertos glicanos se encuentran expresados de manera diferencial en las células tumorales en comparación con los tejidos sanos y que están implicados en funciones biológicas relacionadas con la progresión tumoral, estos antígenos son buenos blancos para el desarrollo de terapias¹³.

En la siguiente sección se detallarán algunas familias de glicanos relevantes en cáncer.

Glicanos relevantes como blancos terapéuticos

Ligandos de selectinas

Las selectinas son una familia de proteínas que se unen a carbohidratos, generalmente se expresan en células endoteliales y en células derivadas de la médula ósea¹⁴. Las L-selectinas se expresan en leucocitos; las E-selectinas en células endoteliales y las P-selectinas se encuentran presentes tanto en plaquetas como en células endoteliales^{14,15}. La función fisiológica de las selectinas y sus ligandos azucarados es mediar el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación o a los tejidos linfoides. Sin embargo, se ha comprobado que las células tumorales sobreexpresarían ligandos de selectinas, permitiéndoles modificar sus capacidades de adhesión, invasión y metástasis¹⁴⁻¹⁶.

A pesar que existen varias proteínas glicosiladas capaces de unirse a las diferentes selectinas, la glicoproteína PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*) es uno de los ligandos más relevantes ya que puede unirse a las tres selectinas (Figura 1)¹⁵. PSGL-1 esta expresada en varios tipos de tumores asociada a progresión tumoral, metástasis y regulación inmune^{15,17,18}. Cuando se encuentran en el torrente sanguíneo, la expresión de este ligando les permite a las células tumorales unirse a plaquetas activadas mediante P-selectina. Este recubrimiento les permite protegerse del estrés mecánico y del reconocimiento por parte del sistema inmune. Además, la formación de estos agregados induce la activación de las células endoteliales y la consiguiente sobreexpresión de E- y

P-selectina. A través de PSGL-1, las células tumorales pueden unirse a las células endoteliales activadas y “rodar” a través del vaso sanguíneo siempre adheridas al endotelio (proceso más conocido como *rolling*). Mediante la unión a L-selectina, se reclutan neutrófilos activos y monocitos, los cuales ayudarían a la adhesión de las células tumorales a la pared de los vasos sanguíneos y a la extravasación; y, junto con los factores mitogénicos secretados por la plaquetas activadas, generarían un nicho pre-metastático¹⁵.

Por otro lado, se ha reportado recientemente que PSGL-1 funcionaría como un regulador de puntos de control de los linfocitos T: favoreciendo el agotamiento de estas células, inhibiendo la secreción de IL-2 y regulando positivamente la expresión de la proteína PD-1 (*programmed cell death 1*)¹⁴.

La unión de PSGL-1 a las selectinas esta mediada por su parte glicosilada. La presencia de los glicanos Sialyl Lewis x, Sialyl Lewis a y Sialyl-6-sulfo Lewis x serían indispensables para la unión a las distintas selectinas¹⁴⁻¹⁶. Todas estas características biológicas convierten a PSGL-1 en un blanco glicosilado muy relevante en cáncer.

Glicanos de la familia Lewis

Estos glicanos son una familia de antígenos sanguíneos que se caracterizan por poseer un residuo de fucosa unido mediante un enlace α 1-3 o α 1-4. Incluyen a los glicanos Lewis a, b, x, y, a los cuales denominaremos LeA, LeB, LeX y LeY; y las versiones sulfatadas o sialiladas de algunos de ellos (es decir que poseen un residuo terminal de ácido siálico) tales como Sialyl Lewis x (SLeX), Sialyl Lewis a (SLeA) y Sialyl-6-sulfo Lewis x⁷. Estos glicanos se encuentran presentes en glicoproteínas y glicolípidos; dependiendo del tipo de célula o tejido donde se encuentran expresados estarán involucrados en distintos procesos inter e intracelulares, tales como adhesión celular y comunicación entre células durante la embriogénesis y el desarrollo¹². Muchos de estos antígenos se encuentran aberrantemente sobreexpresados en diferentes tipos de tumores, brindándoles distintas capacidades a las células tumorales^{7,12,13}.

SLeX (Figura 1) y su isómero SLeA se encuentran sobreexpresados en muchos tipos de cáncer, particularmente en carcinomas, donde se encuentran asociados a metástasis y a una pobre supervivencia en pacientes^{10,19,20}. Estos glicanos terminales se encuentran presentes en la superficie de glicoproteínas, tales como PSGL-1, y constituyen el motivo

mínimo que reconocen las tres selectinas^{14,21}. Las células tumorales que derivan de distintos órganos interaccionan con las diferentes selectinas a través de un isómero por sobre el otro. Por ejemplo, las células tumorales de colon y páncreas se adhieren a E-selectina mediante SLeA, mientras que las de pulmón e hígado lo hacen mediante SLeX¹⁹. La interacción entre las selectinas y estos glicanos, sobre todo SLeX presente en PSGL-1, tiene un rol indispensable en la cascada metastásica^{10,15}. Es por esto que este antígeno se ha propuesto como marcador pronóstico en distintos tipos de cáncer, tales como cáncer de colon, pulmón, mama, estómago, próstata y vejiga^{19,22}.

LeX (Figura 1), también llamado SSEA-1: *stage-specific embryonic antigen-1*, se encuentra expresado en estadios embrionarios; en adultos se encuentra moderadamente expresado en algunos tejidos^{12,13}. Sin embargo, se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de cáncer. En cáncer de pulmón su sobreexpresión se ha asociado con un tiempo corto de supervivencia en pacientes. Además, su expresión es un factor pronóstico independiente de supervivencia en pacientes jóvenes con cáncer de mama triple negativo y está correlacionado con una pobre supervivencia total y libre de recurrencia. Por otro lado, se ha reportado que en cáncer colorrectal la expresión de LeX en la superficie de células tumorales y células inflamatorias infiltrantes, aumenta durante la progresión de la enfermedad y se lo ha asociado con resistencia a las terapias convencionales para este tipo de cáncer. Este antígeno también se encuentra altamente expresado en cáncer de páncreas, carcinoma renal y de vejiga. En esta última indicación se lo considera un marcador de transformación maligna y su expresión se ha correlacionado con estadio, grado y potencial metastásico. En glioblastoma, LeX se encuentra sobreexpresado y se lo ha propuesto como un posible marcador de células madre tumorales¹².

LeA (Figura 1) se encuentra presente de forma soluble siendo secretada por el epitelio de ciertos órganos. Además se encuentra en eritrocitos, los cuales lo captan de los glicanos circulantes⁷. Se encuentra sobreexpresado en adenocarcinoma pulmonar, donde su presencia aumenta con el estadio del tumor. Además se lo ha asociado con una menor supervivencia con respecto a los tumores negativos para LeA en esta indicación²³. Este glicano también ha sido detectado en un gran porcentaje de tumores de páncreas y tumores gástricos^{24,25}

Glicanos truncados

Como se explicó anteriormente, alteraciones en las glicosiltransferasas pueden generar un freno en la elongación de las cadenas de glicanos complejos, resultando en la aparición de los llamados glicanos truncados. Estos incluyen al antígeno T (Thomsen-Friedenreich), a Tn (Thomsen-nouvelle) y sus formas sialiladas: Sialyl T (ST) y Sialyl Tn (STn)^{10,26-28}. La expresión de estos antígenos incompletos se observa generalmente en tejidos embrionarios y no se suelen encontrar en tejidos adultos sanos²¹; de hecho, se ha descrito la presencia de anticuerpos (Ac) naturales contra estos glicanos²⁶. Estos antígenos truncados suelen aparecer en los cánceres epiteliales, en los estadios tempranos de la progresión tumoral, donde estarían involucrados en cambios relacionados con el aumento en la proliferación, la pérdida de la arquitectura tisular, la disrupción de la adhesión a la membrana basal y la capacidad invasiva²⁷.

Los antígenos T, Tn, ST y STn se encuentran expresados en el más del 80% de todos los carcinomas humanos, como colon, mama, vejiga, ovario, próstata y estómago; su presencia se asocia con la progresión tumoral, metástasis y mal pronóstico en pacientes^{9,27,28}.

STn ha sido uno de los glicanos asociados a tumor más estudiado (Figura 1). Se ha reportado que la expresión de STn en carcinomas gástricos modula el fenotipo maligno, induciendo un comportamiento celular más agresivo, con una disminución de la agregación célula-célula y un aumento en la interacción con la matriz extracelular, la migración y la invasión¹⁰. En cáncer de mama, aproximadamente el 30% de los tumores son positivos para STn, su presencia se asocia con un menor índice de supervivencia¹⁹. Su expresión sobre la glicoproteína MUC1 se asoció con una reducción de la adhesión celular y un aumento en la migración; su presencia en la glicoproteína integrina $\beta 1$ se asoció con metástasis⁹. En cáncer de próstata, STn se detecta en la mitad de los tumores de alto grado y su expresión sobre la glicoproteína MUC1 se ha correlacionado con supervivencia. En cáncer de endometrio se lo ha correlacionado con grado histológico y metástasis en nodos linfáticos²⁷.

Otro rol interesante de STn está relacionado con el sistema inmune. Se ha reportado que este antígeno asociado a mucinas puede inhibir la citotoxicidad inducida por las células NK (*natural killer*) dirigida al tumor^{21,28}. Por otro lado, se ha propuesto que este

glicano estaría involucrado en evitar que la células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo sean detectadas y eliminadas por el sistema inmune²⁷. Por estas razones, STn se ha propuesto como un importante marcador pronóstico y como target para el diseño de terapias antitumorales, en particular, inmunoterapias^{10,27,28}.

Gangliósidos

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos con al menos un residuo de ácido siálico; en general se encuentran en la membrana plasmática formando microdominios compuestos por glicolípidos y receptores de proteínas, también llamados glicosinapsis. Estas estructuras participan en procesos de señalización celular, comunicación intercelular y en la arquitectura y funcionalidad de la membrana plasmática^{29,30}. La sobreexpresión de estas moléculas en las células tumorales está relacionada con la modulación de ciertas vías de señalización relevantes en el proceso de transformación maligna, como así también en los procesos de interacción de la célula con su microambiente^{10,13}.

Algunos de los gangliósidos más relevantes en cáncer son GD2, GD3, fucosil-GM1 y GM3. Estos glicanos están involucrados en la regulación de varios receptores de factores de crecimiento tales como EGFR y FGFR, favoreciendo el crecimiento tumoral mediante la modulación de señales^{10,13}. De hecho, se ha reportado que GM3 y GM1 funcionan como reguladores negativos de los receptores de tirosina quinasa de estos factores de crecimiento mientras que GD2 y GD3 funcionan como activadores. En tumores como melanoma, neuroblastoma y cáncer de mama, la sobreexpresión de gangliósidos está asociada a proliferación celular, crecimiento tumoral y migración¹⁰. Mientras que en melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y leucemia linfobástica aguda de células T pediátrica la sobreexpresión de GD3 se asocia con aumento en el crecimiento celular y un mayor potencial invasivo. GM3 ha sido muy estudiado en distintos tipos de cáncer ya que es capaz de alterar la fosforilación del receptor de EGF, modulando de esta manera el crecimiento celular¹³.

Dentro de este grupo se destaca el gangliósido GD2 (Figura 1), el cual se encuentra en el puesto número 12 de los antígenos asociados a tumor más relevantes¹³. El mismo se encuentra expresado en estadios fetales, en la células madre neurales y mesenquimales; mientras que su expresión postnatal está restringida a neuronas

periféricas, sistema nervioso central y melanocitos cutáneos³¹. Sin embargo, se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer embrional como neuroblastoma, tumores de cerebro, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma y en tumores derivados de la cresta neural en adultos³². GD2 está involucrado en crecimiento celular, proliferación, invasión y apoptosis¹³. En particular en el caso de neuroblastoma, su expresión en la membrana celular es ubicua y se encuentra presente en todos los tumores primarios sin importar su estadio. Además se ha reportado que las células de neuroblastoma expresan muy altos niveles de la enzima responsable de la síntesis de GD2, la GM2/GD2 sintasa. Estas características han hecho de GD2 un blanco más que interesante para el desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento de neuroblastoma³³.

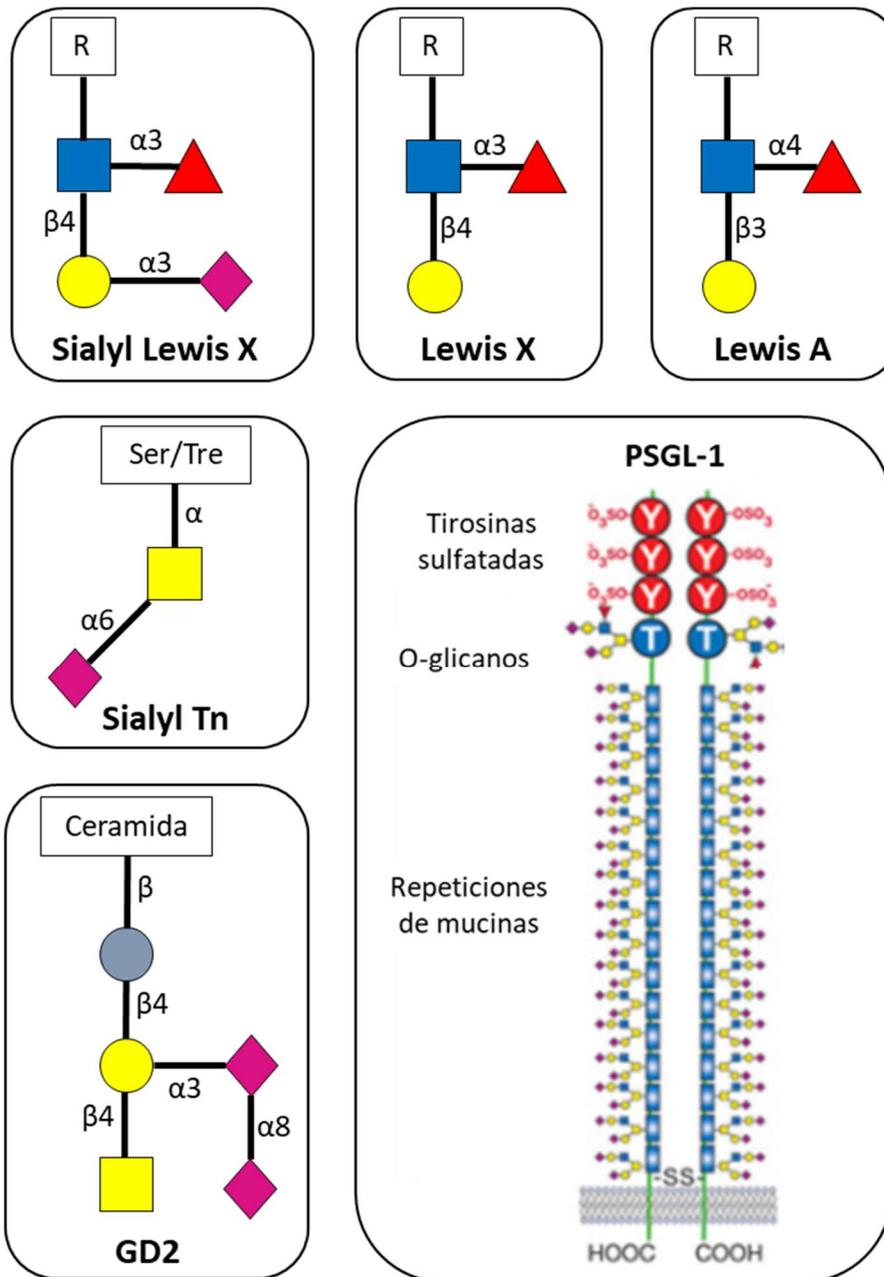
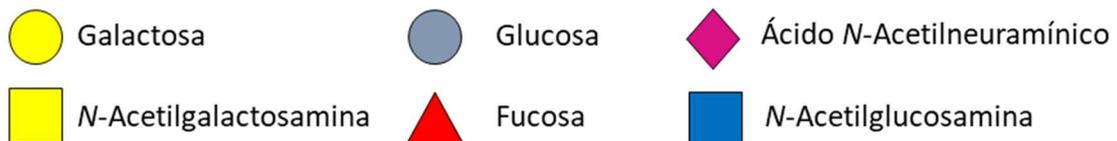


Figura 1 Estructura de los glicanos SLeX, LeX, LeA, STn, GD2 y la glicoproteína PSGL-1. Ser/Tre: puede ser un residuo de serina o treonina. R: cualquier cadena o arborización de glicanos o estructura proteica.



Inmunoterapias para el tratamiento del cáncer: vacunas antitumorales basadas en carbohidratos

El sistema inmune tiene un rol crítico en la progresión tumoral, pudiendo actuar como inhibidor del crecimiento tumoral: destruyendo las células tumorales, inhibiendo su crecimiento; como así también como promotor tumoral: generando un micro ambiente de señales proliferativas³⁴. La inmunoterapia oncológica ha explotado ambos roles del sistema inmune, siendo una estrategia de tratamiento que se utiliza en varios tipos de cáncer como melanoma³⁵, cáncer de mama³⁶, cáncer de pulmón de células no pequeñas³⁷, cáncer de páncreas³⁸, cáncer gástrico³⁹, cáncer de vejiga⁴⁰ y neuroblastoma³³, entre otros. Dentro de las inmunoterapias que “despiertan” al sistema inmune podemos encontrar dos grandes grupos: las activas y las pasivas. La inmunoterapia activa estimula al sistema inmune del paciente para que responda contra las células tumorales. La inmunoterapia pasiva por su parte, refiere a una batería de terapias basadas principalmente en Ac dirigidos contra antígenos de la célula tumoral, hechos fuera del organismo y administrados al paciente de manera de generar un efecto directo antitumoral, además de promover una respuesta inmunológica contra el tumor⁴¹. Las inmunoterapias en general pueden incluir distintas estrategias como el uso de Ac monoclonales contra blancos específicos presentes en el tumor o en el microambiente tumoral, Ac biespecíficos, el bloqueo de puntos de control inmunes, la transferencia de células adoptivas tales como linfocitos T con receptores modificados (*CART cells: chimeric antigen receptor T cell*), vacunas antitumorales, entre otras⁴²⁻⁴⁵.

En este trabajo nos centraremos en las vacunas antitumorales, una estrategia inmunoterapéutica atractiva debido a su fácil administración y baja toxicidad⁴⁶. Esta estrategia terapéutica busca activar y dirigir al sistema inmune contra un blanco o antígeno específico en el tumor. Los antígenos tumorales pueden clasificarse en dos categorías: los antígenos específicos de tumor o TSA (por sus siglas en inglés *tumor specific antigens*) incluyen antígenos que no se encuentran presentes en tejidos sanos adultos; los antígenos asociados a tumor o TAA (*tumor associated antigens*) involucran antígenos que se encuentran sobreexpresados en el tumor en relación a los tejidos sanos⁴⁷. La glicosilación aberrante ha sido un nicho de TSAs y TAAs; el hecho de que se han encontrado Ac naturales dirigidos a carbohidratos asociados a tumor en algunos

pacientes y que estos estarían asociados a un mejor índice de supervivencia, provee evidencia de que las vacunas dirigidas a estos blancos son viables⁴⁸.

Las vacunas terapéuticas necesitan un diseño racional que logre la activación de células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, que a su vez activen respuestas de linfocitos T CD4 y CD8. Estos linfocitos deben viajar e infiltrar el estroma tumoral y deben ser capaces de manifestar mecanismos efectores apropiados tales como lisis directa o secreción de citoquinas que puedan causar la destrucción del tumor⁴⁶. Las células T CD4 son necesarias para mantener una respuesta óptima y sostenida de células T efectoras CD8, además de inducir y mantener la memoria inmunológica⁴⁹. Recientemente, el rol de las células NK ha ido tomando relevancia en la inmunoterapia contra el cáncer^{50,51}. Estas células tienen un rol indispensable en la inducción del mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC por sus siglas en inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). El mecanismo de ADCC se activa cuando las células tumorales son reconocidas por Ac específicos que a su vez son reconocidos por receptores Fc particulares presentes en células citotóxicas efectoras, tales como NK. La eficacia clínica de muchas inmunoterapias pasivas y activas usadas en tratamientos contra el cáncer esta mediada por la inducción de ADCC a través de las células NK^{50,52}.

En particular, el desarrollo de vacunas antitumorales basadas en carbohidratos tiene que superar ciertas dificultades para poder lograr activar estos mecanismos citotóxicos y poder tener una efectiva respuesta inmune antitumoral. Los carbohidratos son antígenos independientes de células T, por lo cual son frecuentemente pobres inmunógenos. Los carbohidratos activan células B a través de sus receptores de superficie y las inducen a diferenciarse a células plasmáticas. Este tipo de célula sólo produce Ac del tipo IgM, los cuales tienen una vida media corta y son de baja afinidad. Esta respuesta inmune es inadecuada para combatir un tumor; la inducción de una respuesta inmune robusta y de larga vida media depende de las rutas dependientes de células T⁴⁸.

Para lograr aumentar la respuesta inmune de vacunas basadas en carbohidratos tumorales se han desarrollado distintas estrategias que permiten clasificar a estas vacunas en tres categorías: 1. las que fusionan los carbohidratos a estructuras que funcionan como *carriers* proteicos, sintéticos basados en nanopartículas, entre otros.

Estos *carriers* suelen contener epitopes de células T de manera de presentar los carbohidratos a los linfocitos T e introducir una respuesta dependiente de estas células, la cual será robusta y generará Ac IgG de alta afinidad. 2. las que modifican químicamente la estructura de los azúcares de manera de romper con la inmunotolerancia generada por alguno de estos antígenos y aumentar su inmunogenicidad. 3. las estrategias de auto-ensamblaje no covalentes que eliminan la respuesta inmune inespecífica generada por los *carriers*⁴⁸.

Las primeras vacunas de carbohidratos estaban basadas sólo en un tipo de glicano asociado a tumor. Las mismas tuvieron buenos resultados a nivel preclínico, pero su rendimiento en humanos no fue satisfactorio⁴⁸. Por ejemplo, una vacuna compuesta por LeY sintético conjugado a KLH como *carrier* obtuvo una respuesta inmune pobre en cáncer de ovario, aunque fue bien tolerado⁵³. De la misma manera, la fase III de los ensayos clínicos de la vacuna GM2-KLH para pacientes con melanoma de grado II no fue satisfactoria y de hecho la sobrevida de los pacientes tratados con la vacuna fue menor a los pacientes control^{54,55}. El ejemplo más famoso es sin duda la vacuna Theratope, compuesta por el glicano sintético STn conjugado a KLH. Aunque demostró ser bien tolerada en pacientes con cáncer de mama, en la fase III de los ensayos clínicos no demostró una mejora en la sobrevida o en el tiempo de progreso de la enfermedad. Sin embargo, su falla podría atribuirse al hecho de que no se evaluó previamente la expresión de STn en los tumores de las pacientes⁵⁶. Este glicano no se ha abandonado como blanco terapéutico y se continúa en la mejora de formulaciones vacunales basadas en este antígeno truncado.

EL grupo de Livingston PO ha sido uno de los pioneros en el desarrollo de vacunas de carbohidratos conjugados al *carrier* KLH, realizando pequeñas pruebas en humanos y optimizando las formulaciones y características de sus vacunas. Se pueden destacar las vacunas de fucosil GM1 y otra de ácido polisiálico para cáncer de pulmón de células pequeñas, GD2-lactona para melanoma, la glicoproteína MUC-1 y SLeA para cáncer de mama⁵⁷⁻⁶¹. Este grupo de investigación también incursionó en el desarrollo de vacunas multivalentes, las cuales contienen varios glicanos. Una estrategia involucra la fusión de los glicanos GM2, Globo H, LeY, T, Tn, STn y MUC-1 al *carrier* KLH para el tratamiento de distintos carcinomas, esta vacuna ha obtenido resultados prometedores^{62,63}.

A pesar de que el desarrollo de vacunas antitumorales basadas en carbohidratos ha avanzado en los últimos años y varias han logrado, en el pasado, escalar hasta ensayos clínicos en humanos, no hay ninguna terapia de este tipo aprobada para su uso comercial. Actualmente, varias de ellas se encuentran en ensayos clínicos. Una vacuna que conjuga el gangliósido GM2 al *carrier* KLH se encuentra en fase clínica III para el tratamiento de melanoma; la misma estrategia fue utilizada para los antígenos STn y Globo H, ambas se encuentran en fase III para cáncer de mama. Otras estrategias que combinan varios glicanos, tales como Tn, Tf, Lewis Y y GM2 conjugados a diferentes *carriers* se encuentran en fase clínica I y II para distintos tipos de cáncer⁴⁸.

Todas estas estrategias involucran la utilización de carbohidratos sintéticos o modificaciones de los mismos. Existe, sin embargo, otra estrategia para desarrollar vacunas antitumorales dirigidas a glicanos presentes en el tumor: la de utilizar péptidos que mimeticen carbohidratos o partes de ellos. Esta estrategia se detallará a continuación.

Péptidos miméticos de glicanos

Como se explicó anteriormente, los carbohidratos presentan varias dificultades al momento de ser utilizados como componentes vacunales. El principal problema radica en el hecho de que son antígenos independientes de células T, por lo cual son frecuentemente pobres inmunógenos. Por otro lado la producción a gran escala de carbohidratos sigue siendo un proceso complejo: aunque podemos producir glicosiltransferasas recombinantes por medio de técnicas de ingeniería genética, no podemos producir carbohidratos de esta forma. Por lo cual la síntesis de carbohidratos se continúa realizando como una síntesis enzimática, obteniéndose baja cantidad de producto a altos costos. En este contexto el desarrollo de péptidos que mimeticen carbohidratos podría superar estas dos dificultades: los péptidos pueden generar respuestas inmunes fuertes y pueden ser amplificados con técnicas de ingeniería genética en grandes cantidades o simplemente sintetizados de manera química. Además estos péptidos son seguros, estables y pueden ser fusionados a distintos *carriers* para aumentar su inmunogenicidad^{64,65}.

Se denomina mimética antigénica al fenómeno mediante el cual un ligando compite con otro por la unión a un Ac. El origen de la reactividad cruzada involucra interpretaciones termodinámicas y estructurales. La noción de mimética inmunológica es menos precisa, podría involucrar la generación del mismo subconjunto de Ac que el antígeno nominal o la inducción de una respuesta inmune con reactividad cruzada hacia este antígeno⁶⁶. Lo importante es destacar que los péptidos miméticos de glicanos han demostrado poder generar Ac reactivos a carbohidratos en una variedad de sistemas. El éxito de los péptidos miméticos como estrategia inmunoterapéutica depende de la habilidad de estos de generar una respuesta de Ac cruzada o inducir linfocitos T que reconozcan glicopéptidos asociados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I⁶⁷. De hecho, estos péptidos tienen la habilidad de mediar la ayuda de las células T dependiente de contacto como un rol obligatorio en las respuestas inmunes humorales a los antígenos independientes de células T. Las interacciones célula B-célula T que ocurren durante la respuesta inmune a antígenos proteicos depende de la coestimulación de las células T⁶⁶.

Dado que los péptidos no muestran similitudes con los carbohidratos en estructura o química, la manera en que mimetizan glicanos no es obvia en principio. Se describen dos mecanismos principales para explicar esto: mediante una mimética estructural, donde los péptidos mimetizan los contactos hechos por el carbohidrato gracias a un arreglo tridimensional similar de grupos funcionales haciendo uso de su gran flexibilidad; y mediante una mimética funcional, donde los péptidos se unen mediante un grupo diferente de contactos o utilizan un sitio de unión alternativo al usado por el carbohidrato⁶⁸.

Existen varios péptidos miméticos de glicanos tumorales que han sido utilizados en distintas estrategias vacunales, alcanzando a generar respuestas inmunes reactivas contra los glicanos blanco y en muchos casos, logrando proteger contra tumores positivos para estos antígenos a nivel preclínico. El grupo de Kozbor *et al.* logró desarrollar un péptido mimético del gangliósido GD2 utilizando una biblioteca de fagos; el mismo fue optimizado aumentando su mimética mediante técnicas de modelado y estudios de mutagénesis. Una estrategia vacunal basada en un plásmido codificante de este péptido optimizado fue evaluada a nivel preclínico, donde demostró poder generar

Ac con reactividad cruzada al gangliósido, capaces de mediar ADCC y de proteger contra tumores de melanoma en modelos murinos⁶⁹.

Otro ejemplo es el desarrollo de un péptido mimético de un epítipo de la glicoproteína CEA (*carcinoembryonic antigen*), también utilizando una biblioteca de fagos. La vacuna generada a partir de una estructura octamérica de este péptido logró generar una respuesta inmune específica contra CEA capaz de proteger contra tumores positivos para este antígeno a nivel preclínico⁷⁰. Por otro lado, un péptido mimético de GD3 seleccionado mediante una biblioteca de fagos logró generar una respuesta inmune capaz de reconocer al gangliósido presente en células tumorales y en muestras de tumores de melanoma⁷¹.

El grupo de Thomas Kieber-emmons tiene una amplia experiencia en el desarrollo de péptidos miméticos de glicanos. Han generado miméticos de ligandos de lectinas con capacidad apoptótica⁷²; una vacuna multimérica formada por péptidos miméticos de SLeX y SLeA, la cual induce una respuesta inmune celular contra estos antígenos a nivel preclínico⁷³, entre otros similares. Es destacable el desarrollo de una vacuna compuesta por un péptido que mimetiza tanto al gangliósido GD2 como al glicano LeY, y por un péptido comercial denominado PADRE, que funciona como un epítipo de linfocitos T *helpers* y tiene la capacidad de unirse a alelos de HLA-DR estimulando la respuesta inmune. Esta vacuna fue probada en ensayos clínicos de fase I en pacientes con cáncer de mama estadio IV, donde demostró ser bien tolerada sugiriendo un beneficio clínico potencial. Además, la vacuna generó Ac reactivos contra GD2 y LeY en todas las pacientes, los cuales fueron capaces de generar apoptosis en líneas celulares positivas para estos antígenos⁷⁴.

Las estrategias de generación de miméticos de carbohidratos son variadas. Una de ellas es la denominada “ingeniería reversa basada en estructura”, la misma utiliza estructuras cristalográficas o modelados *in silico* de Ac o lectinas que reconocen glicanos para realizar un *docking* contra librerías digitales de fragmentos peptídicos⁶⁶. Un ejemplo de esta técnica es el desarrollo de péptidos miméticos de ligandos de la lectina Con A⁷⁵. Esta sección se ha focalizado en péptidos miméticos, pero es relevante destacar otra categoría de miméticos de glicanos que ha sido utilizada en el tratamiento contra el cáncer: los Ac anti-idiotipo. Estos Ac se generan mediante la inmunización con un Ac o lectina que reconoce glicanos. Los sueros de los animales inmunizados incluirán Ac

que reconocen el idiotipo del Ac o lectina utilizada, estos son denominados Ac anti-idiotipo. Al ser utilizados en una estrategia vacunal generarán Ac anti-anti-idiotipo, que reconocerán nuevamente al glicano original⁶⁵. Un ejemplo es la vacuna Racotumomab dirigida contra el gangliósido N-glycolyl GM3^{52,76,77}. Otra estrategia de generación de péptidos miméticos involucra la utilización de bibliotecas de fagos y Ac o lectinas, la misma se detalla a continuación.

Bibliotecas de fagos como herramienta de generación de péptidos miméticos

La tecnología de bibliotecas de fagos fue desarrollada en primer lugar por Smith en 1985 y modificada por McCafferty y colegas en 1990 para detectar Ac y péptidos específicos. La misma consiste en un sistema de selección *in vitro* basado en el *screening* de polipéptidos blanco expuestos sobre la superficie de un bacteriófago⁷⁸.

La gran flexibilidad de esta tecnología para exponer proteínas de varios tamaños y propiedades sin tener conocimiento previo de su estructura y secuencia ha llevado al desarrollo de diversas aplicaciones basadas en bibliotecas de fagos tales como desarrollo de Ac terapéuticos, maduración de afinidad de Ac, desarrollo de vacunas, identificación de receptores agonistas y antagonistas, mapeo de epitopes y búsqueda de péptidos miméticos⁷⁸.

Para este último uso existen bibliotecas de fagos comerciales que incluyen millones de péptidos con una combinación al azar de una cantidad específica de aminoácidos y que han sido utilizadas con éxito para la búsqueda de péptidos miméticos de glicanos así como de epitopes de proteínas^{64,71,79-81}.

La biblioteca de fagos utilizada en este trabajo está desarrollada sobre el bacteriófago M13; el mismo posee un DNA simple cadena que codifica para 11 proteínas víricas, que contribuyen a la replicación del DNA, el ensamblado y secreción de los fagos y la construcción de la cápside que cubrirá al DNA. Estas últimas son blanco de modificaciones para la expresión de péptidos^{78,82}. En el caso de nuestra biblioteca, la proteína de la cápside menor pIII esta modificada para exponer un péptido fusionado a su extremo N-terminal⁸³⁻⁸⁵. Esta proteína modula la infectividad del fago al unirse al *pilus F* de la bacteria hospedadora (*Escherichia coli*) y está presente en un *cluster* con 5

copias de la misma en un extremo del virión maduro^{86,87}. Si el péptido fusionado es relativamente corto (menor a 50 residuos) la infectividad de pIII no se ve afectada y las 5 copias pueden llevar fusionado el péptido⁸⁴. En este caso la biblioteca contiene péptidos lineales de 12 aminoácidos, más una secuencia *linker* de tres glicinas y una serina; la misma tiene una complejidad del orden de 10^9 clones independientes.

El procedimiento de selección de péptidos miméticos utilizando una biblioteca de fagos esta resumido en la Figura 2. El primer paso consiste en desafiar la biblioteca contra Ac específicos para cada glicano, los cuales se encuentran sensibilizados sobre la superficie de un *well* de una placa de 96. Se espera que existan dodecapéptidos que mimeticen al glicano, y pueden ser reconocidos por el Ac, de manera que queden retenidos en la placa luego de los lavados. Los fagos unidos serán eluidos utilizando una solución con pH ácido. Este procedimiento se denomina *panning*, se estima que luego de 3 rondas utilizando cada vez los fagos obtenidos en el *panning* anterior, se enriquecerá el conjunto de fagos capturados en favor de la afinidad de la unión con el Ac⁸². Entre cada *panning* los fagos eluidos son amplificados infectando *E. coli* de la cepa ER2738. El fago M13 no es un virus ni lítico ni lisogénico, actúa estableciendo una infección crónica en la bacteria hospedadora donde continuamente libera nuevos fagos.

Uno de los primeros experimentos donde se utilizó una biblioteca de fagos para desarrollar miméticos de glicanos fue realizado por Goldstein *et al.* en 1992: usando como blanco la lectina Con A , logró identificar péptidos miméticos de ligandos azucarados^{83,88}. Los péptidos contenían la secuencia consenso YPY y se unían a Con A con alta afinidad, en comparación a la unión de metil- α -D-manopiranosido, un ligando azucarado conocido. Este trabajo pionero llevó al desarrollo de péptidos miméticos de carbohidratos mediante el uso de bibliotecas de fagos.

En estudios subsecuentes se comenzaron a utilizar Ac anti-glicanos como blancos de *screening* de bibliotecas de fagos. Un ejemplo es el primer desarrollo de miméticos de LeY utilizando el Ac B3⁸⁹. Se probó que el péptido podía inducir una respuesta inmune contra el antígeno LeY en ratones y conejos⁹⁰. Se han desarrollado varios péptidos miméticos de glicanos usando esta estrategia con resultados prometedores, demostrando que los péptidos miméticos provenientes de bibliotecas de fagos pueden generar respuestas inmunes para antígenos azucarados^{65,69,70,74}.

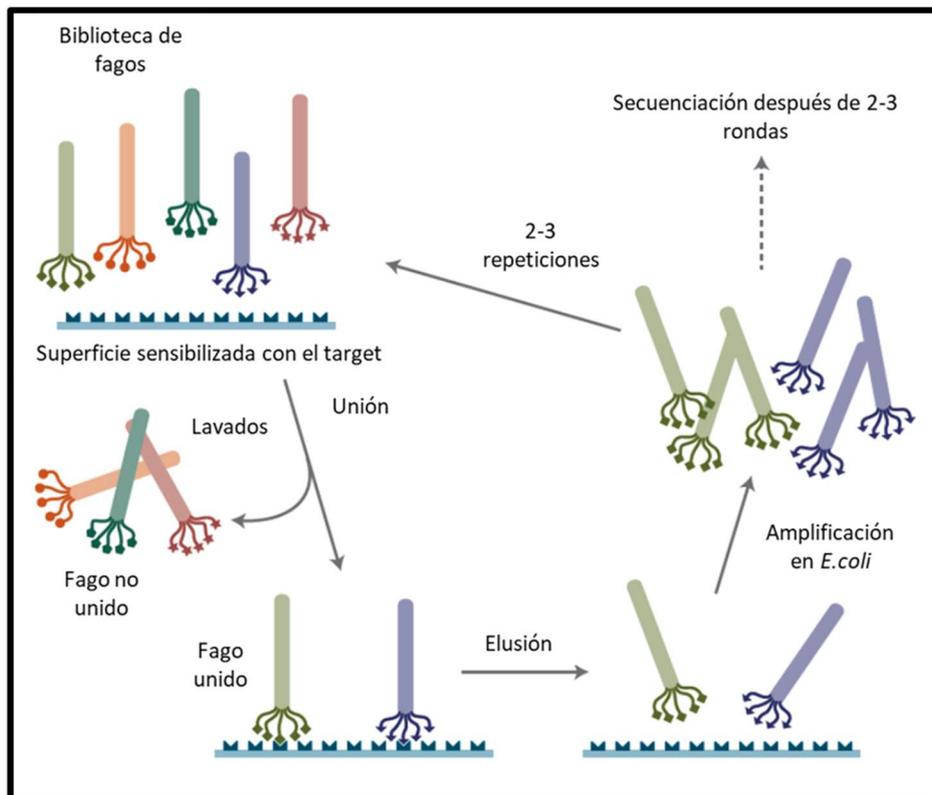


Figura 2 Procedimiento de selección de péptidos miméticos utilizando una biblioteca de fagos.

Lumazina sintetasa de *Brucella* spp. (BLS) como *carrier* en plataformas vacunales.

Como se ha descrito anteriormente, tanto las vacunas basadas en carbohidratos como las basadas en péptidos miméticos necesitan una estructura que permita exponer de manera repetida a los mismos y que aumente la inmunogenicidad. Estas estructuras suelen denominarse *carriers*. En el caso de los péptidos miméticos, estos suelen ser pequeños y de vida media corta, por lo cual la utilización de un *carrier* es indispensable al momento de desarrollar una formulación vacunal.

El grupo del Dr. Fernando Goldbaum ha modificado y optimizado la enzima lumazina sintetasa de la especie bacteriana *Brucella* (BLS) para ser utilizada como *carrier* en plataformas vacunales. BLS está involucrada en la vía de síntesis de la rivo flavina. Esta proteína se ensambla formando dímero muy estable de pentámeros, donde cada monómero, de un peso aproximado de 18 KDa, interactúa extensivamente con el monómero adyacente mediante uniones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y puentes

salinos. BLS demostró ser resistente a la desnaturalización con urea y tener una estabilidad a la desnaturalización térmica superior a otras proteínas bacterianas que forman complejos homopentaméricos y que son utilizadas como *carriers*, tales como EtxB y CtxB. Además es altamente inmunogénica⁹¹.

La estructura tridimensional cristalina de BLS muestra una naturaleza desordenada en su extremo N-terminal; sus primeros 10 residuos no muestran densidad electrónica, sugiriendo un alto grado de libertad conformacional⁹². Esta característica fue explotada por Laplagne *et al.* para diseñar un sistema para producir proteínas quiméricas de BLS, en donde su extremo N-terminal es intercambiado por péptidos foráneos. Las quimeras de BLS exponen 10 copias del péptido foráneo, el cual puede tener hasta 27 residuos, en puntos localizados en los vértices de dos pentágonos planos, como se muestra en la Figura 3. Los péptidos serían exhibidos en un arreglo regular, aumentando así la inmunogenicidad intrínseca de BLS. El agregado de los péptidos al extremo N-terminal no interrumpe el plegado normal de la proteína ni afecta su estabilidad general⁹³.

Las quimeras de BLS se han utilizado como plataforma de formulaciones vacunales por distintos grupos de investigación. Han demostrado generar protección sistémica contra la cisticercosis porcina causada por *Taenia solium*⁹⁴, el síndrome urémico hemolítico causado por toxinas Shiga⁹⁵, el virus de la influenza⁹⁶, el rotavirus bovino⁹⁷, todos ellos en modelos murinos; además de protección contra infecciones por *Brucella ovis* en carneros⁹⁸, infección por *Brucella canis* en perros⁹⁹ y en ratones¹⁰⁰. Por otro lado se ha estudiado su efectividad cuando es administrada oralmente: contra la cisticercosis porcina causada por *Taenia solium*¹⁰¹ y *Taenia crassiceps*¹⁰² en modelos murinos. En varios de estos estudios se comprobó, a su vez, la capacidad de las quimeras de BLS de generar una respuesta inmune fuerte tanto humoral como celular, aún en ausencia de adyuvantes^{103,104}.

En este contexto, BLS aparece como un *carrier* prometedor para el desarrollo de formulaciones vacunales basadas en péptidos miméticos de glicanos.

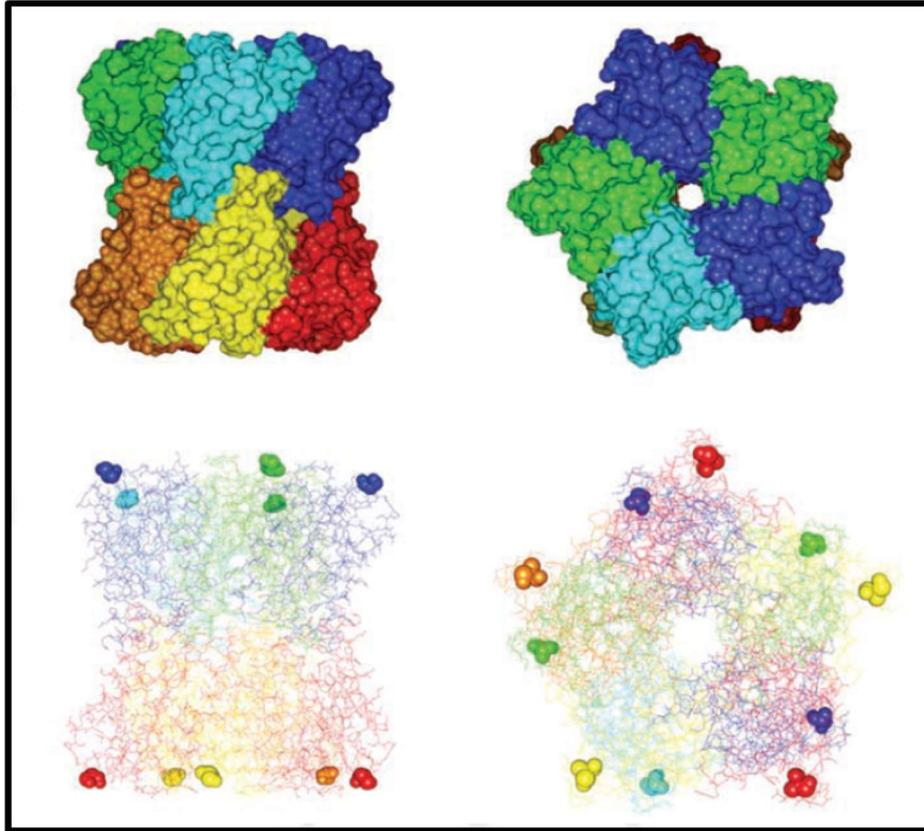


Figura 3 A: Estructura espacial de las quimeras de BLS. Los monómeros se muestran de distinto color. **B:** Representación *wireframe* de las quimeras de BLS, se detalla el péptido en el residuo N-terminal de cada monómero.

Objetivos

GENERAL

Desarrollar y validar a nivel preclínico, alternativas vacunales antitumorales basadas en péptidos miméticos de carbohidratos relevantes en cáncer fusionados al *carrier* bacteriano BLS.

ESPECÍFICOS

- Selección de candidatos peptídicos de una biblioteca de fagos de dodecapéptidos reactivos a Ac monoclonales anti-glicanos.
- Clonación y expresión de los candidatos seleccionados como quimeras de BLS.
- Evaluación de la capacidad inmunogénica y caracterización de la respuesta inmune en modelos animales.

Materiales y métodos generales

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron diferentes líneas celulares tumorales. La línea celular humana de neuroblastoma SK-N-AS (ATCC® CRL-2137™) fue mantenida en medio DMEM (Sigma) + 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA). La línea celular humana de adenocarcinoma colorrectal Colo 205 (ATCC® CCL-222™) y la línea celular murina de mieloma P3X63Ag8.653 (X63) (ATCC® CRL-1580™) fueron mantenidas en medio RPMI (Sigma). Las líneas se mantuvieron en estufa a 37°C; con atmósfera humidificada y 5% CO₂; en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado previamente por calor (Sigma); 2 mM glutamina y 80 mg/ml gentamicina, en frascos de plástico 25 cm² y 75 cm² (Greiner Labortechnik, Alemania). Dos veces a la semana aproximadamente, las líneas fueron subcultivadas. Las células SK-N-AS, las cuales forman monocapas adherentes, fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y luego levantadas con una solución de Tripsina-EDTA (Gibco). Se diluyeron las células con medio de cultivo sin SFB y se centrifugaron 10 min a 1000 rpm. Una vez resuspendido el *pellet* obtenido en medio fresco, se sembraron en un nuevo frasco en una dilución 1/5. La línea X63 crece en suspensión, por lo cual se realizó una dilución 1/5 del medio y se adicionó medio fresco. Colo 205 es una línea celular semi-adherente, por lo cual las células en suspensión se subcultivaron realizando diluciones del medio y las células adheridas se levantaron con la solución de Tripsina-EDTA.

Anticuerpos

Los anticuerpos y las concentraciones utilizadas de los mismos se detallan en la Tabla 1.

Anticuerpo	Clon	N° catálogo y marca	Concentración			
			<i>Panning</i>	ELISA	Citometría de flujo	Western Blot
GD2	14G2a	357302, Biolegend	5 µg/ml	1 µg/ml	1:400	1 µg/ml
SLeX	CSLEX 1	551344, BD Pharmingen	5 µg/ml	3 µg/ml	1:400	2,5 µg/ml
PSGL-1	PL1	NBP1-88104, Novus Biological	10 µg/ml	2 µg/ml	1:200	-
LeA	7LE	NB500-525, Novus Biological	10 µg/ml	2 µg/ml	-	-
STn	B72.3	Sc-20042, Santa Cruz Biotechnology	40 µg/ml	20 µg/ml	-	-
LeX	P12	AB74035, Abcam	40 µg/ml	20 µg/ml	-	-
Isotipo IgG1	-	X0931, DAKO	10 µg/ml	-	1:100	-
Isotipo IgM	-	X0942, DAKO	10 µg/ml	-	1:100	-
Isotipo IgG2a	-	DDXCM02, Denditrics	20 µg/ml	-	1:500	-
Anti-M13/HRP	-	27-9421-01, GE Healthcare	-	1:5000	-	-
Mouse Immunoglobulins /RPE	-	R0480, DAKO	-	-	1:100	-
Goat Anti-mouse IgM+IgG+IgA/HRP	-	AP501P, Millipore	-	1:4000	-	1:4000

Tabla 1 Ac utilizados en los experimentos y sus concentraciones.

Animales

Se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6, BALB/c y CF1 de aproximadamente 10 semanas de edad con un peso de entre 20 y 60 g. Los mismos fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata y de la Universidad Nacional de Buenos Aires. Los ratones fueron mantenidos en grupos de 5 individuos por caja en condiciones estándar, con libre acceso a la comida y el agua. Todos los protocolos realizados fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes.

Capítulo I

Identificación y caracterización de
péptidos miméticos de glicanos
mediante una biblioteca de fagos

Objetivos

Capítulo I

- Identificar y aislar candidatos a péptidos miméticos de los glicanos GD2, SLeX, PSGL-1, LeA, LeX y STn mediante el uso de una biblioteca de fagos y Ac monoclonales específicos.
- Evaluar la mimética antigénica de los candidatos mediante su capacidad de unión a los Ac monoclonales mediante ELISA y citometría de flujo de interferencia.
- Seleccionar los candidatos más prometedores para continuar con el desarrollo de una formulación vacunal.

Materiales y métodos

Capítulo I

1.1 Identificación de candidatos a péptidos miméticos de glicanos mediante una biblioteca de fagos

1.1.1 Biblioteca de fagos.

Se utilizó una biblioteca de fagos comercial (Ph.D.TM-12 *Phage Display Peptide Library*, New England BioLabs). Como blancos de selección se utilizaron Ac monoclonales anti GD2, SLeX, PSGL-1, LeA, LeX y STn.

Día 1: Sensibilización de la placa con el Ac. Se sensibilizó un *well* de una placa de 96 con 50 µl de una dilución de los distintos Ac de selección y otro con una dilución de un Ac inespecífico ambos en buffer 0.1M NaHCO₃, pH 8.6 (Tabla 1). Se incubó la placa durante toda la noche (ON) a 4°C con agitación en un recipiente húmedo.

Día 2: Depleción de fagos inespecíficos y 1er *panning*. Se bloquearon los *wells* por 1 h a 4°C con buffer de bloqueo (0.1M NaHCO₃, pH 8.6, 5 mg/ml BSA). Se realizaron 6 lavados con TBST 0.1%. Posteriormente se incubó el *well* sensibilizado con el Ac inespecífico, con una dilución de la biblioteca de fagos (el volumen correspondiente a 10¹¹ fagos) en TBST 0.1%. La placa se dejó agitando a 4°C durante 1 h. Se tomó el sobrenadante depletado de fagos inespecíficos y se utilizó para desafiar el *well* sensibilizado con el Ac de selección repitiendo la incubación. Posteriormente se realizaron 10 lavados con TBST 0.1%. Se obtuvieron los fagos incubando por 15 min a temperatura ambiente (TA) y agitación con un *buffer* de elusión (0.2M glicina -HCl pH 2.2) seguido de un paso de neutralización con *buffer* 1M Tris-HCl pH 9.1. El 1er eluato obtenido a partir de esta primera ronda de *panning* fue amplificado para utilizarse en una segunda ronda.

Día 3: Amplificación y precipitación del 1er eluato. Se utilizó el eluato para infectar *E.coli* de la cepa ER2738 creciendo en medio de cultivo LB en fase logarítmica temprana. Esta cepa es resistente al antibiótico tetraciclina (tet), el cual se agregó al medio de cultivo (20 µg/ml). Se crecieron las bacterias y los fagos por 5 hs a 37°C con agitación. Se centrifugaron los cultivos por 10 min a 4°C y 12000 g y se descartó el *pellet* bacteriano. Se agregó al sobrenadante 1/6 del volumen de una solución de 20% PEG-8000 (Sigma), 2.5M NaCl y se dejó precipitando los fagos ON a 4°C.

Día 4: Obtención de los fagos precipitados del 1er eluato y titulación de los mismos. Se centrifugaron los fagos durante 15 min a 4°C y 12000 g; se resuspendió el *pellet* en TBS. Se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-8} a 10^{-11} . Se mezclaron 10 μ l de cada dilución con 200 μ l de un cultivo de *E.coli* con densidad óptica 600nm (DO600): 0.5 en Top agar fundido y se sembraron sobre placas con LB sólido suplementado con IPTG y Xgal (Invitrogen). La cepa ER2738 contiene el sistema *lacZ*, por lo cual las placas de lisis generadas por los fagos se observan azules en presencia de IPTG y Xgal. Las placas se incubaron a 37°C ON.

Día 5: Titulación de los fagos y 2do *panning*. Se contaron las placas de lisis azules y se calculó el título de fagos como: unidades formadoras de placas de lisis por mililitro (UFP/ml). Se utilizaron 10^{11} UFP para desafiar al Ac de selección previamente sensibilizado en un *well* de placa de 96. Se continuó el protocolo descrito para el Día 2 pero realizando los lavados con TBST 0.5%, en condiciones más restrictivas. Se obtuvo el 2do eluato que será utilizado para la tercera ronda de *panning*.

Día 6: Amplificación y precipitación del 2do eluato. Se repitió el procedimiento explicado para el Día 3.

Día 7: Obtención de los fagos precipitados del 2do eluato y titulación de los mismos. Se repitió el procedimiento explicado para el Día 4.

Día 8: Titulación de los fagos y 3er *panning*. Se repitió el procedimiento explicado para el Día 5. Se obtuvo tercer eluato.

Día 9: Titulación del 3er eluato. Se repitió el procedimiento de titulación explicado para el Día 4, pero se hicieron diluciones seriadas del 3er eluato desde 10^{-1} hasta 10^{-4} ya que no se encuentra amplificado.

Día 10: Titulación del 3er eluato y amplificación de UFP individuales. Se contaron las placas de lisis azules y se calculó el título de fagos como: unidades formadoras de placas de lisis por mililitro (UFP/ml). Se picaron una cantidad representativa de UFP y se las pasó a tubos individuales con *E.coli* creciendo en LB en fase logarítmica temprana. Se crecieron a 37°C con agitación durante 5 hs. Posteriormente se centrifugaron para descartar el *pellet* bacteriano y se obtuvieron los fagos individuales amplificados.

1.1.2 Comprobación de la mimética antigénica mediante ELISA de los fagos obtenidos.

Se sensibilizaron placas de 96 *wells* con los Ac de selección ON a 4°C utilizando las concentraciones indicadas en la Tabla 1. Luego de un paso de bloqueo con leche descremada al 5% en TBS, se incubaron con una dilución de los fagos individuales obtenidos luego del 3er *panning* en TBS por 2 hs a TA. Los fagos unidos al Ac luego de los lavados con TBST 0.1% fueron revelados con un Ac secundario conjugado a peroxidasa que reconoce al fago M13 (GE Healthcare). Se incubó la placa con el sustrato de la peroxidasa (OPD, ThermoFisher Scientific) por 15 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 492nm.

1.2 Caracterización y evaluación de los candidatos seleccionados

1.2.1 Secuenciación de los péptidos candidatos.

Se extrajo el ADN de los fagos individuales. Brevemente: los fagos se precipitaron con PEG/NaCl, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 4°C y se resuspendió el *pellet* en buffer yoduro (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 4M NaI). Se incubaron por 15 min a TA con el agregado de etanol. Se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min a 4°C y se realizó un lavado con etanol frío al 70%. Se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en buffer TE. El ADN fue cuantificado por Nanodrop. Se secuenció la región que contiene a los dodecapéptidos utilizando como *primer reverse*: 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'. Esto lo llevó a cabo la empresa Macrogen Inc (Corea).

1.2.2 Análisis de homologías de secuencia e hidrofobicidad de los péptidos candidatos.

Se realizó un alineamiento de las secuencias genéticas de los dodecapéptidos utilizando el software libre Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) para comprobar la existencia de una secuencia consenso repetida. Además se utilizó la base de datos SAROTUP (immunet.cn/sarotup/) para analizar la homología entre la secuencia de los péptidos con secuencias conocidas inespecíficas presentes en bibliotecas de

fagos, de manera de poder descartarlos. Se analizó el índice de hidrofobicidad de los péptidos utilizando la herramienta bioinformática GPMAW lite proporcionada por el portal online de Alphalyse.

1.2.3 Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los péptidos candidatos seleccionados.

Se realizó el ensayo de ELISA descrito en el punto 1.1.2, esta vez utilizando diluciones seriadas de concentraciones conocidas de los fagos seleccionados, previamente titulados.

1.2.4 Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los péptidos candidatos seleccionados.

Se realizaron ensayos de interferencia de unión de los Ac de selección a células con expresión positiva del blanco. Se utilizó la línea SK-N-AS positiva para GD2, la línea Colo 205, positiva para SLeX y la línea X63, positiva para PSGL-1. Para ello, cada Ac de selección se preincubó con un exceso de fagos candidatos, evaluando distintas relaciones fago:Ac por 1 h a TA. Posteriormente, 10^6 células fueron sembradas en cada tubo, centrifugadas y resuspendidas en 50 μ l de la solución Ac:fago o Ac solo. Las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C, lavadas con PBS e incubadas con una dilución del Ac secundario conjugado al fluorocromo RPE (DAKO) por 30 min a 4°C. Se registraron 5×10^5 eventos en un citómetro de flujo FACsCalibur y se analizaron los resultados en el programa FlowJo. Se utilizaron controles de isotipo en cada experimento. Las concentraciones de los Ac utilizados se encuentran detalladas en la Tabla 1.

Resultados Capítulo I

Selección de candidatos a péptidos miméticos del gangliósido GD2.

Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.

Se seleccionaron 26 fagos reactivos al Ac anti-GD2, los cuales se denominaron secuencialmente Gd1 - Gd26. Los mismos fueron secuenciados para analizar la identidad de los péptidos, realizándose posteriormente un ensayo de ELISA para valorar su reactividad al Ac de selección. De los 26 fagos secuenciados, se descartaron el fago Gd5, el Gd20 y el Gd18 ya que los primeros no presentaron una secuencia peptídica y el tercero presentó una secuencia incompleta. En la Figura 1.1A se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los péptidos presentes en los fagos analizados.

Los fagos Gd2 y Gd13 resultaron tener la misma secuencia, además mostraron ser capaces de unirse al Ac anti-GD2 en un ELISA (Figura 1.1B) La misma situación se observa con los fagos Gd3 y Gd10. Por otro lado los fagos Gd6, 12, 17 y 21 muestran la misma secuencia, sin embargo fueron negativos para el ELISA, por lo que fueron descartados. Los fagos Gd4, 8, 9, 14 y 22 resultaron negativos para el ELISA, por lo que también fueron descartados.

Las secuencias de los péptidos fueron alineadas con secuencias inespecíficas conocidas derivadas de bibliotecas de fagos (TUPs: *target unrelated sequences*), presentes en la base de datos SAROTUP. Los fagos Gd7 y Gd15 mostraron motivos de unión a plástico; mientras que el fago Gd19 mostró motivos de unión a la región constante de los Ac; estos tres candidatos fueron descartados.

Por último, se realizó un análisis bioinformático de la hidrofobicidad de las 9 secuencias peptídicas candidatas restantes. En la Figura 1.1C se muestran los índices de hidrofobicidad calculados, donde cinco candidatos mostraron ser hidrofílicos (expresado en valores positivos); una característica buscada para el diseño de la terapia a desarrollarse. Para este cálculo se tuvo en cuenta la secuencia de 12 aminoácidos de los péptidos más tres glicinas que se encuentran como espaciador en la zona de unión al fago.

Teniendo en cuenta toda esta información se seleccionaron 4 candidatos para continuar con los ensayos. El candidato Gd2/13, que mostro una secuencia repetida y es hidrofílico, el cual se denominará de ahora en adelante GdA; el candidato Gd3/10 que mostro secuencia repetida pero es hidrofóbico, al que llamaremos GdB; y los fagos Gd1 y Gd26, ambos hidrofílicos, se denominarán GdC y GdE respectivamente.

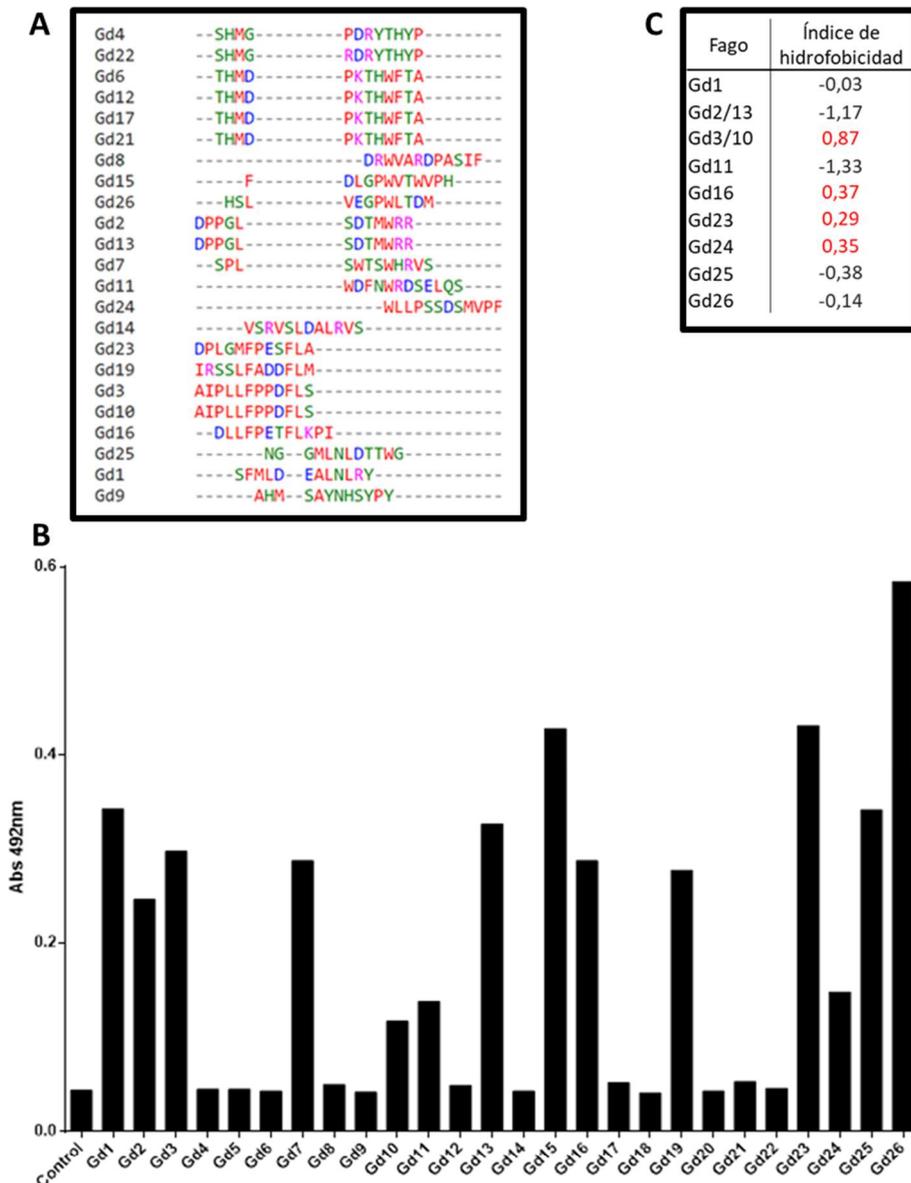


Figura 1.1 A: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los candidatos a miméticos de GD2. Se utilizó el *software* Clustal Omega. **B:** ELISA de los fagos candidatos de GD2 en una dilución 1/100 contra *wells* sensibilizados con el Ac de selección. El control negativo consiste en el valor de absorbancia promedio calculado para cada fago individual incubado sin Ac. Se reveló con un Ac secundario conjugado a peroxidasa que reconoce al fago M13. **C:** Índice de hidrofobicidad de los candidatos a péptidos miméticos de GD2 calculado utilizando la herramienta bioinformática GPMaw *lite* proporcionada por el portal online de Alphylyse.

Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.

Se evaluó la capacidad de unión de candidatos seleccionados al Ac de selección, mediante un ensayo de ELISA. Las placas fueron sensibilizadas con el Ac y se incubó con diluciones seriadas de concentraciones conocidas de cada fago candidato previamente titulado (UFP).

Los cuatro candidatos de GD2 pudieron unirse al Ac de selección de una manera dependiente de la concentración de fago (Figura 1.2); siendo GdC y GdE los candidatos con mayor señal para una misma concentración de fago.

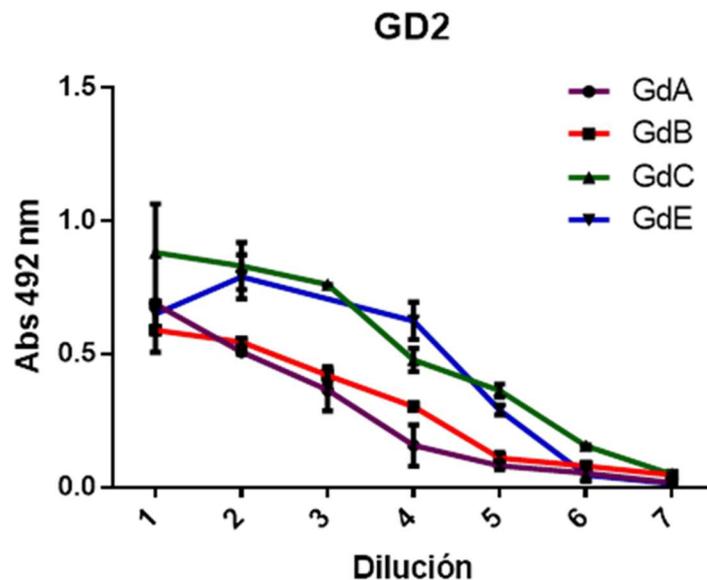


Figura 1.2 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de GD2 al Ac de selección mediante ELISA. Se evaluaron diluciones seriadas de UFP. Se muestra la absorbancia de cada punto habiendo restado la absorbancia del control negativo de cada concentración de fago. Se grafica la media más el desvío estándar.

Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los candidatos seleccionados.

Se evaluó de forma indirecta la capacidad de los candidatos de unirse al Ac de selección mediante un ensayo de citometría de flujo de interferencia.

En la Figura 1.3 se observan los *density plots* representativos de los ensayos realizados para los candidatos de GD2, donde se muestra el porcentaje de células marcadas para este antígeno en cada caso. Puede observarse que con la concentración mayor de fago,

los cuatro candidatos pudieron disminuir la capacidad de unión del Ac a células con expresión de GD2, siendo GdC el que logró reducir la misma un 60% aproximadamente.

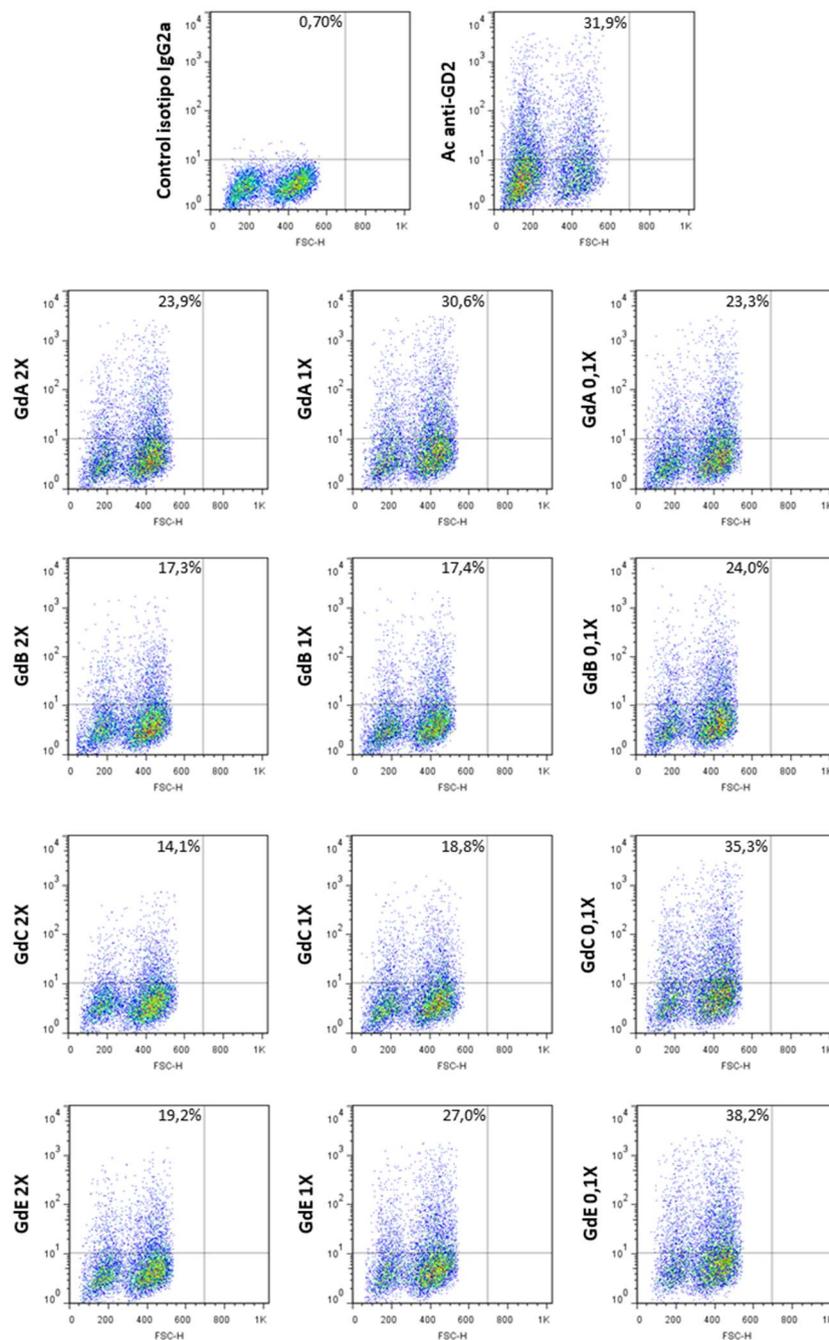


Figura 1.3 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de GD2 al Ac de selección mediante citometría de flujo de interferencia. Se grafica el porcentaje de células positivas para GD2 en la línea celular SK-N-AS, luego de la pre-incubación con distintas concentraciones de fagos (2X, 1X y 0.1X). Se lo compara contra la incubación con el Ac anti-GD2 sólo. Los *density plots* fueron graficados con el software FlowJo y son representativos de al menos tres experimentos.

Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato SLeX.

Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.

Se seleccionaron 26 fagos (denominados Sx1 - Sx26), de los cuales Sx6 y Sx9 arrojaron secuencias que no pudieron ser analizadas. Se alinearon las secuencias aminoacídicas de los 24 candidatos restantes (Figura 1.4A), encontrándose tres composiciones aminoacídicas, dos de las cuales se repetían 10 y 13 veces. Se denominó SxA a la secuencia FDGTAIWWLRPS, SxB a la secuencia GSWISALEWEDD y SxC a la secuencia SHTTGAGWYLPL. Se alinearon los candidatos peptídicos con los TUPs de la base de datos SAROTUP, en donde se observó que ninguno mostró una posible unión inespecífica. En la Figura 1.4B se muestran los resultados de la evaluación de la capacidad de unión de los candidatos al Ac anti-SLeX mediante ELISA, donde se observa que todos ellos mostraron un resultado positivo. Por último se calculó el índice de hidrofobicidad de los péptidos (Figura 1.4C); los tres candidatos mostraron tener una tendencia hidrofílica. Se eligió continuar sólo con los candidatos SxA y SxB ya que fueron las secuencias más repetidas.

Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.

Los dos candidatos de SLeX pudieron unirse al Ac de selección de una manera dependiente de la concentración de fago (Figura 1.5); siendo SxA el candidato con mayor señal para una misma concentración de fago.

Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los candidatos seleccionados.

En la Figura 1.6 se muestran los *density plots* representativos de los ensayos realizados para los candidatos de SLeX, donde se detalla el porcentaje de células marcadas para este antígeno en cada caso. Como se observa en la figura, ninguno de ellos logró capturar el Ac y disminuir su capacidad de unión a la línea celular positiva para el antígeno.

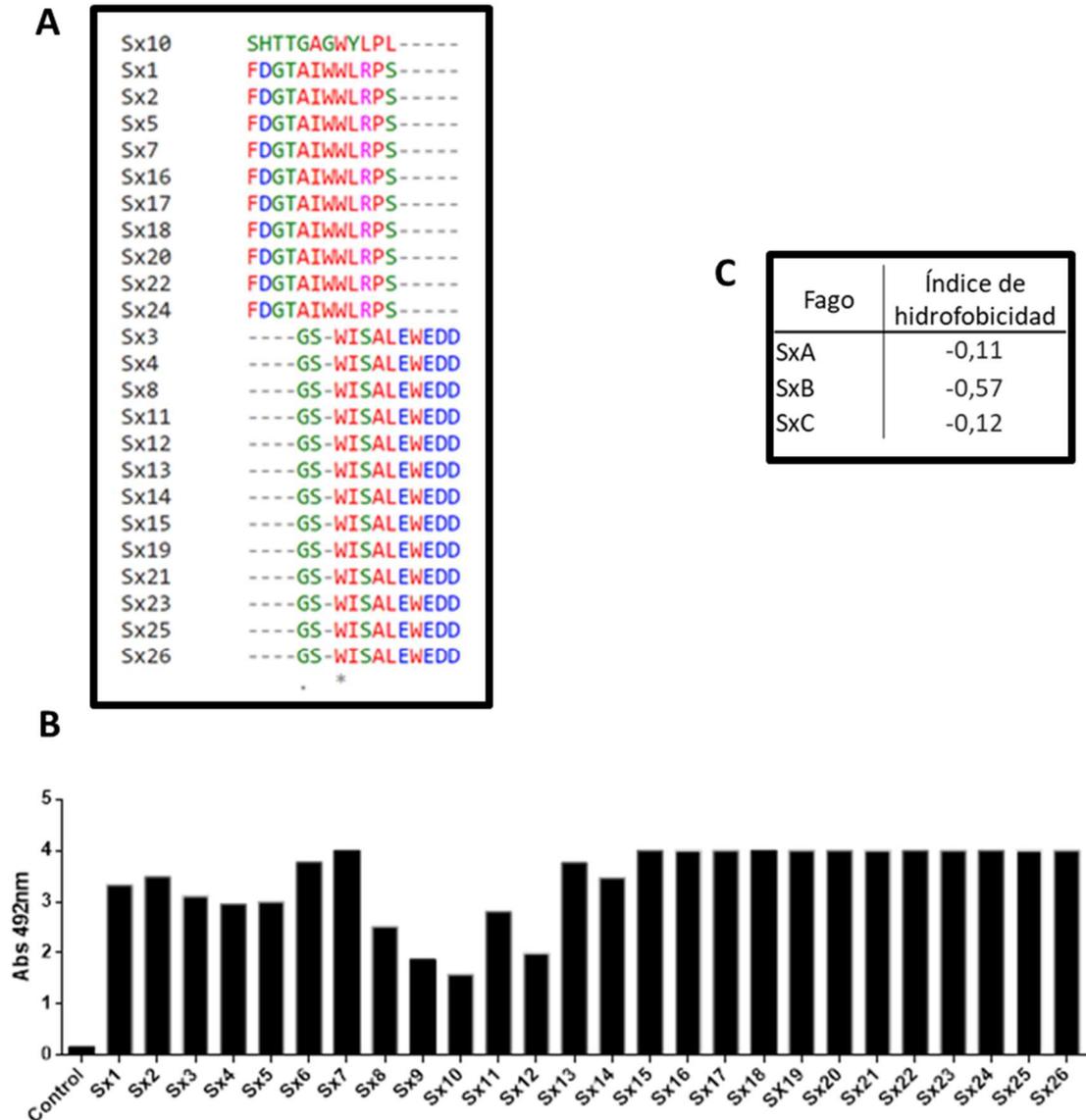


Figura 1.4 A: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los candidatos a miméticos de SLeX. Se utilizó el *software* Clustal Omega. **B:** ELISA de los fagos candidatos de SLeX en una dilución 1/1000 contra *wells* sensibilizados con el Ac de selección. El control negativo consiste en el valor de absorbancia promedio calculado para cada fago individual incubado sin Ac. Se reveló con un Ac secundario conjugado a peroxidasa que reconoce al fago M13. Cuando la señal colorimétrica superó el rango de absorbancia en que puede leer el equipo se asignó un valor de 4, que es el valor máximo de lectura del mismo. **C:** Índice de hidrofobicidad de los candidatos a péptidos miméticos de SLeX calculado utilizando la herramienta bioinformática GPMaw *lite* proporcionada por el portal online de Alphalyse.

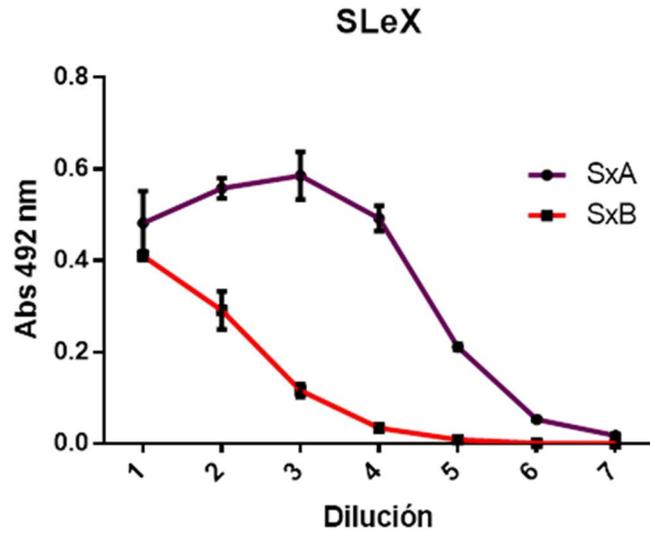


Figura 1.5 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de SLeX al Ac de selección mediante ELISA. Se evaluaron diluciones seriadas de UFP. Se muestra la absorbancia de cada punto habiendo restado la absorbancia del control negativo de cada concentración de fago. Se grafica la media más el desvío estándar.

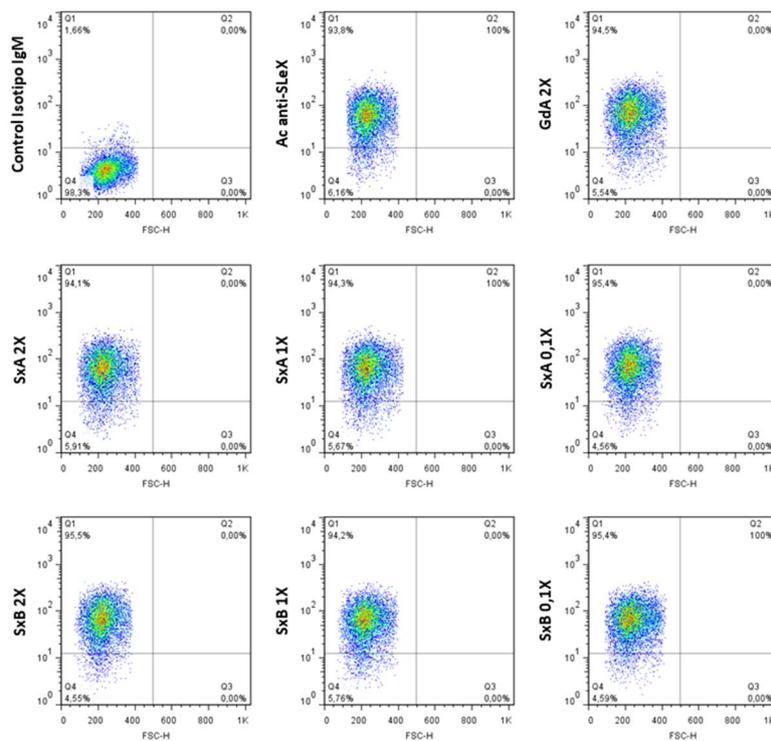


Figura 1.6 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de SLeX al Ac de selección mediante citometría de flujo de interferencia. Se grafica el porcentaje de células positivas para SLeX en la línea celular Colo 205, luego de la pre-incubación con distintas concentraciones de fagos (2X, 1X y 0.1X). Se lo compara contra la incubación con el Ac anti-SLeX sólo. Se agregó un control negativo con un fago inespecífico (GdA). Los *density plots* fueron graficados con el software FlowJo.

Selección de candidatos a péptidos miméticos de la glicoproteína PSGL-1.

Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.

En este experimento, de los 26 fagos seleccionados (denominados PL1 - PL26), PL8 y PL9 arrojaron secuencias que no pudieron ser analizadas. En la Figura 1.7A se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los 24 candidatos restantes. La secuencia SQAASNMFPGPVR se encontró repetida 8 veces, sin embargo resultó negativa para el ELISA contra el Ac de selección (Figura 1.7B) por lo cual fue descartada. Los fagos PL4 y PL10 resultaron tener la misma secuencia y fueron positivos para el ELISA. Lo mismo sucedió para el par PL19 - PL25; el par PL3 - PL18 y el par PL17 - PL24. Estos dos últimos pares sólo tienen un aminoácido de diferencia en sus secuencias.

Se alinearon los candidatos peptídicos con los TUPs de la base de datos SAROTUP, donde ninguno mostró patrones de unión inespecífica. Por último se calculó el índice de hidrofobicidad de los péptidos que resultaron positivos para el ELISA (Figura 1.7C); todos los candidatos mostraron tener una tendencia hidrofílica. Se eligió continuar con 4 candidatos: PL3/18 (a partir de ahora denominado PLa); PL4/10 (PLb); PL17/24 (PLc) y PL19/25 (PLd).

Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.

Los cuatro candidatos de PSGL-1 pudieron unirse al Ac de selección de una manera dependiente de la concentración de fago (Figura 1.8); donde PLa y PLd son los clones con mayor señal.

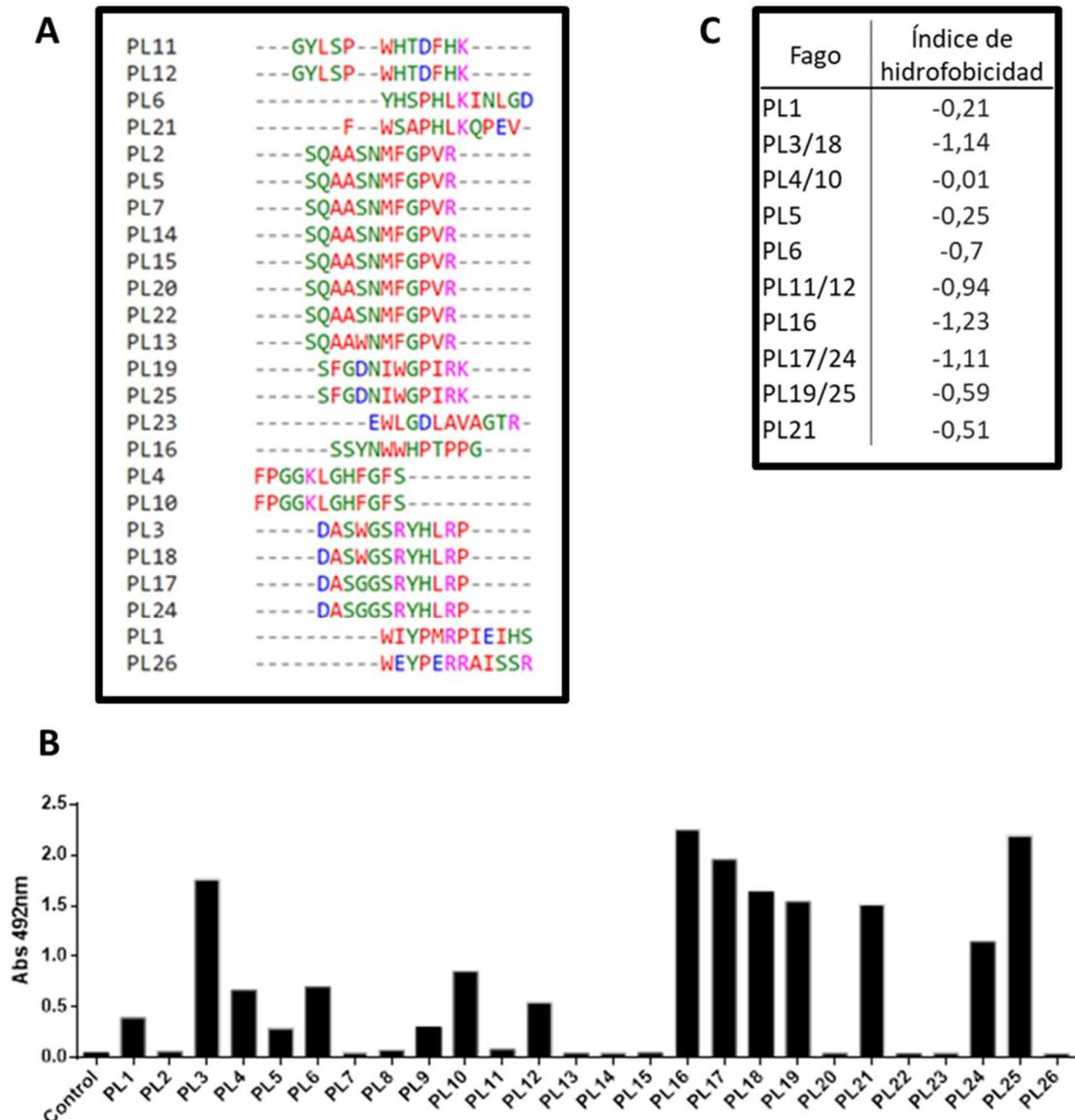


Figura 1.7 A: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los candidatos a miméticos de PSGL-1. Se utilizó el *software* Clustal Omega. **B:** ELISA de los fagos candidatos de PSGL-1 en una dilución 1/1000 contra *wells* sensibilizados con el Ac de selección. El control negativo consiste en el valor de absorbancia promedio calculado para cada fago individual incubado sin Ac. Se reveló con un Ac secundario conjugado a peroxidasa que reconoce al fago M13. **C:** Índice de hidrofobicidad de los candidatos a péptidos miméticos de PSGL-1 calculado utilizando la herramienta bioinformática GPMaw *lite* proporcionada por el portal online de Alphalyse.

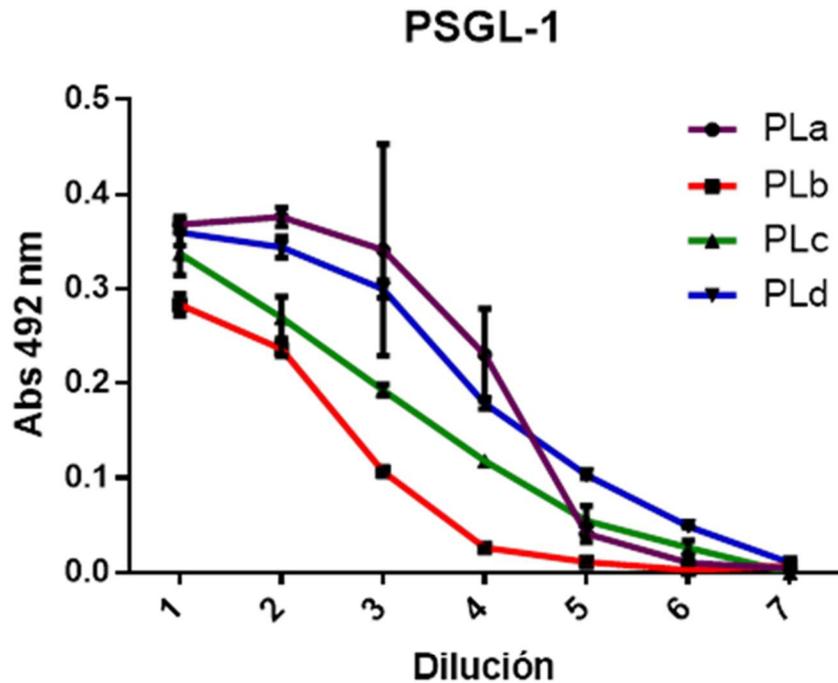


Figura 1.8 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de PSGL-1 al Ac de selección mediante ELISA. Se evaluaron diluciones seriadas de UFP. Se muestra la absorbancia de cada punto habiendo restado la absorbancia del control negativo de cada concentración de fago. Se grafica la media más el desvío estándar.

Evaluación de la mimética antigénica mediante citometría de flujo de interferencia de los candidatos seleccionados.

Como se observa en la Figura 1.9, ninguno de los candidatos de PSGL-1 logró capturar el Ac y disminuir su capacidad de unión a células con expresión de este antígeno.

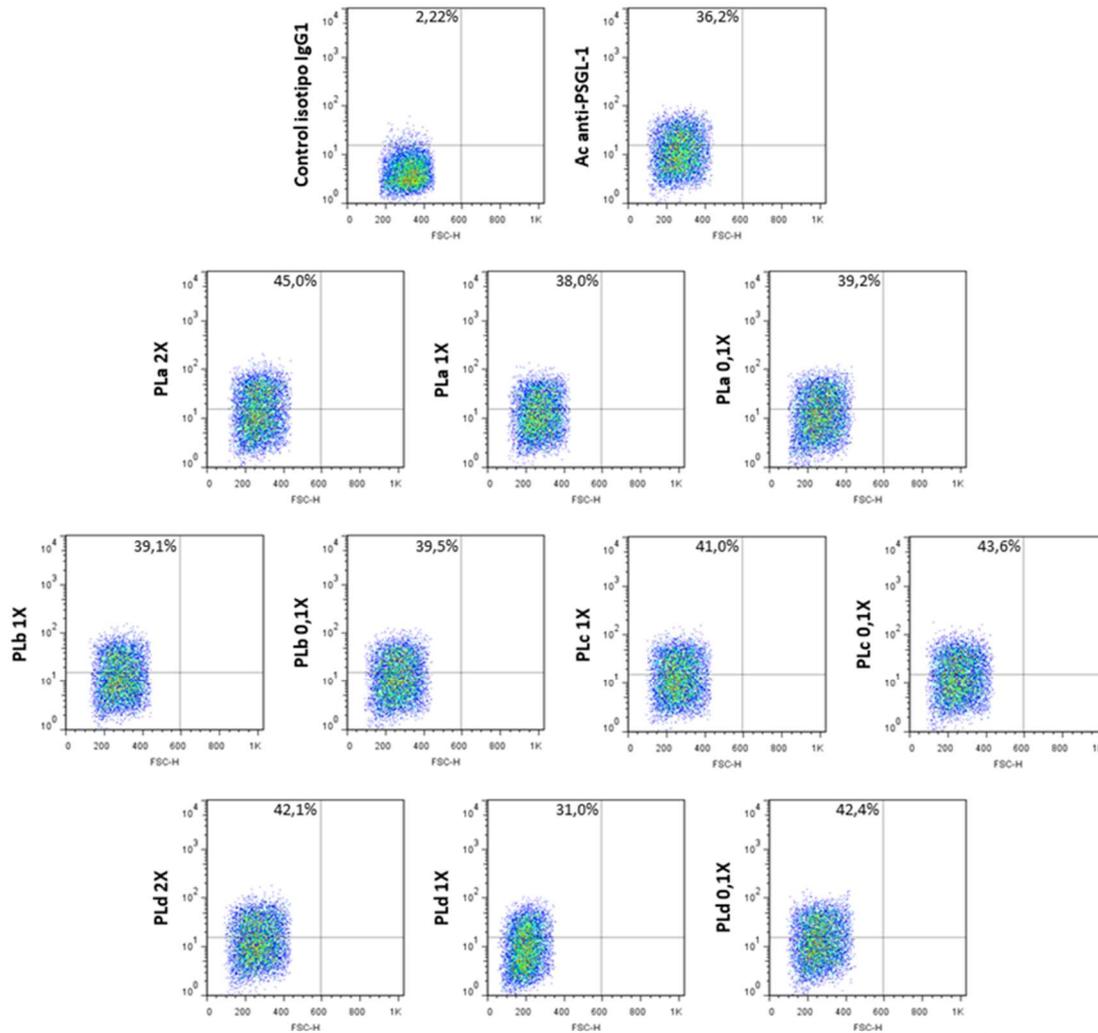


Figura 1.9 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de PSGL-1 al Ac de selección mediante citometría de flujo de interferencia. Se grafica el porcentaje de células positivas para PSGL-1 en la línea celular X63, luego de la pre-incubación con distintas concentraciones de fagos (2X, 1X y 0.1X). Se lo compara contra la incubación con el Ac anti-PSGL-1 sólo. Los *density plots* fueron graficados con el software FlowJo.

Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato LeA.

Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.

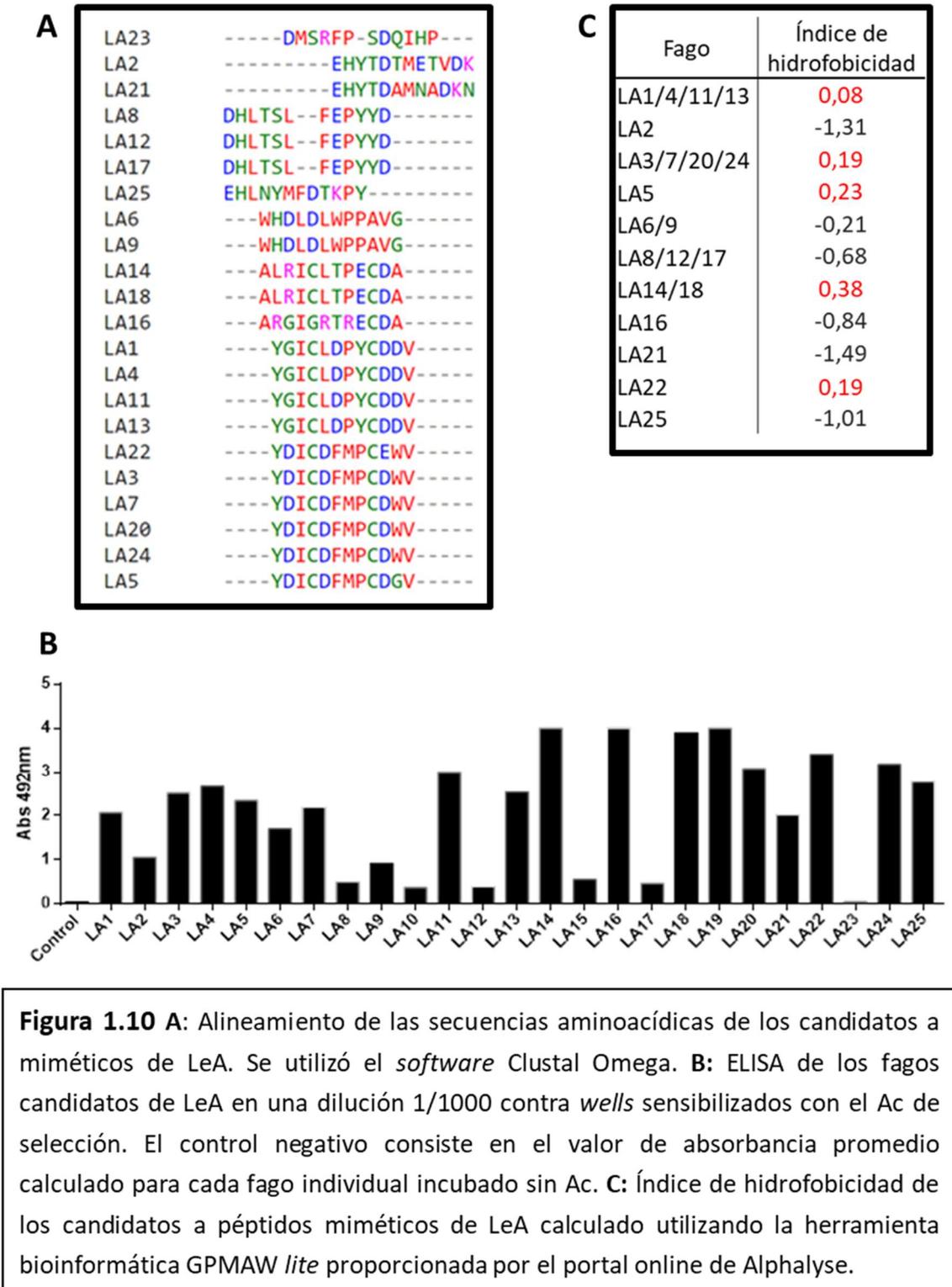
Para este experimento se seleccionaron 25 fagos (denominados LA1 - LA25), de los cuales LA10, LA15 y LA19 arrojaron secuencias que no pudieron ser analizadas. En la

Figura 1.10A se muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los 22 candidatos restantes, donde pueden observarse varias secuencias repetidas. Los fagos LA1, 4, 11 y 13 mostraron tener una secuencia idéntica, la misma tiene varios aminoácidos en común con la secuencia que se repite en los fagos LA3, 7, 20, 22 y 24; a su vez esta última secuencia tiene un solo aminoácido distinto a LA5. Del mismo modo, el par LA14 - LA24 mostró la misma secuencia que a su vez tiene motivos similares al fago LA16. Los fagos LA 6 y 9 también expresaban el mismo péptido. Todos ellos resultaron positivos para el ELISA contra el Ac de selección (Figura 1.10B). Los clones LA8, 12 y 17 mostraron una misma secuencia pero fueron negativos para el ELISA.

Se alinearon los candidatos peptídicos con los TUPs de la base de datos SAROTUP, donde ninguno mostró patrones de unión inespecífica. Por último se calculó el índice de hidrofobicidad de los péptidos que resultaron positivos para el ELISA (Figura 1.10C); la mayoría de las secuencias repetidas son hidrofóbicas. Teniendo en cuenta este contexto se decidió continuar con todas las secuencias repetidas o con motivos en común, más allá de su hidrofobicidad. LA1/4/11/13 se denominó LAa; LA3/7/20/24: LAb; LA5: LAc; LA6/9: LAd; LA8/12/17: LAe; LA14/18: LAf y LA16: LAg.

Evaluación de la mimética antigénica mediante ELISA de los candidatos seleccionados.

Con respecto a los candidatos de LeA: los candidatos LAc, d, e y g tuvieron muy baja señal. Los candidatos LAa, b y f mostraron una capacidad de unión al Ac de selección que fue dependiente de la concentración de fago. El candidato LAf fue el que mostró mayor señal (Figura 1.11)



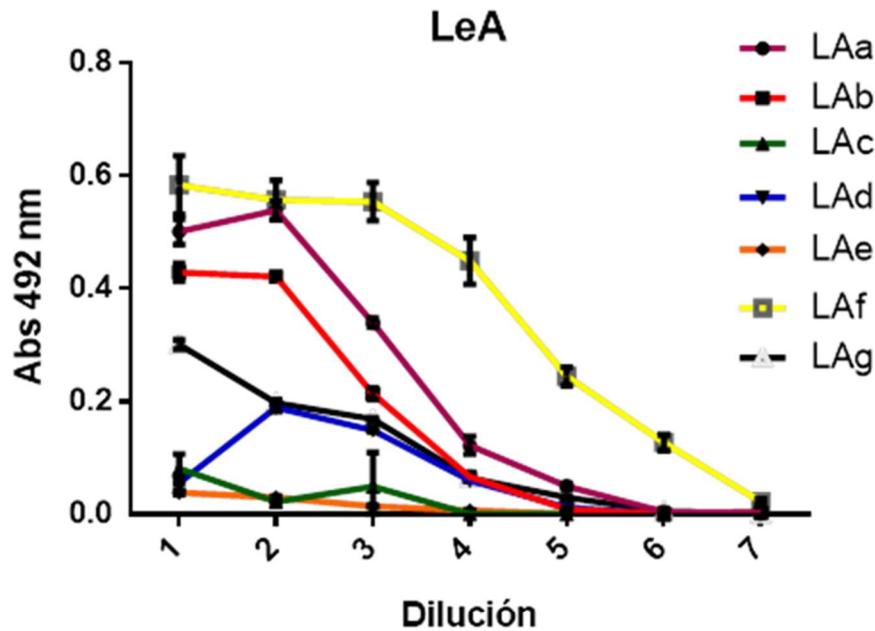


Figura 1.11 Evaluación de la capacidad de unión de los candidatos seleccionados de LeA al Ac de selección mediante ELISA. Se evaluaron diluciones seriadas de UFP. Se muestra la absorbancia de cada punto habiendo restado la absorbancia del control negativo de cada concentración de fago. Se grafica la media más el desvío estándar.

Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato LeX.

Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.

Para el carbohidrato LeX se seleccionaron 30 fagos (Lx1 - Lx30). La secuencia del fago Lx4 no pudo ser analizada. En la Figura 1.12 se muestra el alineamiento para LeX. Los fagos que mostraron secuencias repetidas fueron Lx11 y Lx28; Lx18 y Lx29; Lx7, 9, 12, 21, 27 y 30; Lx2, 3, 5, 14, 15 y 25; Lx1, 10 y 13.

Cuando se escanearon las secuencias en la base de datos SAROTUP se encontró que Lx18/29 tenía un motivo muy común de unión al plástico. Cuando se evaluó la capacidad de unión a los respectivos Ac de selección mediante ELISA, todos los candidatos de LeX fueron negativos.

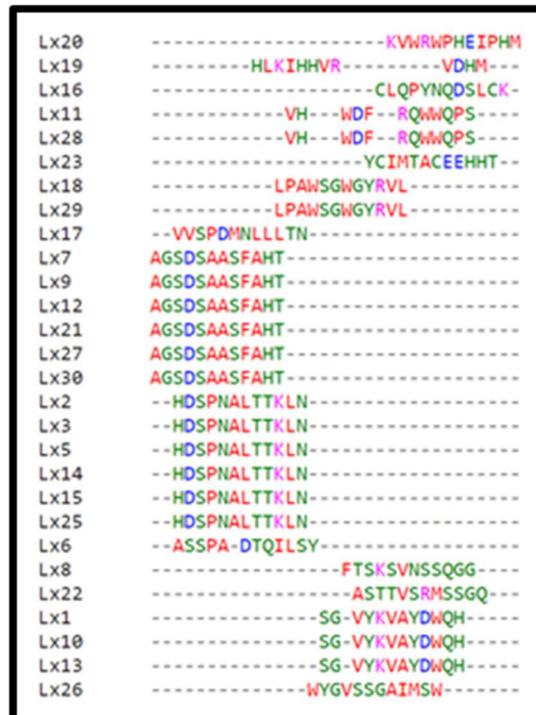


Figura 1.12 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los candidatos a miméticos de LeX. Se utilizó el *software* Clustal Omega.

Selección de candidatos a péptidos miméticos del carbohidrato STn.

Identificación de candidatos mediante una biblioteca de fagos.

Para el carbohidrato STn se seleccionaron 28 fagos (ST1 - ST28). Las secuencias de los fagos ST12 y ST8 no pudieron ser analizadas.

En la Figura 1.13 se muestra el alineamiento para STn, donde se observa que los péptidos ST3, 4, 5, 9, 11, 13, 14 y 21 tuvieron la misma secuencia: AGSDSAASFAHT, la cual ya había aparecido repetida entre los candidatos de LeX. Por otro lado los péptidos ST1 y 24 resultaron tener la secuencia SGVYKVAYDWQH, idéntica a los péptidos Lx1, 10 y 13. Esto podría estar indicando la presencia de un péptido inespecífico.

Cuando se evaluó la capacidad de unión a los respectivos Ac de selección mediante ELISA, todos los candidatos de STn fueron negativos.

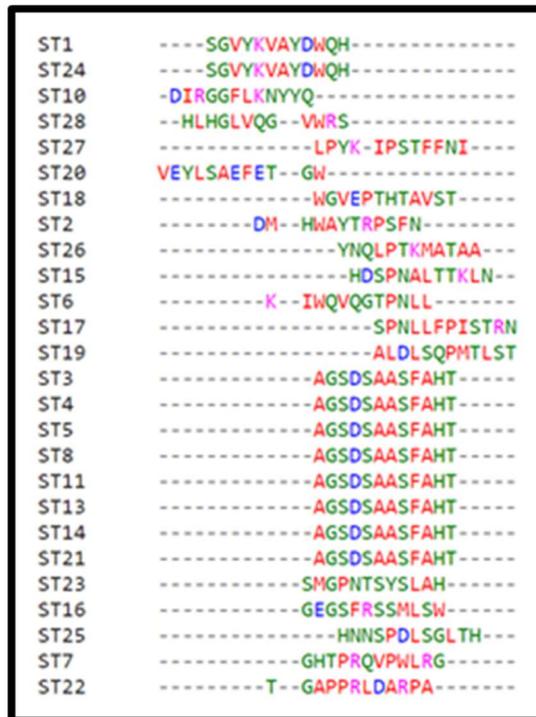


Figura 1.13 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los candidatos a miméticos de STn. Se utilizó el *software* Clustal Omega.

Discusión

Capítulo

I

En esta tesis nos propusimos usar la tecnología de bibliotecas de fagos con el objetivo de seleccionar péptidos cortos que mimeticen la conformación de un glicano propio de la biología tumoral, utilizando como elemento de selección Ac anti-glicanos. En este trabajo se utilizó una biblioteca de fagos comercial con variaciones al azar de péptidos de 12 aminoácidos, la misma contiene 10^9 clones independientes.

La búsqueda de péptidos miméticos para el gangliósido GD2 se realizó mediante el *screening* de la biblioteca de fagos contra un Ac monoclonal anti-GD2 (clon 14G2a). El alineamiento de las secuencias obtenidas luego de tres *pannings* arrojó resultados interesantes. Cada *panning* debe enriquecer los péptidos que se unen con mayor afinidad al Ac de selección, obteniendo al final una menor cantidad de péptidos con mayor especificidad; por lo que esperaríamos observar pocas secuencias pero repetidas. Al analizar los resultados del alineamiento de la Figura 1.1A se observa que la secuencia más repetida fue THMDPKTHWFTA, sin embargo este péptido no fue reconocido por el Ac de selección en un ELISA. Otros 5 péptidos cuyas secuencias sólo se encontraban representadas una vez también resultaron negativos para el ELISA.

La selección de péptidos no relacionados con el blanco (*target unrelated peptides*: TUPs) es muy común cuando se utiliza una biblioteca de fagos^{105,106}. Cuando no hay péptidos capaces de unirse con gran afinidad al blanco, los fagos que exponen TUPs se van enriqueciendo y dominan el *screening*. Esto se puede deber a varios motivos, en especial a los componentes utilizados en el sistema de selección, tales como la placa, los Ac o las proteínas presentes en los *buffers*.

Un grupo de TUPs muy comunes son las secuencias de unión al plástico, principalmente poliestireno, con el cual están hechas las placas de 96 utilizadas para los *pannings*^{105,106}. Se ha demostrado que bloquear las placas con soluciones ricas en proteínas no necesariamente previene la unión de los fagos al plástico.

Se han ido identificando motivos de secuencias que suelen unirse a este material y que aparece frecuentemente en experimentos con bibliotecas de fagos, tales como WxxW (en donde x representa cualquier aminoácido), FHENWPS y FHWTWYW. En general se suelen asociar secuencias altamente hidrofóbicas y ricas en aminoácidos aromáticos con TUPs de unión a plástico, sin embargo estas características no necesariamente implican que el péptido sea inespecífico. De hecho se ha estudiado que los péptidos miméticos de carbohidratos suelen contener residuos aromáticos e

hidrofóbicos, algo que cobra sentido cuando se observa que los Ac reconocen a los carbohidratos por sus caras hidrofóbicas⁶⁶.

Los TUPs más frecuentes se encuentran cargados en una base datos llamada SAROTUP. Cuando alineamos las secuencias de los fagos obtenidos para GD2 encontramos que Gd7 y Gd15 contenían el motivo WxxW, por lo cual fueron descartados como posibles TUPs de unión a plástico.

Otro grupo de TUPs que aparece cuando se utiliza como blanco un Ac, son las secuencias de unión a la región constante del Ac de selección^{105,106}. Las inmunoglobulinas son proteínas de gran tamaño (150 kDa aproximadamente), pero el sitio de unión a antígeno está limitado sólo a una proporción pequeña de la región variable. Es lógico que fagos con péptido capaces de unirse a otra porción de la región variable o a la región constante puedan aparecer en los *pannings*.

Para evitar esto, llevamos a cabo un paso inicial de selección negativa, donde desafiamos la biblioteca contra un Ac inespecífico del mismo isotipo que el Ac de selección. Los fagos no adheridos fueron directamente utilizados para el primer *panning*. Aun habiendo incorporado este paso, al alinear las secuencias de los fagos de GD2 con las secuencias de SAROTUP encontramos que el candidato Gd19 contiene el motivo SSL, el cual se ha identificado reiteradas veces como relacionado a la región constante de las inmunoglobulinas^{105,106}.

Las proteínas utilizadas para el paso de bloqueo también pueden actuar como generadores de TUPs. En nuestro caso se utilizó la BSA. Una secuencia que se ha identificado como de unión a BSA es DICLPRWGCLW. Nuestros candidatos no mostraron motivos conocidos de unión a esta proteína.

Algunos ensayos de *panning* requieren un agente para capturar el blanco, que puede ser streptavidina, proteína A, o Ac secundarios; estas moléculas pueden unirse a TUPs^{105,106}. En nuestro ensayo los Ac utilizados como blanco fueron sensibilizados directamente sobre la placa para evitar introducir más generadores de TUPs.

Cabe destacar que aunque se han ido reportando varias secuencias o motivos conocidos de unión a plástico, inmunoglobulinas, BSA, entre otros, siguen surgiendo nuevos TUPs. El hecho de que algunos péptidos seleccionados para GD2 hayan sido incapaces de unirse al Ac de selección en el ELISA pero no hayan tenido motivos

conocidos de TUPs, no quiere decir que no puedan contener nuevos motivos de unión inespecífica. Tal podría ser el caso de los candidatos Gd4, 8, 9, 14 y 22.

Existe un tipo de TUP que no se genera por los componentes utilizados en el sistema de *screening*, sino que tienen que ver con las cualidades diferenciales de propagación de ciertos fagos. Estos clones emergen por una ventaja en la propagación que les permite superar a los otros clones de la biblioteca y permanecer siempre en el grupo de fagos seleccionados; la captura de estos clones es independiente de su afinidad por el blanco¹⁰⁶.

Esta propagación exacerbada puede ser el resultado de una infectividad aumentada o de una mayor producción de partículas víricas que a su vez puede darse por una cualidad intrínseca del péptido que expone o por una mutación en el genoma del fago. Un ejemplo interesante es el péptido HAIYPRH, capturado de una biblioteca comercial de heptapéptidos. Este péptido fue seleccionado por varios grupos de trabajo, en experimentos con blancos distintos. Leighanne *et al.* descubrieron que este clon tenía una tasa de amplificación mucho mayor que el resto y que esto se debía a una mutación en la secuencia Shine-Dalgarno de una proteína involucrada en la replicación vírica. Esta mutación le aporta una complementariedad mayor al RNA ribosomal 16S¹⁰⁷. De los candidatos obtenidos para GD2, la secuencia inespecífica y repetida THMDPKTHWFTA (candidatos Gd6, 12, 17 y 21) podría tratarse de este tipo de fago con alguna ventaja propagativa.

De los candidatos positivos para el ELISA se seleccionaron cuatro para continuar con los experimentos: GdA y GdB mostraban secuencias repetidas; GdC y GdE fueron positivos para el ELISA y su secuencia era hidrofílica. Este aspecto resulta relevante ya que el siguiente paso es fusionar la secuencia del candidato seleccionado con la del *carrier* BLS descrito en la sección Introducción. La purificación de la quimera recombinante de BLS podía dificultarse si el péptido tiene un carácter altamente hidrofóbico.

Para continuar evaluando la capacidad de unión de estos candidatos al Ac de selección se realizó un ELISA con diluciones seriadas de cantidades conocidas de cada fago previamente titulado. Los cuatro candidatos fueron capaces de unirse al Ac de una manera dependiente de la concentración, siendo los candidatos GdC y GdE los que mostraron mayor señal a igual concentración de fago.

Por otro lado se realizó un ensayo de citometría de flujo de interferencia, en el cual los fagos compitieron por la unión al Ac con células positivas para GD2. En este ensayo los candidatos GdB, GdC y GdE pudieron secuestrar al Ac y bloquear su unión a la línea celular de una manera dependiente de la concentración; siendo el candidato GdC el que logró una mayor disminución del porcentaje de expresión para la misma concentración de fago. Teniendo en cuenta los resultados de ambos ensayos se seleccionó a GdC como el candidato para continuar con la fusión a BLS.

Para la búsqueda de péptidos miméticos para el glicano SLeX se utilizó un Ac monoclonal anti-SLeX (clon CSEX1). En este caso el resultado del alineamiento mostró un escenario esperado, donde dos de las tres secuencias encontradas se repetían 10 y 13 veces.

En el ensayo de ELISA con diluciones seriadas, el candidato SxA mostró una mayor señal para la misma concentración de fago. Sin embargo, cuando se realizó el ensayo de flujo de interferencia, ninguno de los candidatos logró capturar el Ac y disminuir su marca en la línea celular positiva para SLeX.

Este tipo de ensayos de ELISA puede producir falsos positivos, debido a que se utilizan los mismos componentes que en los ensayos de *screening* de fagos, por lo cual, en principio, los fagos con TUPs podrían dar una marca positiva. Sin embargo, se pueden tomar ciertas precauciones para que esto no suceda. En nuestros ensayos de ELISA utilizamos leche descremada al 5% en lugar de BSA, para evitar TUPs que se hayan unido a esta proteína. Además se utilizó como control negativo para cada fago, un *well* sin Ac, para evaluar si el candidato se unía al plástico.

Por otro lado, el ensayo de citometría de flujo de interferencia tiene un nivel mayor de complejidad, ya la unión del Ac al péptido se evalúa de una forma indirecta. Analizando estos resultados se decidió continuar de todas maneras con el candidato SxA para ser fusionado a BLS.

El *screening* de los péptidos miméticos de la glicoproteína PSGL-1 se llevó a cabo utilizando el Ac monoclonal PD1, se ha reportado que este clon reconoce parte de la porción glicosilada de esta proteína. Cuando analizamos el alineamiento de las secuencias encontramos que SQAASNMFQPVK se encuentra repetida 8 veces, sin embargo resultó negativa para ELISA, situación similar a lo sucedido con la secuencia

inespecífica THMDPKTHWFTA seleccionada para GD2. Este TUP podría tener alguna ventaja propagativa, como se explicó anteriormente.

En cuanto a los candidatos positivos para el ELISA, es interesante analizar que varias secuencias se encuentran repetidas al menos una vez. En el caso de la secuencia de los clones PL3-18, la diferencia con la de los fagos PL17-24 es sólo un aminoácido. Se eligieron cuatro candidatos cuyas secuencias se encontraban repetidas, los cuales fueron capaces de unirse al Ac de una manera dependiente de la concentración en un ELISA, siendo los candidatos PLa y PLd los que mostraron mayor señal a igual concentración de fago.

En cuanto al ensayo de citometría de flujo de interferencia, ninguno de los candidatos logró capturar el Ac y disminuir su marca en la línea celular positiva para PSGL-1. En este caso se decidió posponer la elección de un candidato para la fusión a BLS, priorizando los candidatos elegidos para GD2 y SLeX.

La búsqueda de péptidos miméticos para el glicano LeA se llevó a cabo con el Ac monoclonal 7LE. El alineamiento reveló varias secuencias repetidas, algunas de ellas similares entre sí. La secuencia DHLTSLFEPYYD se encontró repetida tres veces, pero fue negativa en el ELISA, situación que se repite en los experimentos de los otros glicanos.

De los clones positivos para el ELISA, los fagos LA1, 4, 11 y 13 mostraron la misma secuencia, la misma tiene varios aminoácidos en común con la secuencia que se repite en los fagos LA3, 7, 20, 22 y 24; a su vez esta última secuencia tiene un solo aminoácido distinto a LA5. Del mismo modo, el par LA14 - LA24 mostraron la misma secuencia que a su vez tiene motivos similares al fago LA16. Los fagos LA 6 y 9 también expresaban el mismo péptido. Esto lleva a pensar en la existencia de ciertos motivos aminoacídicos importantes en la interacción de los péptidos con el Ac, que los llevó a ser seleccionados en los *pannings*.

Un ensayo interesante para analizar motivos relevantes en la unión al blanco es el de *scanning* de alanina; en el cual se sintetizan de manera química todos los candidatos sustituyendo cada residuo aminoacídico por una alanina (un aminoácido alifático neutral pequeño). Se evalúa la unión de cada variación del péptido al Ac de selección y de esa manera se identifica qué motivos aminoacídicos son indispensables para unión al blanco de manera de llegar a una secuencia consenso. Esta técnica ha sido utilizada en varios ensayos con bibliotecas de fagos^{89,105,106,108} y sería interesante de aplicar en el

caso de los péptidos miméticos con motivos repetidos tales como los obtenidos para LeA y PSGL-1.

En este caso fue difícil seleccionar pocos candidatos para continuar con los ensayos, sobre todo teniendo en cuenta que la mayoría de las secuencias repetidas eran hidrofóbicas. Por ello se decidió continuar con siete candidatos y evaluarlos en un ELISA con diluciones seriadas de cantidades conocidas de cada fago previamente titulado, como se explicó anteriormente.

En este ensayo los candidatos LAc, d, e y g tuvieron muy baja señal, sin embargo esto podría deberse a que la mayor concentración de fago evaluada no fue suficiente para generar una marca. Cabe destacar que el primer ELISA de *screening* de todos los candidatos (Figura 1.10B), donde estos clones dieron positivo, se realiza con fagos amplificados sin titular; por lo que no se sabe la concentración exacta de cada clon.

Por otro lado, los candidatos LAa, b y f mostraron una capacidad de unión al Ac de selección que fue dependiente de la concentración de fago, siendo el candidato LAf el que mostró mayor señal. El ensayo de citometría de flujo de interferencia no se llegó a realizar para este antígeno. En este caso, al igual que con PSGL-1, se decidió posponer la elección de un candidato para la fusión a BLS, priorizando los candidatos elegidos para GD2 y SLeX.

Para los experimentos de los glicanos LeX y STn se utilizaron los Ac P12 y B72.3 respectivamente. Estos *pannings* resultaron en fagos cuyos péptidos no pudieron ser reconocidos por el Ac de selección en un ELISA. Es interesante destacar que los alineamientos mostraron secuencias que se repetían varias veces; incluso las secuencias AGSDSAASFAHT y SGVYKVAYDWQH se encontraban presentes en los experimentos de ambos glicanos.

Se han reportado varios TUPs provenientes de bibliotecas de fagos de dodecapéptidos que suelen aparecer en los experimentos pero no se los ha podido asociar a una unión en particular. Tal es el caso de las secuencias APWHLSSQYSRT, HGWLYPHPRYPV y SVSVGMPKSPRP; esta última se ha asociado con una mayor propagación^{105,106}. Las dos secuencias encontradas repetidas veces en nuestros experimentos podrían ser nuevos TUPs de este tipo.

Con el objetivo de evitar la aparición de TUPs, se diseñaron modificaciones experimentales en los *pannings* de LeX y STn. Se realizó un experimento con 6 *pannings*

sucesivos y se intentó un método de elusión más específico utilizando el azúcar puro. Estos resultados no se muestran ya que no se obtuvieron péptidos capaces de unirse al Ac.

Un evento que puede desatar la aparición de TUPs es la presencia de contaminantes en la solución de Ac utilizado para el *screening*, tales como Ac endógenos de ratón presentes en el líquido ascítico e inmunoglobulinas bovinas presentes en el suero usada para el cultivo de hibridomas o proteínas presentes en el *buffer* en el que se encuentra el Ac^{105,106}. El Ac que reconoce STn contiene 0.1% de gelatina, una proteína que podría favorecer la selección de TUPs que puedan unirse a ella. En el caso del Ac utilizado para LeX, el mismo contiene 1% de BSA y no se encuentra purificado, sino que proviene directamente del sobrenadante. Esto podría acarrear varias proteínas inespecíficas y generar la aparición de TUPs.

Si bien la oferta de Ac contra glicanos no es muy amplia, resulta importante analizar las características de producción de los Ac a utilizar de manera de evaluar si son factibles de ser empleados para seleccionar péptidos miméticos. El glicano seleccionado como blanco puede ser relevante para el desarrollo de una terapia basada en esta tecnología pero es posible que no existan Ac adecuados para la selección.

Conclusión

Capítulo

I

Las bibliotecas de fagos, aun teniendo en cuenta sus dificultades experimentales, siguen siendo una herramienta útil en la búsqueda de péptidos miméticos de carbohidratos.

En este capítulo se lograron identificar 9 péptidos capaces de ser reconocidos por el Ac anti-GD2, 3 péptidos que fueron reconocidos por el Ac específico para SLeX, 10 péptidos reconocidos por el Ac anti-PSGL-1 y 11 péptidos reconocidos por el Ac anti-LeA. De esta primera serie de péptidos se logró seleccionar 4 candidatos para GD2, 2 para SLeX, 4 para PSGL-1 y 7 para LeA que lograron demostrar, en mayor o menor medida, tener mimética antigénica con los glicanos.

Se decidió continuar con los candidatos GdC y SxA para fusionar su secuencia a la proteína *carrier* BLS de manera de desarrollar una formulación vacunal que pueda tener mimética antigénica e inmunológica para cada glicano.

Capítulo II

Clonación y expresión de los
candidatos GdC y SxA como quimeras
de BLS

Objetivos

Capítulo II

- Clonar la secuencia de los péptidos miméticos de GD2 y SLeX en el plásmido que contiene la secuencia de BLS, generando la construcción quimérica.
- Optimizar las condiciones de inducción y expresión de las quimeras.
- Optimizar la purificación de las quimeras.
- Evaluar la mimética antigénica de las quimeras.

Materiales y métodos

Capítulo II

2.1 Clonación de la secuencia de los péptidos candidatos y generación de las quimeras.

Las secuencias nucleotídicas *sense* y *antisense* de los dodecapéptidos candidatos fueron sintetizadas por Thermofisher Scientific, de manera que se encuentren flanqueadas por secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción Afl II y Nsi I (New England Biolabs). Además se incluyeron tres glicinas como aminoácidos neutros para que sirvan como unión flexible a la molécula de BLS. El plásmido pET11a modificado para contener la secuencia de BLS fue digerido con las enzimas Afl II y Nsi I (Las condiciones de digestión se encuentran detalladas en el Anexo, Tabla A1). Se recuperó el plásmido lineal mediante una electroforesis preparativa realizada en un gel de agarosa 0.8% y la utilización de un kit de purificación de ADN de tacos de agarosa (AccuPrep Gel Purification Kit, Qiagen).

Las secuencias sintéticas de los péptidos fueron hibridadas incubándolas a 95°C por 2 min y luego enfriando progresivamente hasta 25°C. Posteriormente, el plásmido pET-11a-BLS lineal y las secuencias sintéticas fueron ligados utilizando la T4 DNA Ligasa (New England Biolabs) en una relación 1:15 de inserto:vector (las condiciones de ligación se encuentran detalladas en el Anexo, Tabla A2). Seguidamente, la ligación fue transformada en *E. coli* Top 10 competentes mediante electroporación. El esquema de clonado se muestra en la Figura 2.0.

Las bacterias fueron sembradas sobre una placa con LB sólido con adición de ampicilina (AMP) como antibiótico de selección (100 mg/L). Las colonias resultantes fueron analizadas mediante una *Colony* PCR usando *primers* específicos que hibridan en el centro de la secuencia de cada péptido y los *primers* del promotor y terminador T7 presentes en el plásmido (la mezcla de reacción, los *primers* y el ciclado se encuentran detallados en el Anexo, Tablas A3, A4 y A5 respectivamente). Se analizó el resultado mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.5%. Las colonias que resultaron positivas fueron mandadas nuevamente a secuenciar para confirmar la integridad de la construcción “quimera péptido-BLS”. Las mismas se amplificaron creciéndolas en LB + AMP a 37°C con agitación. Se purificaron los plásmidos utilizando un kit comercial de

Miniprep siguiendo las indicaciones del fabricante (EasyPure® HiPure Plasmid MiniPrep Kit, Transgene Biotech).

Para la producción a baja escala de las quimeras, los plásmidos obtenidos se transformaron en *E. coli* BL21 RIPL Codon plus competentes mediante electroporación. Las bacterias fueron sembradas sobre una placa con LB sólido + AMP. Las colonias resultantes fueron estriadas en una nueva placa para su posterior amplificación y evaluación de la expresión de la quimera.

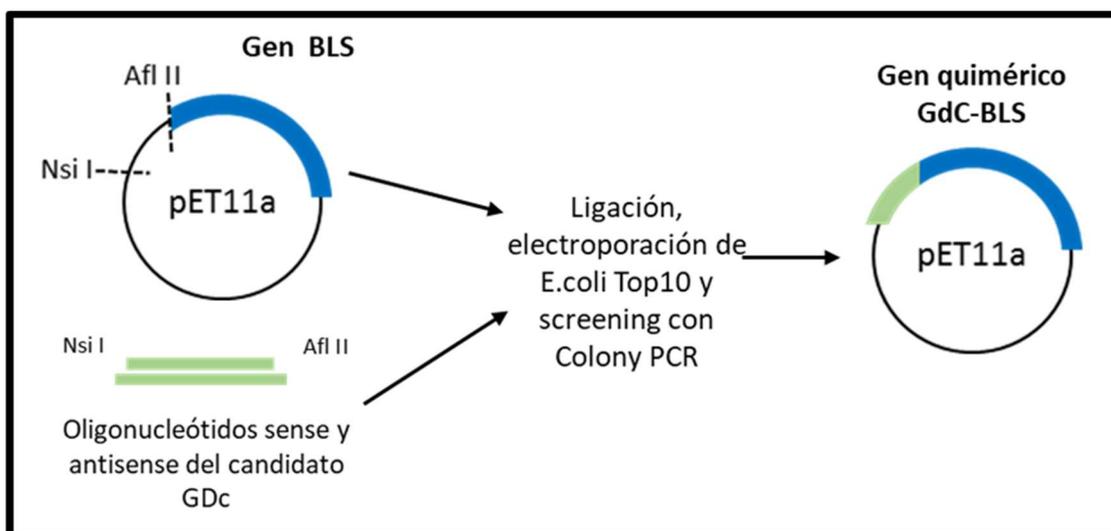


Figura 2.0 Esquema de clonado de las secuencias sintéticas de los péptidos miméticos al plásmido con la secuencia de BLS.

2.2 Expresión de las quimeras.

2.2.1 Evaluación de la expresión de las quimeras en los distintos clones.

Los clones transformados con la secuencia que codifica para las quimeras, fueron crecidos en medio LB + AMP a 37°C con agitación hasta llegar a una OD600 de 1. En este momento se indujo la expresión de las quimeras mediante la adición de 1mM IPTG (Invitrogen). Se incubaron los cultivos por 4 hs a 37°C en agitación. Una alícuota de bacterias normalizadas según DO600 fue centrifugada y resuspendida en *buffer* de lisis (50mM Tris, 50 mM EDTA pH8). Se evaluó la expresión de la quimera mediante un SDS-PAGE 10%, Las bacterias lisadas fueron hervidas con Laemellis *buffer* como *buffer* de

siembra. Se reveló tiñendo el gel con Coomassie Blue. Se eligió el clon con mayor expresión de la quimera. El mismo fue amplificado en LB + AMP y congelado a -80°C.

2.2.2 Optimización de las condiciones de inducción y expresión de la quimera.

Los clones con mayor expresión de cada quimera fueron crecidos en medio LB + AMP a 37°C con agitación hasta llegar a una OD600 de 1, momento en el cual se adicionó el IPTG. A partir de ese momento se evaluaron dos temperaturas de crecimiento: 37°C y 28°C. Se fueron tomando muestras a las 2, 3 y 4 hrs post inducción y un último punto ON. Se normalizó la cantidad de células por DO600 y se resuspendió en *buffer* de lisis. Las bacterias fueron sonicadas tres veces con pulsos de 20 segundos y descansos de 40, con una potencia del 50% (Sonicador Sonics Vibra Cell). Luego de una centrifugación de 20 min a 13500 rpm se separaron la fracción soluble (citoplasmática) y la fracción insoluble (donde se encuentran las proteínas que van a cuerpos de inclusión). Ambas fracciones fueron sembradas en un SDS-PAGE 12% teñido posteriormente con Coomassie Blue. Se evaluó cuál fue la condición que generó mayor expresión de la quimera y en que fracción se encontraba.

2.3 Purificación de las quimeras

2.3.1 Purificación de la quimera GdC a partir de la fracción citoplasmática.

Se partió de la fracción soluble obtenida luego de la centrifugación posterior al paso de sonicación. La quimera GdC fue dializada ON a *buffer* 50mM Tris pH 8.5 utilizando membranas de diálisis con poro de 12-14 KDa (Spectra/Por 4, Basic dialysis, 12-14 kDa, Spectrum). Ese material fue purificado en un primer paso mediante una columna de intercambio aniónico (resina Q-sepharose Fast Flow, GE Healthcare Bio-Sciences) utilizando un equipo de FPLC (*Fast protein liquid chromatography*). Se partió de la quimera en *buffer* 50mM Tris pH 8.5, a este pH la proteína tiene carga negativa y será capaz de unirse a la resina. Para la elución progresiva se realizó un gradiente de *buffer* 1M NaCl, 50mM Tris pH 8.5 de 0 a 100% en 30 minutos. Se fue monitoreando el proceso mediante la medición de absorbancia a 280nm. Se fueron recuperando distintas fracciones y se evaluó la presencia de la quimera en las mismas mediante SDS-PAGE. Las

fracciones positivas fueron concentradas utilizando un concentrador de proteínas con *cut-off* de 30 KDa (Vivaspin 20 MWCO 30000, Sartorius) y realizando sucesivas centrifugaciones. Con ese material se realizó una segunda etapa de purificación mediante una columna de exclusión molecular S-200 (resina Sephacryl S-200 HR, GE Healthcare Bio-Sciences). Se fueron recuperando distintas fracciones y se evaluó la presencia de la quimera en las mismas mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían a la quimera fueron concentradas, dializadas a PBS y cuantificadas mediante un SDS-PAGE, utilizando una proteína patrón pura de masa conocida (Nucleasa A).

2.3.2 Purificación de la quimera SxA a partir de cuerpos de inclusión.

Se partió del *pellet* de fracción insoluble separado por centrifugación luego del paso de sonicación. Se realizaron lavados de los cuerpos de inclusión: primero se resuspendió el *pellet* en *buffer* de lisis + 1% Triton, se centrifugó a velocidad máxima por 10 min., se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en *buffer* de lisis + 1M NaCl. Luego de dos lavados con esta solución se resuspendió el *pellet* en 8M urea, 50mM Tris pH 8. Se dejó con agitación ON. Al día siguiente se realizó un paso de centrifugación para eliminar las proteínas precipitadas.

Las quimeras desnaturalizadas en urea fueron dializadas ON a *buffer* 50mM Tris pH 8.5 + 4M urea utilizando membranas de diálisis con poro de 12-14 KDa (Spectra/Por 4, Basic dialysis, 12-14 kDa, Spectrum). Al día siguiente se repitió el mismo proceso bajando la concentración de urea a 2M. Al tercer día se dializó a *buffer* 50mM Tris pH 8.5 sin urea.

2.4 Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras

2.4.1 Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras mediante ELISA.

Se sensibilizaron placas de 96 *wells* con las quimeras ON a 4°C. Luego de un paso de bloqueo con leche descremada al 5% en PBS, se incubaron con el Ac de selección, el Ac anti-BLS o los controles correspondientes por dos hrs a TA con agitación. Se realizaron lavados con PBST 0.1%. Posteriormente se incubó con una dilución 1/4000 en PBS de un Ac secundario conjugado a peroxidasa que reconoce todos los isotipos de inmunoglobulinas de ratón (Goat Anti-Mouse IgM+IgG+IgA (H+L) Antibody, HRP

conjugate, Millipore) durante 1 hr a TA con agitación. Por último, se incubó la placa con OPD (ThermoFisher Scientific) por 15 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 492nm. Las concentraciones utilizadas están detalladas en la Tabla 1

2.4.1 Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras mediante Western Blot.

Las quimeras fueron sembradas en un SDS-PAGE al 12 o 15% según corresponda. Posteriormente fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF. Luego de un paso de bloqueo con leche descremada al 5% en TBST 0.1%, la membrana fue incubada con los Ac de selección ON a 4°C con agitación (las concentraciones utilizadas están detalladas en la Tabla 1). Se realizaron lavados con TBST 0.1% y se incubó con el Ac secundario conjugado a peroxidasa (Millipore) por 45 min a TA con agitación. Se reveló el experimento usando Bio-Lumina (Kalium, Biotech) como sustrato y un escanner de quimioluminiscencia (C-DiGit, LI-COR Biosciences).

2.5 Estructura tridimensional teórica de las quimeras

Las predicciones de la estructura tridimensional de las quimeras se llevaron a cabo utilizando el servidor online I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) obteniéndose un modelo de homología a partir de la estructura cristalizada de la BLS nativa. El resultado en formato PDB fue visualizado usando el *software* Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

Resultados

Capítulo

II

Clonación de la secuencia de los péptidos candidatos y generación de las quimeras.

En la Figura 2.1 se muestra el resultado obtenido luego de la digestión del plásmido pET-11a-BLS (calle 2). Se corroboró que ambas enzimas funcionaran realizando digestiones parciales con cada una por separado (calles 3 y 4), y se incluyó plásmido sin digerir como control negativo del experimento (calle 1). Se purificó el plásmido lineal a partir del taco de agarosa.

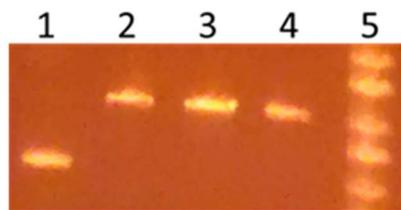


Figura 2.1 Digestión del plásmido. Gel agarosa 0.8%. 1: plásmido sin digerir. 2: plásmido digerido con ambas enzimas. 3: digestión parcial del plásmido con AFL II. 4: digestión parcial del plásmido con NSI I. 5: marcador de peso molecular 1Kb.

Las secuencias sintéticas se ligaron al plásmido pET-11a-BLS digerido, esta mezcla fue transformada en *E.coli* y posteriormente plaqueadas en LB sólido con AMP, donde crecieron 4 colonias de SxA (colonias A-D) y 2 de GdC (colonias A y B). Se evaluó la presencia del inserto mediante una *Colony* PCR con *primers* específicos diseñados para amplificar tanto la secuencia de BLS como la de los péptidos candidatos. En la Figura 2.2A se observa que ambas colonias obtenidas para GdC fueron positivas para la presencia del inserto. En el caso de SxA, sólo la colonia D contiene el inserto, como se muestra en la Figura 2.2B.

Los clones positivos fueron mandados a secuenciar, en la Figura 2.3A y 2.3B se muestran las secuencias obtenidas. Se corroboró de esta manera que la secuencia de los péptidos era correcta y que estaba clonada en marco con la secuencia de BLS. Se eligió continuar con los plásmidos correspondientes a la colonia B de GdC y a la colonia D de SxA. Ambos plásmidos fueron transformados en *E.coli* BL21 RIPL *codon plus*, para poder expresar la quimera péptido mimético-BLS.

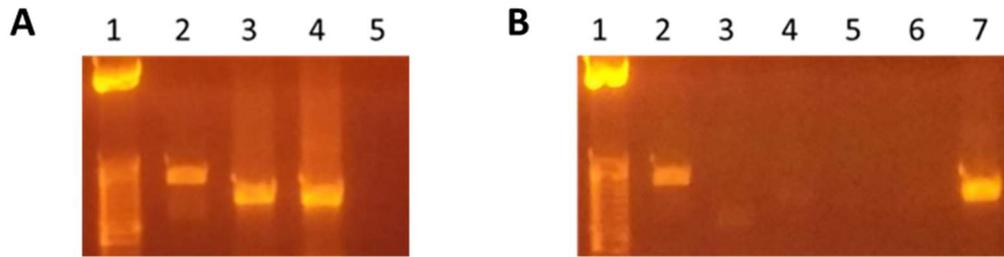


Figura 2.2 Gel agarosa 1.5% de la *Colony* PCR de GdC (A) y SxA (B). 1: marcador de peso molecular 50 pb. 2: Control positivo, plásmido sin inserto con *primers* T7p y T7t. A. 3: Colonia A. 4: Colonia B. 5: Control negativo, plásmido sin inserto con *primers* Fw GdC y T7t. B. 3: Control negativo, plásmido sin inserto con *primers* Fw SxA y T7t. 4: Colonia A. 5: Colonia B. 6: Colonia C. 7: Colonia D.

A

```

1  tattagtcog tacattcacc tctagaataa ttttggttaa ctttaagaag gagatataca tatgcattct tttatggttg atgaggctct gaatctgcgg
                                Nsi I >>...>>
                                >>.....GdC.....>
101 tatggtggag gctttaagac atcctttaa atgcattca ttcaggcccg ctggcacgcc gacatcggtg acgaagcgcg caaaagcttt gtcgccgaac
>....GdC...>>
                                Afl I >>...>>
                                >>.....BLS.....>
201 tggccgcaa gacgggtggc agcgtcggg tagagatatt cgacgtgccc ggtgcatatg aaattcccct tcacgccaa acattggcca gaaccggcg
>.....BLS.....>
301 ctatgcagcc atcgtcggg cggccttct gatcgacgc gccatctatc gtcattgatt cgtggcgagc gccgttatca acggcatgat gcaggtgcag
>.....BLS.....>
401 cttgaaacg aagtgcggg gctgagcgc gtgctgacg cgcaccattt ccatgaaagc aaggagcacc acgacttctt ccatgctcat tcaagggtga
>.....BLS.....>
501 agggcggtga agcggcccat gccgccttgc agatcgtgag cgagcgcagc cgcattcgcg ttgtctgagc tagcatgact ggtggacagc aaatgggtcg
>.....BLS.....>
    
```

B

```

1  gggtttgaag ggtacattcc cctctagaat aattttgttt aactttaaga aggagatata catatgcatt ttgatgggac ggctatttgg ttgctgcgct
                                Nsi I >>...>>
                                >>.....SxA.....>
101 cgtctggttg aggtcttaag acatccttta aaatcgatt cttcaggccc cgctggcagc ccgacatcgt tgacgaagcg cgaaaagct ttgtcgccga
>....SxA...>>
                                Afl I >>...>>
                                >>.....BLS.....>
201 actggccgca aagacgggtg gcagcgtcga ggtagagata ttgcagctgc cgggtgcata tgaattccc cttcacgcca agacattggc cagaaccggg
>.....BLS.....>
301 cgctatgag ccatcgtcgg tgcggccttc gtgatcgagc gggcatctca tcgtcatgat ttctgtggca cggccgttat caacggcatg atgcaggtgc
>.....BLS.....>
401 agcttgaac ggaagtgcg gtgctgagc tcgtctgac gccgcacct tccatgaaa gcaaggagca tcacgacttc tccatgctc atttcaaggt
>.....BLS.....>
501 gaaggcggtg gaagcggccc atgcgcctt gcagatcgtg agcagcgcga gccgcattgc gcttgtctga gctagcatga ctggtggaca gcaaatgggt
>.....BLS.....>
    
```

Figura 2.3 A: Secuenciación del plásmido correspondiente a la colonia B de GdC. B: Secuenciación del plásmido correspondiente a la colonia D de SxA.

Evaluación de la expresión de las quimeras en los distintos clones

Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en LB sólido + AMP donde crecieron 17 colonias de GdC y 7 colonias de SxA. Se indujo la expresión de las quimeras en las colonias aisladas y se evaluó mediante un SDS-PAGE la presencia de la quimera. En la Figura 2.4A se observan los primeros 6 clones de GdC evaluados. Se puede observar una banda que corresponde a una proteína sobreexpresada de entre 16 y 19 KDa aproximadamente, cercana a la banda del monómero de BLS puro presente en la calle 1. Esta banda mayoritaria no se encuentra presente en el lisado de los clones no inducidos (calle 2 y 6), infiriendo que se trata de la quimera GdC. Para la quimera SxA se evaluaron los 7 clones, como puede verse en la Figura 2.4B. En este caso también observamos una banda que sólo está presente en los clones inducidos, con peso molecular concordante con el peso molecular teórico del monómero de la quimera. Considerando que todos los clones evaluados de ambas quimeras mostraron expresión de las mismas, se seleccionaron el clon 3 de GdC y el clon 1 de SxA; se amplificaron y se generó un banco de células para preservar las quimeras.

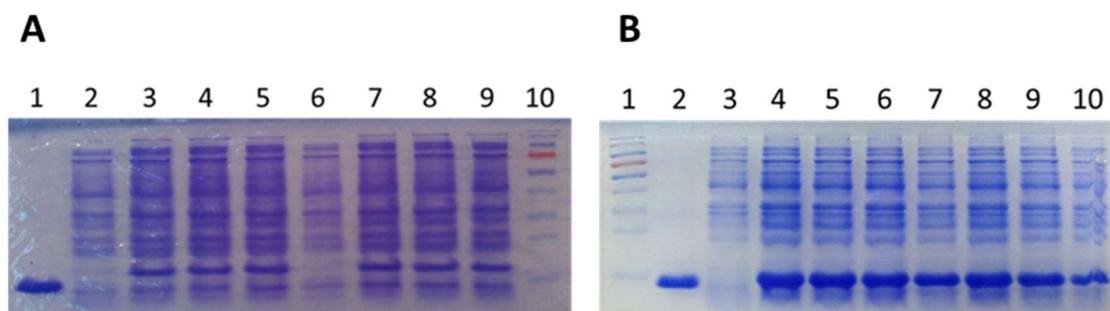


Figura 2.4 SDS-PAGE 12% de los lisados de las bacterias inducidas para expresar la quimera GdC (A) y SxA (B). **A.** 1: BLS purificada. 2: clon 1 sin inducir. 3-5: clones 1-3 inducidos. 6: clon 4 sin inducir. 7-9: clones 4-6 inducidos. 10: Marcador de peso molecular (MW) (PageRuler, Invitrogen). **B.** 1: MW (PageRuler, Invitrogen). 2: BLS purificada. 3: clon 1 sin inducir. 4-10: clones 1-7 inducidos.

Optimización de las condiciones de inducción y expresión de las quimeras.

Se evaluaron dos condiciones de inducción con IPTG a distintos tiempos: 37°C y 28°C. Se evaluó la presencia de la quimera en la fracción soluble y en la insoluble mediante un SDS-PAGE. En la Figura 2.5A y 2.5B puede observarse que en todas las condiciones evaluadas, la quimera GdC se encontró en la fracción soluble. Por otro lado, la quimera SxA se encontró en la fase insoluble en todas las condiciones evaluadas, por lo cual estaría formando cuerpos de inclusión (Figura 2.6A y 2.6B). En ambos casos se observa una buena sobreexpresión de la proteína.

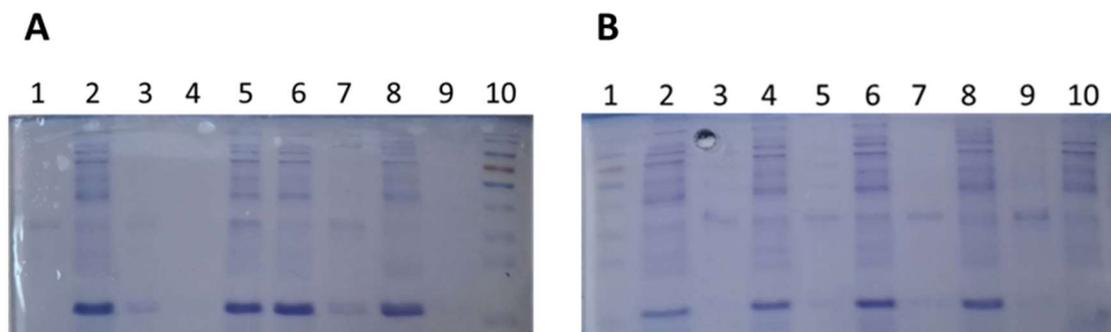


Figura 2.5 SDS-PAGE 12% de los lisados de las bacterias inducidas a 37°C (A) y 28°C (B) para expresar la quimera GdC. **A.** 1: fracción insoluble (FI) sin inducir. 2: fracción soluble (FS) 2 hrs inducción. 3: FI 2 hrs inducción. 4: FI 3 hrs inducción. 5: FS 3 hrs inducción. 6: FS 4 hrs inducción. 7: FI 4 hrs. inducción. 8: FS ON. 9: FI ON. 10: MW (PageRuler, Invitrogen). **B.** 1: MW (PageRuler, Invitrogen). 2: FS 2 hrs inducción. 3: FI 2 hrs inducción. 4: FS 3 hrs inducción. 5: FI 3 hrs inducción. 6: FS 4 hrs inducción. 7: FI 4 hrs. inducción. 8: FS ON. 9: FI ON. 10: FS sin inducir.

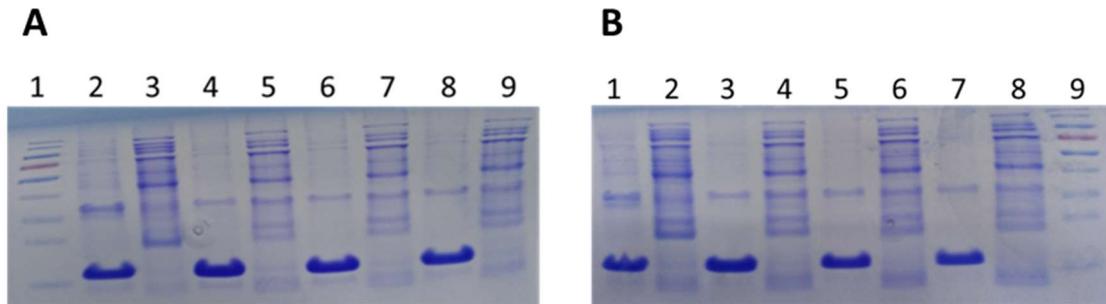


Figura 2.6 SDS-PAGE 12% de los lisados de las bacterias inducidas a 37°C (A) y 28°C (B) para expresar la quimera SxA. **A.** 1: MW (PageRuler, Invitrogen). 2: FI ON. 3: FS ON. 4: FI 4 hrs inducción. 5: FS 4 hrs inducción. 6: FI 3 hrs inducción. 7: FS 3 hrs inducción. 8: FI 2 hrs inducción. 9: FS 2 hrs inducción. **B.** 1: FI ON. 2: FS ON. 3: FI 4 hrs inducción. 4: FS 4 hrs inducción. 5: FI 3 hrs inducción. 6: FS 3 hrs inducción. 7: FI 2 hrs inducción. 8: FS 2 hrs inducción. 9: MW (PageRuler, Invitrogen).

Purificación de las quimeras

Purificación de la quimera GDC

Teniendo en cuenta que la quimera GdC se encontró en la fracción soluble proveniente de los lisados bacterianos, se utilizó el sobrenadante obtenido luego de la sonicación como punto de partida para purificarla mediante una columna de intercambio aniónico. Se evaluó la presencia de la quimera en las distintas fracciones mediante SDS-PAGE. En la Figura 2.7A se observa un gráfico representativo de todas las purificaciones que se hicieron para obtener varios lotes de quimera. La quimera se encuentra mayoritariamente en la fracción 2, pero a pesar de que pudo ser separada de varias proteínas bacterianas, no se logró obtenerla con la pureza deseada. Es por ello que se decidió concentrar la fracción 2 para hacer una nueva purificación mediante una columna de exclusión molecular. En la Figura 2.7B se observa un SDS-PAGE con las distintas fracciones eluidas de la columna. GdC se encuentra presente en las fracciones 1, 2 y 3, sin embargo es en la fracción 1 en la que se encuentra más pura, la misma fue concentrada y dializada a PBS.

Se cuantificó mediante SDS-PAGE utilizando una curva de concentración de un patrón puro y conocido, se muestra un gel representativo en la Figura 2.8.

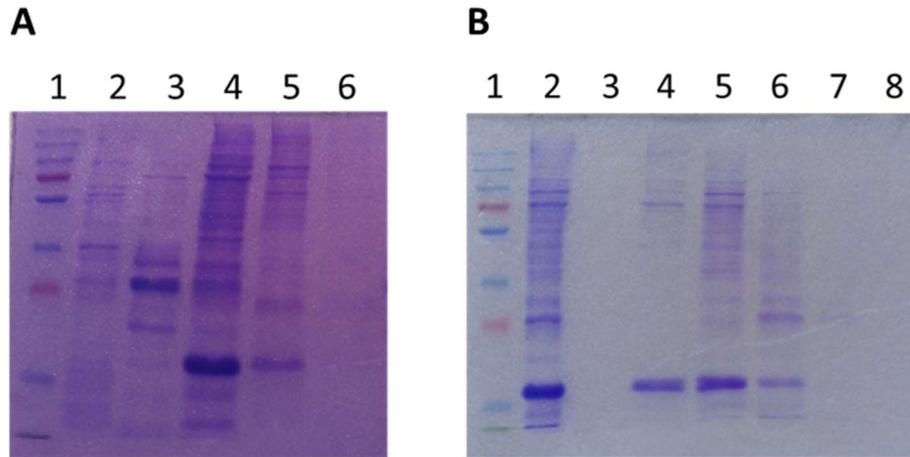


Figura 2.7 A. SDS-PAGE 12% de las fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico utilizada para la purificación de la quimera GdC. 1: MW (PageRuler, Invitrogen). 2: Volumen muerto, contiene las proteínas que no se pegaron a la columna. 3-6: Fracciones 1-4. B. SDS-PAGE 12% de las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular utilizada para la purificación de la quimera GdC a partir de las fracciones obtenidas luego de la purificación mediante la columna de intercambio aniónico. 1: MW (PageRuler, Invitrogen). 2: Muestra previa a la columna. 3: Volumen muerto, contiene las proteínas que no se pegaron a la columna. 4-8: Fracciones 1-5.

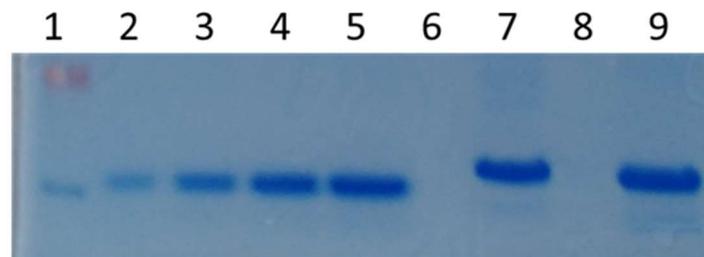


Figura 2.8 SDS-PAGE 12%, cuantificación de las quimera purificada GdC y la quimera SxA. 1: MW (PageRuler, Invitrogen). 2-5: curva de proteína patron 2µg, 5µg, 10µg, 15µg. 6: -. 7: GdC 5µl del stock. 8: -. 9: SxA 5µl del stock de proteína agregada en PBS.

Purificación de la quimera SxA

La quimera SxA se encontró en cuerpos de inclusión por lo que el primer paso de la purificación consistió en solubilizar los mismos en un *buffer* con alta concentración de urea. Luego se intentó renaturalizar la proteína dializándola a *buffer* Tris pH 8.5 de manera progresiva, bajando la concentración de urea a la mitad cada día. Sin embargo

la proteína precipitó y formó agregados cuando la concentración de urea fue menor a 4 M. Se intentó solubilizar la proteína con *buffers* de distinto pH y concentración de urea, pero no se logró tener la quimera soluble. Teniendo en cuenta que la quimera no presentó contaminaciones relevantes con otras proteínas que pudieran interferir con posteriores ensayos (como se observa en la Figura 2.5), se decidió no realizar pasos posteriores de purificación por FPLC. Se continuó con dos formulaciones: la quimera agregada (en PBS) por un lado y la quimera no agregada, desnaturalizada (en 4M urea) por el otro.

Se realizó una cuantificación aproximada de las quimeras mediante SDS-PAGE utilizando una curva de concentración de un patrón puro y conocido, se muestra un gel representativo con la quimera en PBS 4M urea en la Figura 2.9 y con la quimera agregada en PBS en la Figura 2.8 calle 9.

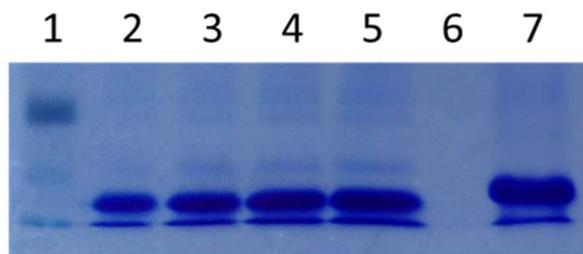


Figura 2.9 SDS-PAGE 12%, cuantificación de la quimera SxA en PBS 4 M urea. 1: MW (Blue Plus Protein Marker, Trangene). 2-5: curva de proteína patrón 5µg, 10µg, 15µg, 20µg. 6: -. 7: SxA 15µl del stock de proteína en PBS 4M urea.

Evaluación de la mimética antigénica de las quimeras

Para corroborar que las quimeras mantenían la mimética antigénica de los péptidos expresados por los fagos, se evaluó si el Ac específico para cada glicano podía reconocer a la quimera mediante dos experimentos: un ELISA y un Western Blot utilizando los Ac anti-glicanos. En la Figura 2.10A se puede observar que la quimera GdC fue reconocida por el Ac anti-GD2 en el ensayo de ELISA, corroborando que mantiene la mimética antigénica. Se confirmó además que podía ser reconocida por un Ac anti-BLS. Asimismo, la quimera GdC fue reconocida por el Ac anti-GD2 en un ensayo de Western Blot (Figura 2.10B). En cuanto a la quimera SxA, se puede observar en la Figura 2.11A que no pudo ser reconocida por el Ac anti-SLeX en un ELISA; aunque sí fue reconocida por el Ac anti-

BLS. Sin embargo, la quimera fue reconocida por el Ac anti-glicano en un Western Blot (Figura 2.11B).

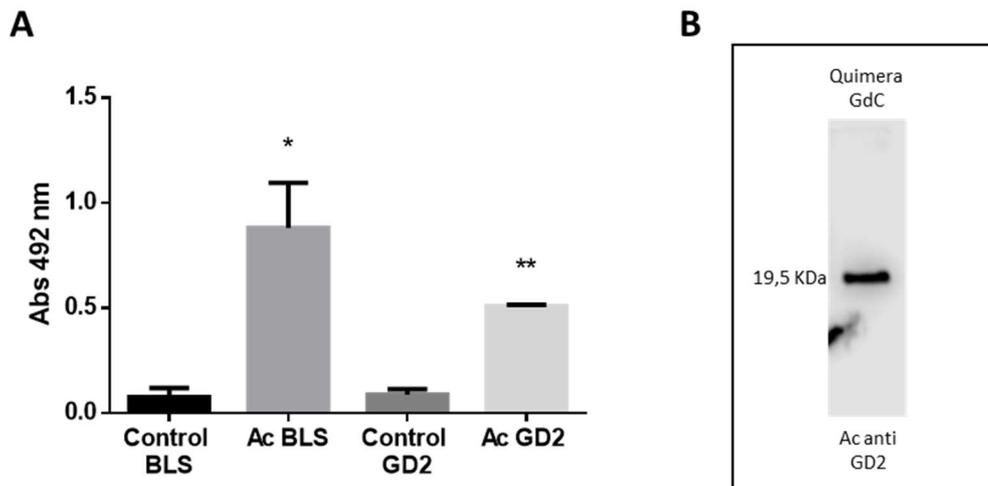


Figura 2.10 A: ELISA de la quimera GdC. La quimera fue sensibilizada en una placa de 96 *wells* e incubada con el Ac anti-GD2 y un Ac anti-BLS. Se muestra la media de absorbancia con su desvío estándar. Se realizó un test de *student* comparando contra un control negativo de cada anticuerpo sin quimera. **B:** Western Blot de la quimera GdC. La quimera fue sembrada en un SPS-PAGE 12%, transferida a una membrana de PVDF e incubada con el Ac anti-GD2. Se estimó el peso molecular de la banda comparándolo con un MW (PageRuler, Invitrogen).

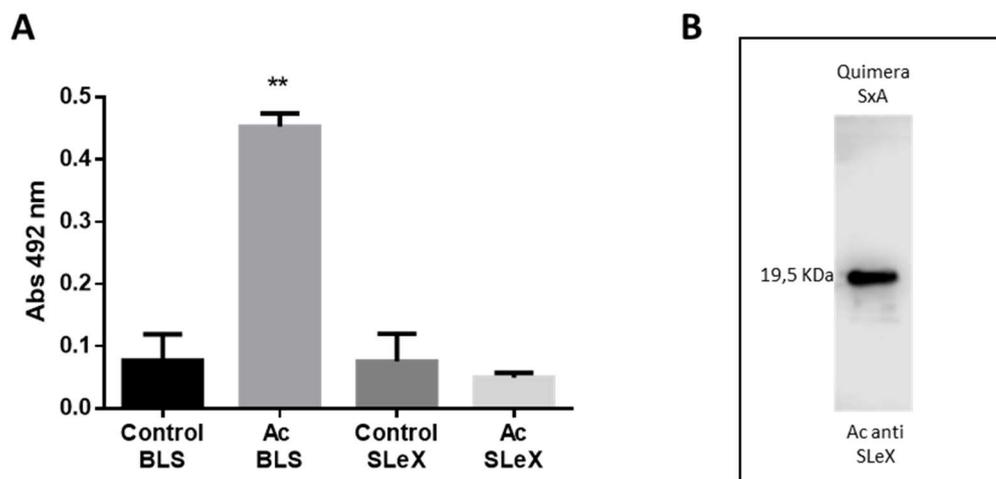


Figura 2.11 A: ELISA de la quimera SxA. La quimera fue sensibilizada en una placa de 96 *wells* e incubada con el Ac anti-SLeX y un Ac anti-BLS. Se muestra la media de absorbancia con su desvío estándar. Se realizó un test de *student* comparando contra un control negativo de cada anticuerpo sin quimera. **B:** Western Blot de la quimera SxA. La quimera fue sembrada en un SPS-PAGE 15%, transferida a una membrana de PVDF e incubada con el Ac anti-SLeX. Se estimó el peso molecular de la banda comparándolo con un MW (PageRuler, Invitrogen).

Estructura tridimensional teórica de las quimeras

Teniendo en cuenta el resultado que se obtuvo al evaluar la mimética antigénica de la quimera SxA, se decidió analizar de manera *in silico* la estructura de ambas quimeras mediante análisis bioinformático. Para ello se predijo la estructura tridimensional y el plegamiento teórico de las quimeras. En la Figura 2.12 se observa que la secuencia del péptido GdC se encuentra expuesta hacia el exterior del decámero. Por otro lado, la secuencia del péptido SxA se encuentra hacia el interior del decámero, como se observa en la Figura 2.13, por lo que no queda expuesta.

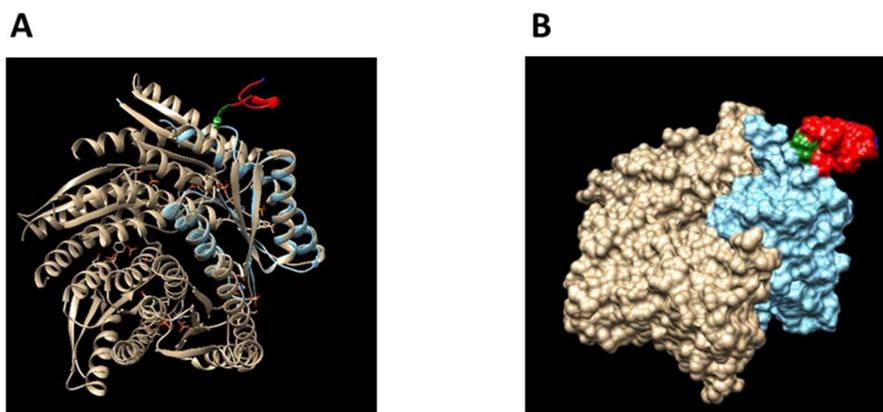


Figura 2.12 A: Modelado del plegamiento teórico de la quimera GdC. B: Modelado de la estructura tridimensional teórica de la quimera GdC. La sección de color celeste corresponde a una subunidad del decámero. El péptido GdC se encuentra resaltado en rojo, mientras que el *linker* de glicinas se detalla en verde.

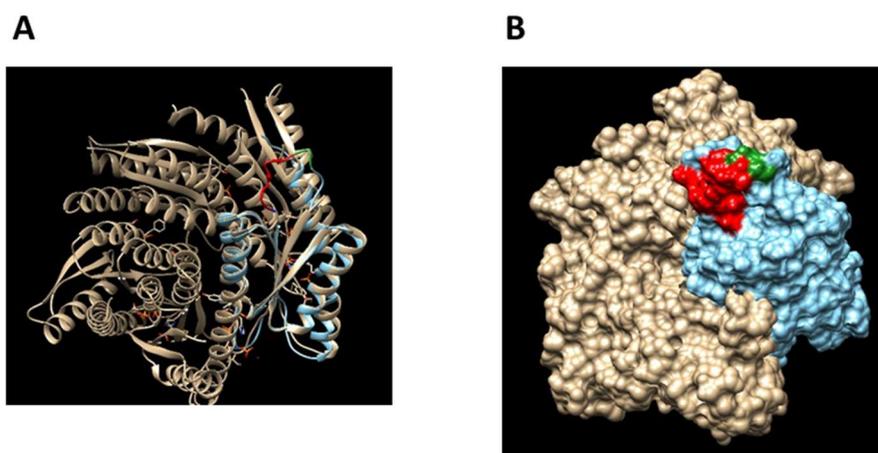


Figura 2.13 A: Modelado del plegamiento teórico de la quimera SxA. B: Modelado de la estructura tridimensional teórica de la quimera SxA. La sección de color celeste corresponde a una subunidad del decámero. El péptido SxA se encuentra resaltado en rojo, mientras que el *linker* de glicinas se detalla en verde.

Discusión

Capítulo

II

En este capítulo se llevó a cabo la fusión de las secuencias de los péptidos miméticos GdC y SxA con la secuencia de la proteína *carrier* BLS mediante técnicas de ingeniería genética. La fusión de este tipo de péptidos a un *carrier* es indispensable ya que se ha reportado que los péptidos cortos (menores a 15 aminoácidos) no requieren procesamiento por las células presentadoras de antígenos, por lo que se unen de manera exógena a las moléculas MHC de clase I en todas las células nucleadas que expresan estas proteínas. La presencia de una gran cantidad de péptido unido a células presentadoras de antígenos no profesionales en ausencia de moléculas coestimuladoras derivará en una señal tolerogénica, disminuyendo la eficacia de la inmunización⁴⁹. En este contexto, la plataforma BLS surge como un *carrier* más que interesante, ya que permite generar quimeras decaiméricas que exponen diez copias del péptido mimético y es altamente inmunogénica⁹³.

El primer paso para generar las quimeras consistió en clonar la secuencia de los péptidos miméticos de GD2 y SLeX en un plásmido conteniendo la secuencia de BLS, generando un gen quimérico. Las quimeras GdC-BLS y SxA-BLS pudieron expresarse como proteínas recombinantes en *E.coli* mediante la inducción con IPTG.

Al momento de expresar proteínas recombinantes en bacterias se debe tener en cuenta distintos escenarios. Las quimeras de BLS suelen encontrarse de forma soluble en el espacio citoplasmático o formando cuerpos de inclusión, los cuales son agregados insolubles de la proteína. En general, los cuerpos de inclusión se forman cuando la bacteria es forzada a producir grandes cantidades de una proteína; las mismas se encuentran inactivas y además suelen mostrar artefactos estructurales, como puentes disulfuro no nativos y cisteínas libres no habituales. Estos dos escenarios implican métodos distintos de purificación de la proteína. En el caso de los cuerpos de inclusión se deben agregar pasos de solubilización con agentes desnaturizantes, de eliminación de los puentes disulfuro y de renaturalización de la proteína a su forma activa. Para evitar la formación de estos agregados se suele inducir la expresión de la proteína a temperaturas más bajas que la de crecimiento óptimo de la bacteria¹⁰⁹.

Otro escenario a tener en cuenta es que la proteína resulte tóxica para la bacteria, por lo que al producirse en grandes cantidades comienza a elevarse la tasa de muerte de las mismas y baja el rendimiento de la producción de la proteína. En estos casos se puede inducir la expresión a tiempos cortos, para evitar la acumulación en el tiempo de

la proteína¹⁰⁹. Por estos motivos es indispensable optimizar las condiciones de expresión de las quimeras de BLS, para lograr la máxima expresión de las mismas.

En este contexto se evaluó la expresión de las quimeras a temperatura óptima (37°C) y a una temperatura más baja (28°C). En ambas condiciones la quimera GdC se encontraba en la fracción soluble, mientras que la quimera SxA se encontraba formando cuerpos de inclusión. En ambos casos se obtuvo un buen rendimiento, por lo que se infiere que la quimera no resulta de gran toxicidad para la bacteria.

Teniendo en cuenta que la purificación de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión suele ser compleja, decidimos evaluar otras condiciones de crecimiento e inducción de la expresión de la quimera SxA para ver si al bajar el nivel de expresión, la proteína podía encontrarse de forma soluble. Se evaluaron distintas concentraciones de IPTG: 1 mM, 0.5 mM y 0.1 mM creciendo las bacterias a 16°C. En todas estas condiciones la quimera formó cuerpos de inclusión, como se observa en la Figura A1 del Anexo.

Las quimeras de BLS no poseen un *tag* que facilite la purificación. Por lo tanto, suelen purificarse en base a sus diferencias con las otras proteínas contaminantes en punto isoeléctrico y tamaño; mediante una columna de intercambio iónico y de exclusión molecular, respectivamente⁹³.

La quimera GdC fue purificada, en primer lugar, mediante una columna de intercambio aniónico. Las fracciones obtenidas contenían varias proteínas bacterianas contaminantes, por lo que se decidió realizar otro paso de purificación mediante una columna de exclusión molecular. En este caso se logró obtener fracciones más puras, con un porcentaje mayoritario de la quimera.

La quimera SxA, por otro lado, provenía de cuerpos de inclusión; por lo que sólo se encontraba contaminada por una proteína bacteriana, la cual se hallaba en muy baja cantidad respecto de la quimera (Figura 2.6). En base a esto se decidió no realizar pasos de purificación por FPLC.

El siguiente paso fue evaluar la mimética antigénica de las quimeras. Esto resulta indispensable, ya que el péptido fue seleccionado por el Ac en el entorno proteico del fago; al fusionarlo a BLS y modificar su entorno, el mismo podría adquirir una estructura secundaria que afecte la unión al Ac e incluso podría perder su mimética antigénica^{110,111}.

La quimera GdC logró ser reconocida por el Ac anti-GD2 tanto en condiciones nativas, mediante un ensayo de ELISA, como en condiciones desnaturalizantes, en un ensayo de Western Blot (Figura 2.10). Este resultado sugiere que el péptido se encuentra desplegado, sin formar una estructura secundaria compleja. Esto se corrobora al observar la estructura tridimensional teórica en la Figura 2.12, donde el péptido se encuentra expuesto hacia el exterior de la proteína.

La quimera SxA, por otro lado, sólo logró ser reconocida por el Ac anti-SLeX en condiciones desnaturalizantes en un ensayo de Western Blot (Figura 2.11). Cuando se analiza la estructura tridimensional teórica en la Figura 2.13 se observa que el péptido no está expuesto hacia el exterior de la proteína, sino que se encontraría interactuando con los aminoácidos de BLS. Este podría ser el motivo por el cual el péptido sólo es reconocido por el Ac en condiciones desnaturalizantes. La interacción del péptido con BLS podría inclusive modificar la estructura tridimensional de la quimera, impidiendo la correcta unión de los monómeros. En este contexto, no resulta extraño asociar esto con el hecho de que la quimera SxA nunca logró ser renaturalizada luego de ser solubilizada en urea.

Una posible solución a esta problemática podría ser agregar una secuencia espaciadora más larga entre el péptido y BLS, de manera de disminuir la interacción entre ellos y favorecer la exposición hacia el exterior del péptido. Por otro lado, decidimos hacer una predicción de estructura tridimensional del candidato SxB, el cual había demostrado tener mimética antigénica con el glicano SLeX. En la Figura A2 del Anexo se observa que el péptido SxB se encuentra expuesto hacia el exterior de la quimera. Este péptido podría ser un buen candidato para generar una formulación vacunal fusionado a BLS.

Conclusión

Capítulo

II

En este capítulo se logró fusionar las secuencias de los péptidos miméticos de GD2 y SLeX a la proteína *carrier* BLS, generándose dos proteínas quiméricas (la quimera GdC y la quimera SxA). Estas proteínas pudieron ser expresadas en *E.coli* satisfactoriamente. Se logró purificar la quimera GdC por FPLC y se corroboró que la misma mantiene la mimética antigénica. Por otro lado, se obtuvieron dos formulaciones de la quimera SxA: la quimera agregada por un lado y la quimera en 4M urea por el otro, ambas en *buffer* PBS. El plegamiento teórico de esta quimera mostró que el péptido mimético estaría interactuando con la secuencia de BLS y no se encontraría expuesto hacia el exterior. Este podría ser el motivo por el cual esta quimera mantiene la mimética antigénica sólo en condiciones desnaturalizantes.

Capítulo III

Evaluación de la capacidad
inmunogénica de las quimeras en
modelos murinos.

Objetivos

Capítulo III

- Optimizar protocolos de inmunización con las quimeras GdC y SxA en modelos murinos.
- Evaluar si la respuesta inmune obtenida tiene reactividad cruzada con los glicanos de interés.
- Caracterizar dicha respuesta inmune.

Materiales y métodos

Capítulo III

3.1 Inmunización de animales con las quimeras.

Se utilizaron ratones de las cepas BALB/c, C57 y CF1. Se evaluaron distintos protocolos de inmunizaciones subcutáneas. Se utilizó adyuvante de Freund (Thermo Fisher Scientific) en una relación 1:1 de volumen. En todos los casos, la primera dosis se realizó con Freund completo y el resto de las dosis con Freund incompleto. Al día 35 se procedió al sangrado de los animales y sacrificio.

Protocolo 1: se realizaron 3 inmunizaciones espaciadas cada 14 días, con 150 µg de quimera o 100 µg de BLS sólo en PBS.

Protocolo 2: se realizaron 5 inmunizaciones espaciadas cada 7 días, con 300 µg de quimera o 273 µg de BLS sólo en PBS.

3.2 Obtención de suero.

La sangre fue incubada a 37°C por 1 h. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 20 min para separar el suero. El mismo fue alicuotado y congelado a -20°C.

3.3 Evaluación de la respuesta inmune.

3.3.1 ELISA contra los glicanos puros.

Se evaluó la respuesta inmune generada por las quimeras mediante un ELISA contra los blancos puros: SLeX (Dextra Laboratories), GD2 (Santa Cruz Biotechnology). Los glicanos fueron sensibilizados en placas de 96 wells. Se utilizaron 160 ng/well del gangliósido GD2 resuspendidos en metanol y de 1 a 2 µg/well del carbohidrato SLeX resuspendido en agua destilada. En ambos casos se dejó evaporar el solvente ON a temperatura ambiente. Se bloquearon las placas con 4% BSA (Sigma) en PBS por 2 hs a 37°C. Posteriormente se incubó con diluciones de los sueros de los ratones en PBS + 1% BSA por 2 hs a 37°C. Los lavados se realizaron con PBST 0.1% + 0.1% BSA. Posteriormente se incubó con distintos Ac secundarios que reconocen inmunoglobulinas totales de ratón, el isotipo IgG o el isotipo IgM en particular, conjugados a peroxidasa en PBS + 1% BSA por 1 h a 37°C (Goat Anti-Mouse IgM+IgG+IgA (H+L) Antibody, HRP conjugate, Millipore, Goat anti-mouse IgG (H-L)-HRP, Goat anti-mouse IgM mu chain (HRP)). Las

concentraciones utilizadas de los diferentes Ac se encuentran detalladas en la Tabla 1. Por último, se incubó la placa con OPD por 15 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 492nm. Se analizó la absorbancia de los sueros pre-inmunes para fijar un punto de corte y en base a eso se compararon las absorbancias de los sueros control (BLS sólo) y los sueros de las quimeras. Se calculó del título de Ac como la inversa de la dilución del primer punto que generó respuesta.

3.3.2 Citometría de flujo contra células con expresión de los glicanos.

Se evaluó la respuesta inmune generada por las quimeras mediante una citometría de flujo contra líneas celulares con expresión de cada glicano. Se utilizaron las líneas celulares SK-N-AS y EL-4, positivas para GD2 y Colo-205, positiva para SLeX. 10^6 células fueron sembradas en cada tubo, centrifugadas y resuspendidas en 20 μ l de una dilución 1/10 de los sueros en PBS. Como control positivo las células fueron incubadas con Ac monoclonales específicos para cada antígeno: GD2 1/200 (BioLegend); SLeX 1/100 (BD Pharmingen). Las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C, lavadas con PBS e incubadas con una dilución en PBS, del Ac secundario conjugado al fluorocromo RPE (DAKO) por 30 min a 4°C. Se registraron 5×10^5 eventos en un citómetro de flujo FACsCalibur y se analizaron los resultados en el programa FlowJo. Se utilizaron controles de isotipo en cada experimento.

Resultados

Capítulo

III

Inmunizaciones con la quimera GdC.

Se realizó una primera prueba con tres ratones hembra por grupo de la cepa C57 y tres machos BALB/c siguiendo el protocolo 1 de inmunización. Los sueros fueron evaluados mediante ELISA contra el gangliósido GD2 puro. En la Figura 3.1A se compara la respuesta obtenida en los ratones inmunizados con la quimera GdC contra los inmunizados sólo con BLS en ratones C57. En la misma se observa que el suero del ratón GdC 3 logró reconocer al gangliósido, mostrando una mayor señal en relación a los sueros de los ratones BLS, en todas las diluciones evaluadas. En la Figura 3.1B se comparan las respuestas de la dilución 1/20 de los sueros GdC contra un promedio de los sueros BLS, observándose una diferencia significativa entre el ratón GdC 3 y el control BLS.

Se analizó la composición de los sueros para evaluar si la respuesta contra GD2 era mayoritariamente IgG o IgM. Como se observa en la Figura 3.2 los Ac del suero del ratón GdC 3 que reconocen a GD2 serían del isotipo IgM.

Por otro lado se evaluó la capacidad del suero del ratón GdC 3 de unirse a células positivas para GD2 mediante citometría de flujo. En la Figura 3.3 se observa que los Ac provenientes de este ratón lograron reconocer tres veces más células positivas para GD2 en relación a los Ac de los animales inmunizados con BLS.

Los resultados de la evaluación de los sueros obtenidos en ratones BALB/c se muestran en la Figura 3.4, donde se observa que ninguno de los sueros logró reconocer al gangliósido GD2.

Para ambas cepas se realizó un ensayo de ELISA contra BLS nativa, donde se corroboró que la inmunización logró generar Ac contra el *carrier* (datos no mostrados).

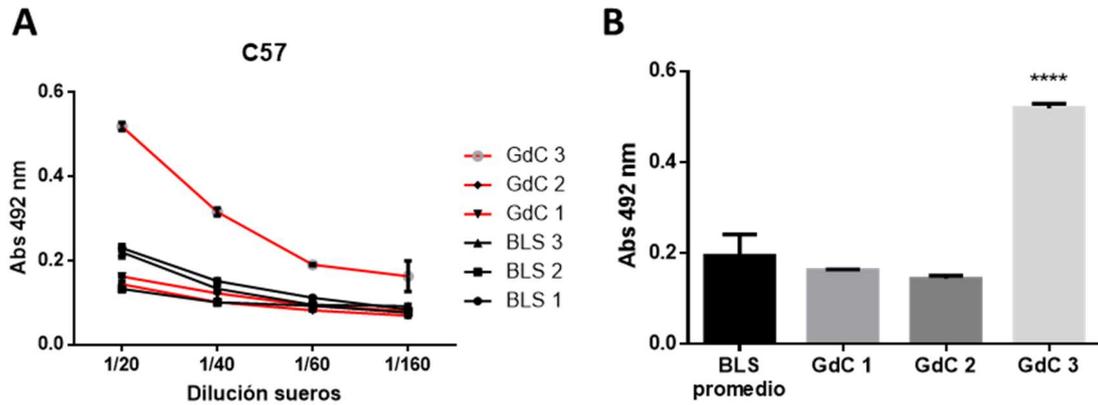


Figura 3.1 A: Evaluación de la respuesta inmune de la quimera GdC con el primer esquema de inmunización, en ratones C57 mediante ELISA contra el gangliósido GD2 puro. Se grafican diluciones seriadas de los sueros utilizados. **B:** Detalle de la dilución 1/20 de los sueros del promedio de ratones inmunizados con BLS y los tres ratones inmunizados con GdC obtenidos en el experimento anterior. Se realizó un test estadístico ANOVA de una vía, pos test Dunnet $p < 0.0001$.

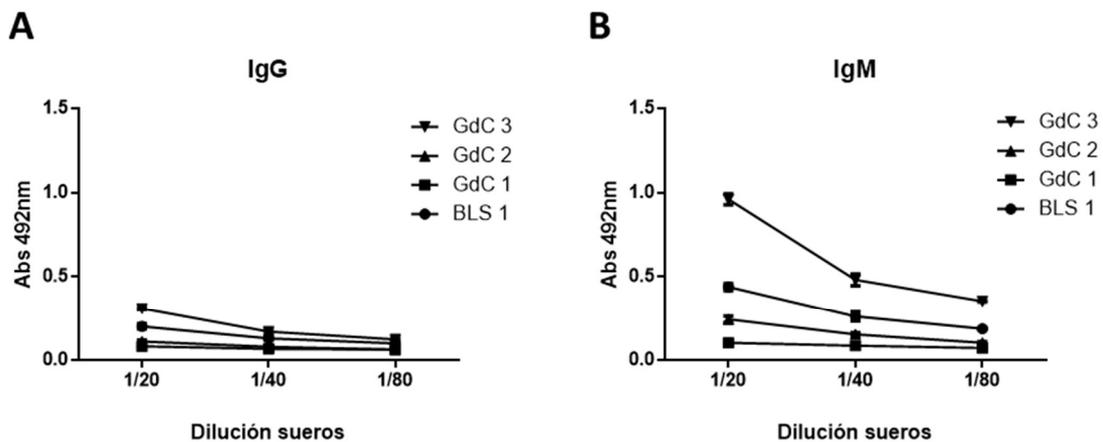


Figura 3.2 Caracterización de la respuesta inmune humoral en los ratones C57 mediante ELISA contra el gangliósido GD2 puro. **A:** detección de Ac de isotipo IgG. **B:** detección de Ac de isotipo IgM.

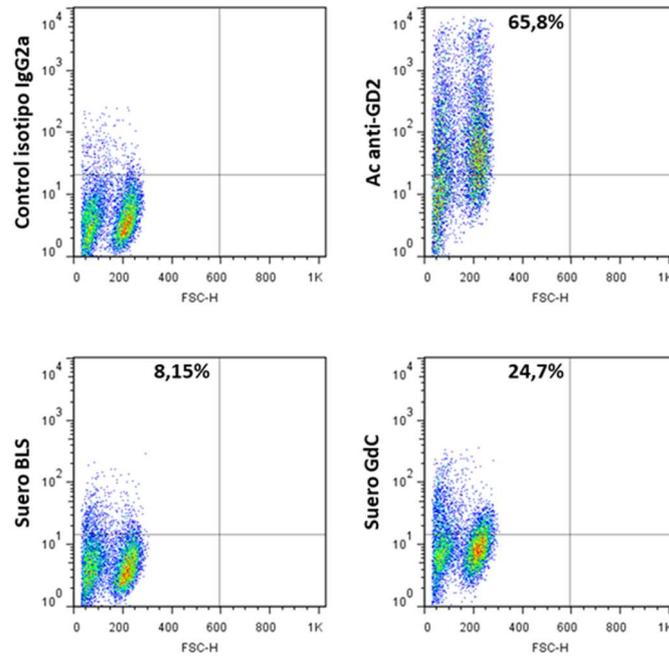


Figura 3.3 Evaluación de la respuesta inmune de los ratones C57 con el primer esquema de inmunización, mediante citometría de flujo contra la línea celular SK-N-AS positiva para GD2. Se muestran dots plots representativos de al menos tres experimentos con el suero de un ratón inmunizado con BLS y el suero del ratón 3 inmunizado con GdC. Se comparan contra la marca obtenida para el Ac anti-GD2. Las medianas de la intensidad fluorescencia fueron: Ac Isotipo: 4.02. Ac anti-GD2: 42.9. Suero BLS: 4.70. Suero GdC: 9.18.

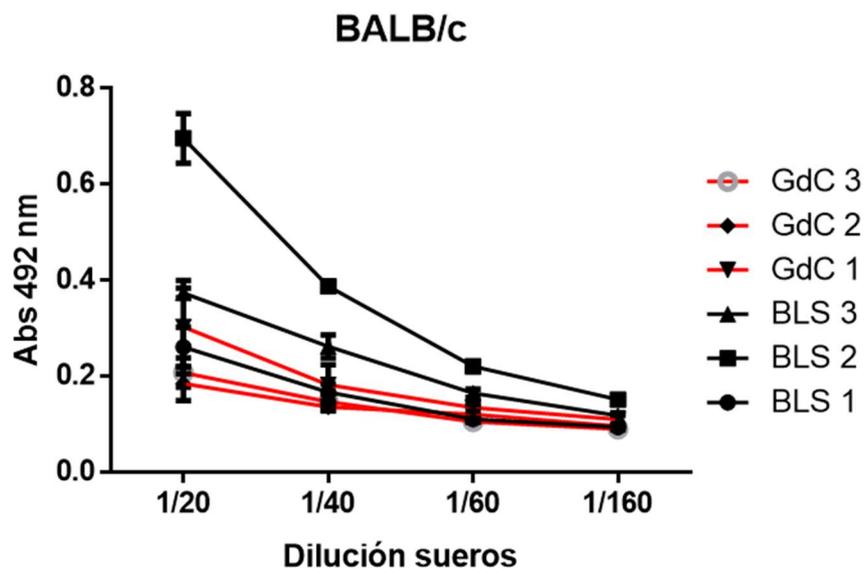


Figura 3.4 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera GdC con el primer esquema de inmunización, en ratones BALB/c mediante ELISA contra el gangliósido GD2 puro. Se grafican diluciones seriadas de los sueros utilizados.

Como repetición del ensayo y para contar con un mayor número de animales se realizó una segunda prueba con 10 ratones machos por grupo de la cepa C57 siguiendo el protocolo 1 de inmunización. En la Figura 3.5A se muestran los resultados de la evaluación de los sueros contra el gangliósido puro, donde se observa que varios sueros BLS generaron mayor señal que los sueros GdC. Esto podría deberse a un pegado inespecífico. Analizando además la capacidad de los sueros de reconocer células con expresión de GD2 mediante citometría de flujo (Figura 3.5B), se observa que los sueros GdC no mostraron una diferencia significativa en la unión a estas células en relación a los sueros BLS. Estos resultados sugieren que los sueros de los ratones inmunizados con la quimera GdC no logran reconocer al gangliósido GD2. Se corroboró que la inmunización logró generar Ac contra el *carrier* realizando un ensayo de ELISA contra BLS nativa, donde (datos no mostrados).

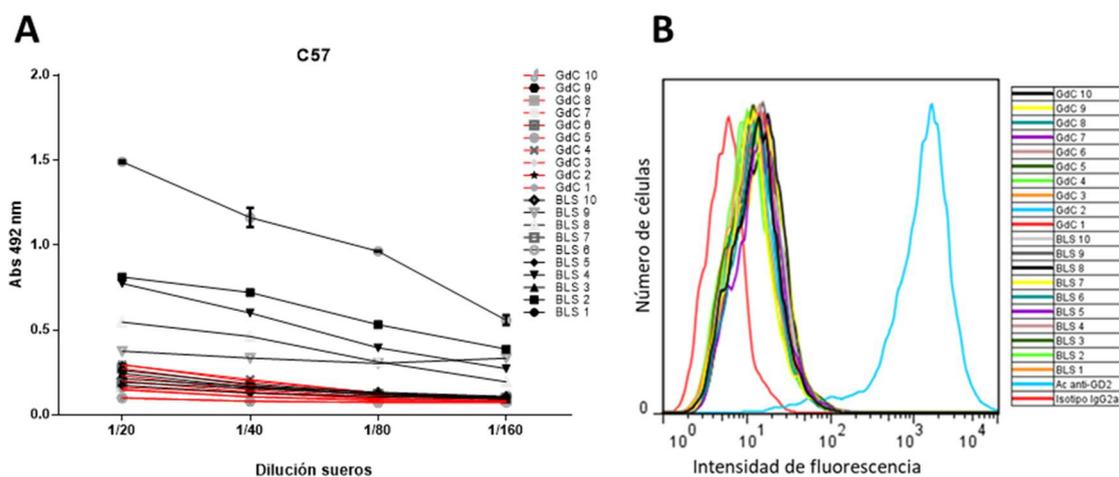


Figura 3.5 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera GdC con el primer esquema de inmunización en grupos de 10 ratones C57 mediante **A:** ELISA contra el gangliósido GD2 puro. Se grafican diluciones seriadas de los sueros utilizados. **B:** citometría de flujo contra la línea celular EL-4 positiva para GD2. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con GdC.

En base a estos resultados, se decidió evaluar un esquema de inmunización con mayor cantidad de inmunógeno y mayor número de inmunizaciones. Para ello, se realizó una tercera prueba con 5 ratones hembra por grupo de la cepa C57 y BALB/c siguiendo el protocolo 2 de inmunización. En la Figura 3.6 se muestran los resultados para los ratones C57. Aun cuando se observa una mayor reactividad de los sueros de los ratones

inmunizados con la quimera de GD2 para el gangliósido blanco, esta no es lo suficientemente fuerte para ser considerada positiva. En consonancia, no se detectó un reconocimiento de las células positivas para GD2 evaluando estos sueros por citometría de flujo. En el caso de los ratones BALB/c (Figura 3.7), los sueros de los ratones inmunizados con BLS mostraron un leve aumento en la señal en el ELISA, probablemente esto se deba un pegado inespecífico. Teniendo en cuenta que los sueros no lograron reconocer a GD2 presente en las células mediante citometría de flujo, se puede inferir que este protocolo de inmunización no logró generar respuesta inmune específica contra GD2 en ninguna de las cepas de ratón evaluadas. Para ambas cepas se realizó un ensayo de ELISA contra BLS nativa, donde se corroboró que la inmunización logró generar Ac contra el *carrier* (datos no mostrados).

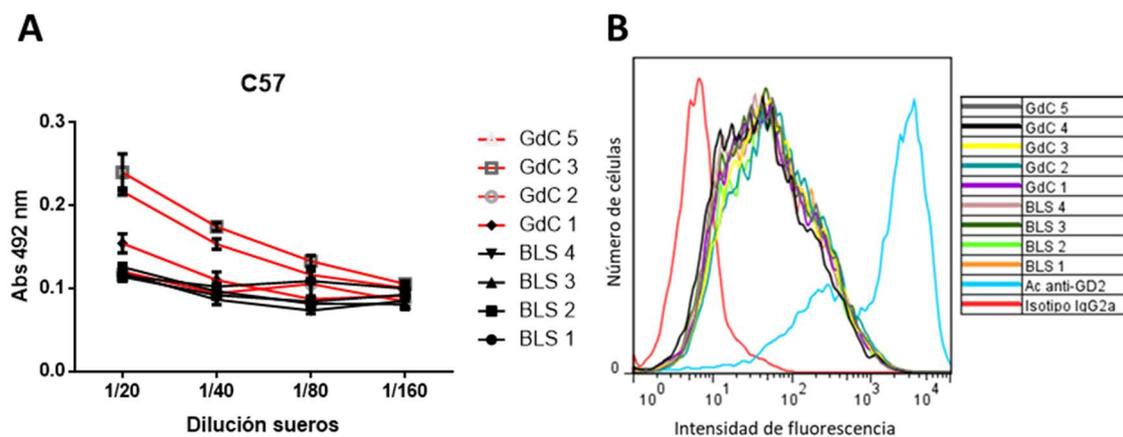


Figura 3.6 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera GdC con el segundo esquema de inmunización en ratones C57 mediante **A:** ELISA contra el gangliósido GD2 puro. Se grafican diluciones seriadas de los sueros utilizados. **B:** citometría de flujo contra la línea celular EL-4 positiva para GD2. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con GdC.

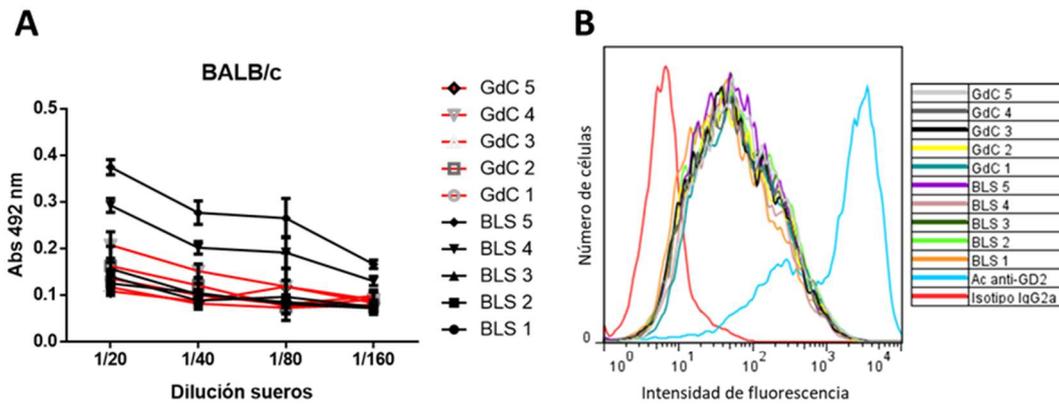


Figura 3.7 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera GdC con el segundo esquema de inmunización en ratones BALB/c mediante **A:** ELISA contra el gangliósido GD2 puro. Se grafican diluciones seriadas de los sueros utilizados. **B:** citometría de flujo contra la línea celular EL-4 positiva para GD2. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con GdC.

Inmunizaciones con la quimera SxA.

Se realizó una primera prueba con grupos de 2 a 5 ratones hembras de la cepa C57 y machos de las cepas BALB/c y CF1, siguiendo el protocolo 1 de inmunización. Se utilizó la quimera SxA agregada. Los sueros fueron evaluados mediante ELISA contra el carbohidrato SLeX puro y mediante citometría de flujo contra una línea celular positiva para SLeX. En la Figura 3.8 se compara la respuesta obtenida en los ratones inmunizados con la quimera SxA contra los inmunizados sólo con BLS en ratones C57. Se observa, en la única dilución evaluada, que no hay diferencias significativas entre las marcas de los sueros de SxA y los de BLS. Este resultado se corroboró mediante citometría de flujo, infiriendo que no se generó una respuesta inmune detectable específica contra SLeX en esta cepa de ratón. Una situación similar se observa en la cepa BALB/c (Figura 3.9), en donde los sueros SxA no lograron reconocer a SLeX en las condiciones evaluadas.

Por otro lado, al analizar los sueros de los ratones CF1, se observó que los mismos no lograron reconocer al carbohidrato puro en un ensayo de ELISA (Figura 10A). Sin embargo, al analizar la citometría de flujo de la Figura 10B se observa que los sueros de dos ratones inmunizados con la quimera SxA mostraron una mayor capacidad para reconocer células positivas para SLeX en relación a los sueros de los ratones inmunizados

con BLS. Este resultado se detalla en la Figura 10C, donde se grafican los dot plots de los dos ratones mencionados; observándose que los Ac de los dos ratones inmunizados con SxA logran reconocer más del doble de células positivas para SLeX en relación a los Ac de los animales inmunizados con BLS. Para las tres cepas se realizó un ensayo de ELISA contra BLS nativa, donde se corroboró que la inmunización logró generar Ac contra el *carrier* (datos no mostrados).

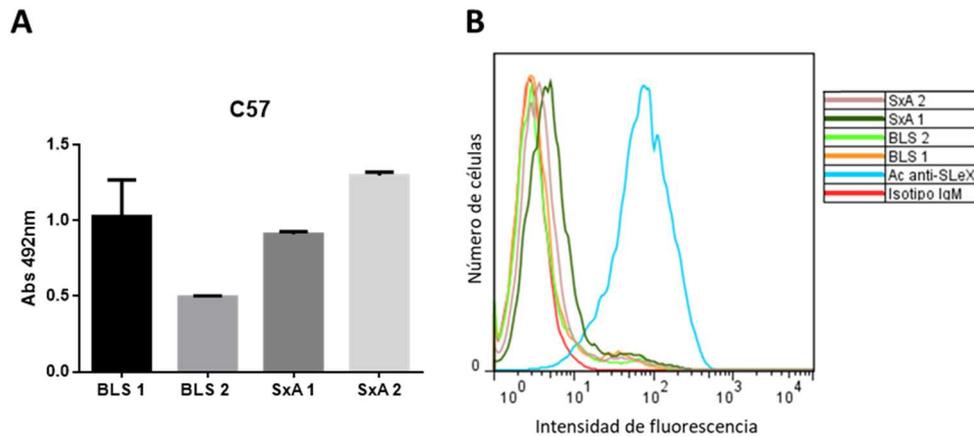


Figura 3.8 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera SxA con el primer esquema de inmunización en ratones C57 mediante **A:** ELISA contra el glicano SLeX puro. Se grafica una dilución 1/20 de los sueros. **B:** citometría de flujo contra la línea celular Colo-205 positiva para SLeX. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con SxA.

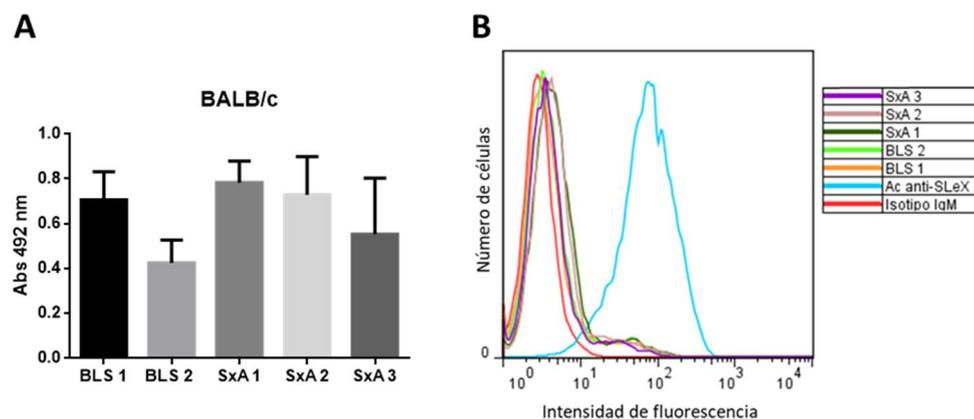


Figura 3.9 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera SxA con el primer esquema de inmunización en ratones BALB/c mediante **A:** ELISA contra el glicano SLeX puro. Se grafica una dilución 1/20 de los sueros. **B:** citometría de flujo contra la línea celular Colo-205 positiva para SLeX. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con SxA.

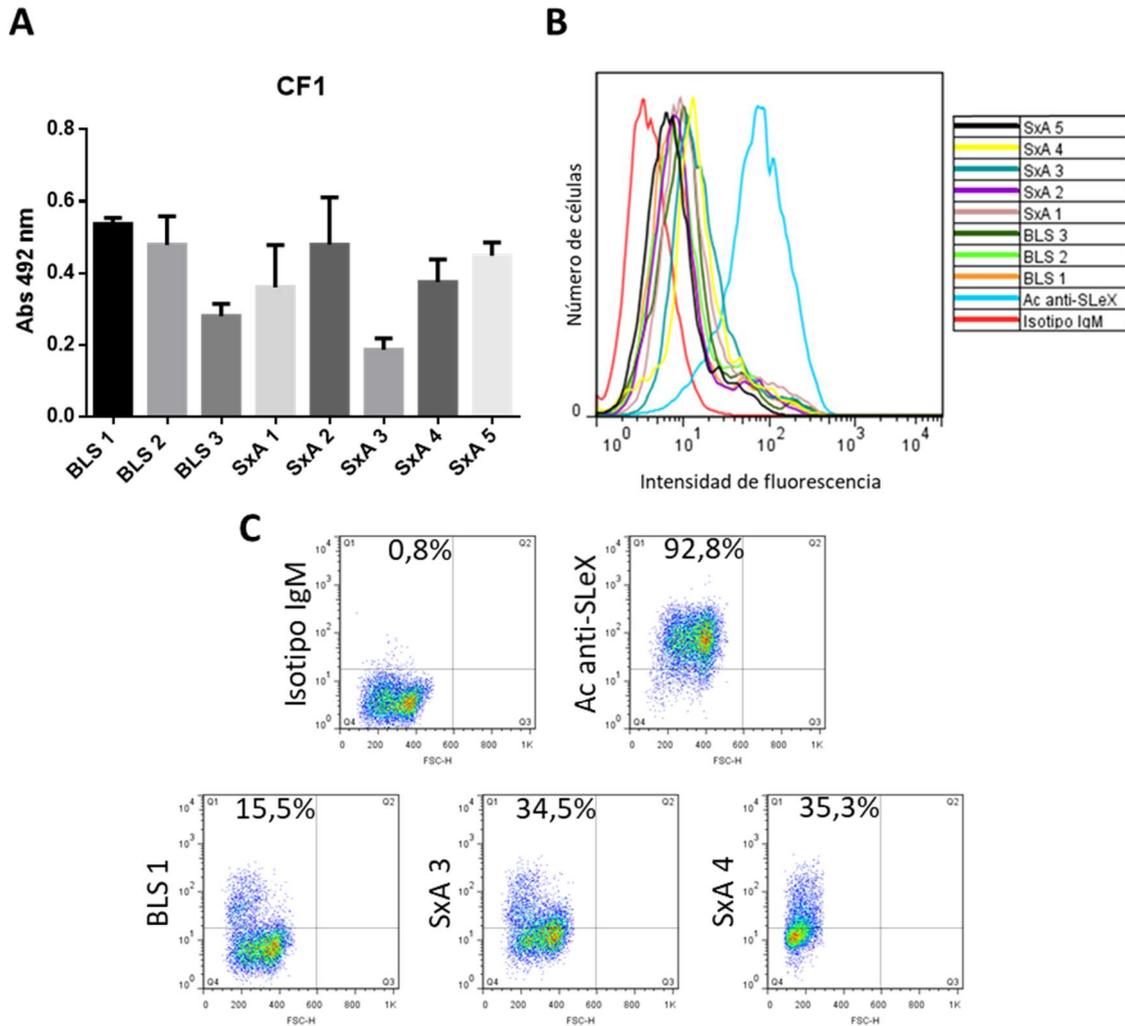


Figura 3.10 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera SxA con el primer esquema de inmunización en ratones CF1 mediante **A**: ELISA contra el glicano SLeX puro. Se grafica una dilución 1/20 de los sueros. **B**: citometría de flujo contra la línea celular Colo-205 positiva para SLeX. Se muestra un histograma con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con SxA. **C**: Dot plots de los sueros de los ratones SxA 3 y SxA 4 comparados contra los de BLS. Se detalla el porcentaje de células marcadas. Se compara contra el control positivo con el Ac anti-SLeX.

En base a estos resultados, se decidió evaluar un esquema de inmunización con mayor cantidad de inmunógeno y mayor número de inmunizaciones. Para ello se realizó una segunda prueba con grupos de 5 ratones hembras de las cepas C57 y BALB/c, siguiendo el protocolo 2 de inmunización. Se utilizó la quimera SxA en 4M urea. En la Figura 3.11A se muestra la evaluación de los sueros de los ratones C57 contra el carbohidrato puro, donde no se observa una diferencia significativa entre los sueros SxA

y los BLS en la dilución utilizada. Este resultado se corrobora en la Figura 3.11B, donde se observa que los sueros no lograron reconocer al glicano SLeX expresado en una célula. Un resultado similar se obtuvo para ratones de la cepa BALB/c (Figura 3.12). Estos resultados sugieren que la respuesta inmune generada en ratones de ambas cepas no tiene reactividad cruzada con el glicano SLeX. Para ambas cepas se realizó un ensayo de ELISA contra BLS nativa, donde se corroboró que la inmunización logró generar Ac contra el *carrier* (datos no mostrados).

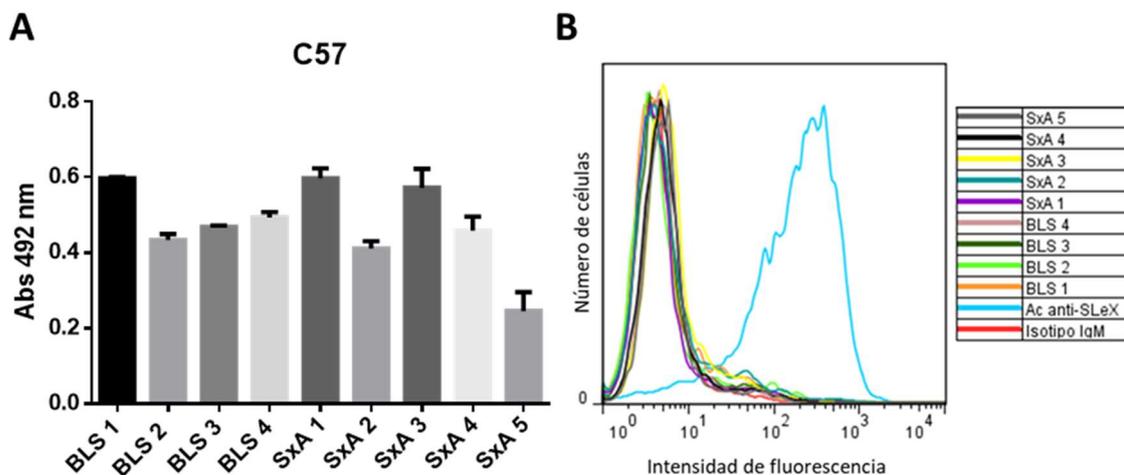


Figura 3.11 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera SxA con el segundo esquema de inmunización en ratones C57 mediante **A:** ELISA contra el glicano SLeX puro. Se grafica una dilución 1/20 de los sueros. **B:** citometría de flujo contra la línea celular Colo-205 positiva para SLeX. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con SxA.

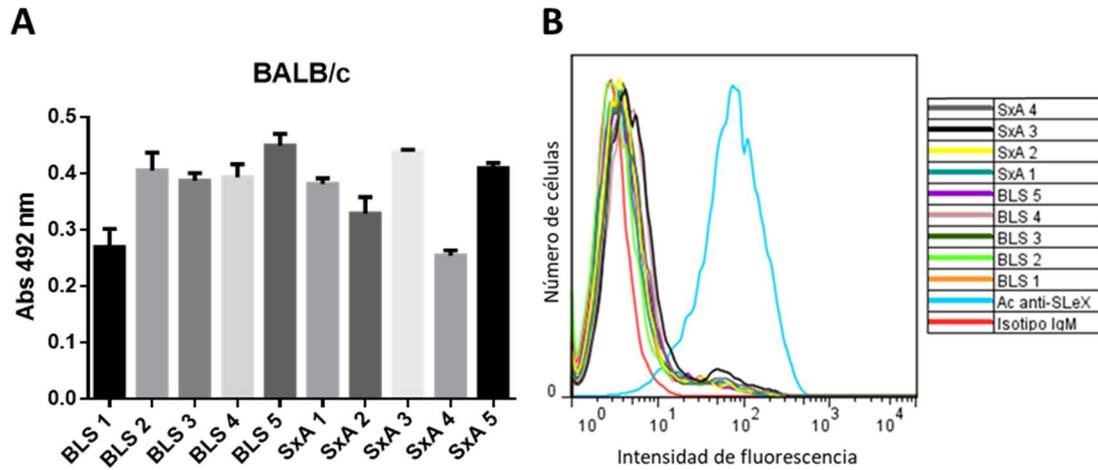


Figura 3.12 Evaluación de la respuesta inmune de la quimera SxA con el segundo esquema de inmunización en ratones BALB/c mediante **A:** ELISA contra el glicano SLeX puro. Se grafica una dilución 1/20 de los sueros. **B:** citometría de flujo contra la línea celular Colo-205 positiva para SLeX. Se muestra un histograma representativo de al menos tres experimentos con los sueros de los ratones inmunizados con BLS y con SxA.

Discusión

Capítulo

III

Los péptidos miméticos de GD2 y SLeX demostraron tener mimética antigénica con sus respectivos glicanos. En este capítulo se buscó evaluar la mimética inmunológica de las formulaciones vacunales, es decir, comprobar si los péptidos miméticos podían generar una respuesta inmune con reactividad cruzada hacia los glicanos blanco, presentados en el contexto de la proteína BLS como *carrier*. Como se explicó en la Introducción, la mimética inmunológica es un fenómeno que ocurre cuando el sistema inmune trata como un solo epítipo a la familia de epítipos que pueden ser distinguidos químicamente pero son funcionalmente reconocidos por un solo paratopo. El reconocimiento de esta familia de epítipos por un paratopo particular se describe como “degenerado” o carente de especificidad. Cuando antígenos distintos comparten epítipos de una misma familia se espera que estos antígenos tengan reactividad cruzada entre ellos¹¹².

Se realizó una primera prueba de inmunización con la quimera GdC en ratones C57 y BALB/c. Estas cepas tienen distinto haplotipo de MHC (b y d respectivamente¹¹³). Las moléculas de MHC se unen a péptidos y los exponen en la superficie celular para ser reconocidos por células inmunes. Los distintos haplotipos tienen distintos rangos de especificidad de unión a péptidos y por lo tanto su capacidad de reconocer los péptidos miméticos y exponerlos podría variar¹¹⁴. En este caso, sólo el suero de uno de los ratones de la cepa C57 logró reconocer al gangliósido GD2 puro en un ELISA y logró unirse a una línea celular tumoral con alta expresión del antígeno. Sin embargo cuando se repitió el ensayo con un número mayor de ratones de esta cepa ninguno mostró reactividad cruzada con el glicano. Se decidió evaluar un protocolo de inmunización con mayor cantidad de inmunógeno y más inmunizaciones en ambas cepas de ratones. Sin embargo, en esta condición los títulos de anticuerpos obtenidos, aunque mayores en el grupo tratado que en el grupo control, no permitieron confirmar una seroconversión significativa contra GD2.

En el caso de la quimera SxA, la primera prueba de inmunización se realizó con la quimera agregada en tres cepas de ratones. En este caso se incluyó la cepa CF1, la cual no es endocriada. Esta cepa tiene distintos haplotipos de MHC, de los cuales se conocen 6 de MHC H-2¹¹⁵. Para esta cepa, el ensayo de ELISA contra el carbohidrato puro no mostró señal. Cabe destacar que la sensibilización de carbohidratos tan pequeños, como SLeX, en la superficie de una placa no es eficiente y estos ensayos suelen arrojar falsos

negativos. Para resolver esto, sería necesario contar con el glicano conjugado de forma polivalente a una proteína como BSA, de manera de mejorar la eficiencia de la sensibilización.

Por otro lado, el ensayo de citometría de flujo arrojó resultados interesantes: los sueros de dos ratones lograron reconocer una línea celular tumoral con alta expresión de SLeX, indicando la presencia de anticuerpos específicos capaces de unirse al blanco. Para corroborar el resultado obtenido mediante citometría de flujo se deberían realizar más ensayos, tales como el análisis la unión de los sueros a muestras de tumores positivos para SLeX mediante inmunohistoquímica.

Además de evaluar la respuesta inmune humoral desencadenada en estos ratones, serían pertinentes otros ensayos para evaluar la respuesta citotóxica celular; tales como ADCC y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento), utilizando células tumorales positivas para los glicanos y células inmunes efectoras provenientes de donantes. Se ha comprobado que la eficacia clínica de muchas inmunoterapias pasivas y activas usadas en tratamientos contra el cáncer esta mediada por la inducción de estos mecanismos^{50,52}.

Por otro lado, se realizó otro ensayo con la quimera SxA no agregada, desnaturalizada en urea, evaluando un esquema con más cantidad de inmunógeno y más inmunizaciones. En este caso, no se detectó una respuesta inmune contra SLeX en ninguna de las dos cepas de ratones evaluadas (C57 y BALB/c).

En principio, en la mayoría de las condiciones evaluadas, las quimeras no lograron generar una respuesta inmune robusta contra los glicanos, lo que podría deberse a varios motivos analizados a cotinuación. Se han reportado varios casos de péptidos miméticos de glicanos seleccionados mediante bibliotecas de fagos, donde la mimeticidad antigénica no se correlacionó con una respuesta inmunológica cruzada contra el glicano en cuestión⁶⁷. Es decir, sólo porque un sustituto compite con un antígeno por un sitio de unión no significa que el primero sea un buen inmunógeno que logre generar la respuesta funcional deseada. Consecuentemente, la mimética antigénica no representa el mismo fenómeno que la mimética inmunológica¹¹¹.

Un ejemplo lo constituye el caso de los péptidos miméticos desarrollados contra un proteoglicano altamente expresado en melanomas (HMW-MAA: high molecular weight melanoma-associated antigen). Aunque los péptidos sintéticos lograron inhibir la unión

del Ac al antígeno de una manera dependiente de concentración, los mismos no lograron generar una respuesta inmune con reactividad cruzada al proteoglicano¹¹⁶. Otro ejemplo similar se observó con los péptidos miméticos desarrollados contra epitopes del virus del sarampión por el grupo de Muller¹¹⁷.

El fenómeno de mimética inmunológica no se encuentra muy caracterizado y hay varios factores que podrían influir en el éxito o fracaso de los péptidos miméticos de carbohidratos. No se encuentra claro cómo se manifiesta la mimética inmunológica en la estructura de los péptidos miméticos en sí; hay evidencia de que las respuestas inmunológicas cruzadas pueden ser generadas con péptidos miméticos funcionales además de miméticos estructurales o una combinación de ambas. Recordemos que los primeros se refieren a la unión al Ac de dos ligandos usando grupos funcionales diferentes y los últimos a su unión usando los mismos grupos^{68,118}.

Se han encontrado casos donde la mimética estructural parece indispensable para lograr una mimética inmunológica. Tal es el caso de los estudios realizados con los candidatos a péptidos miméticos de carbohidratos del virus del HIV, generados a partir del Ac 2G12^{119,120}. Por otro lado, se han reportado casos donde la mimética estructural no fue necesaria para lograr una mimética inmunológica. Uno de los candidatos a péptido mimético de un carbohidrato presente en la bacteria *Shigella flexneri* logró generar una respuesta inmune contra este glicano, aun cuando su mimética estructural fue parcial^{118,121}.

Muchos estudios de péptidos miméticos seleccionados con lectinas o Ac y luego analizados con un enfoque estructural han llegado a la conclusión de que la mimética estructural es mínima en el mejor de los casos. Las mismas conclusiones se encontraron al considerar los Ac anti-idiotipo. Estos miméticos servirían como estampas de las características estructurales de los carbohidratos nominales y consecuentemente, generarían Ac con propiedades similares a los generados por glicanos en una inmunización.

Sería interesante analizar qué tipo de mimética antigénica muestran los péptidos GdC y SxA, si estructural o funcional, ya que esto ayudaría a comprender qué tipo de interacciones se producen entre el Ac y el péptido y si este puede mimetizar los contactos entre el glicano y el Ac.

Una desventaja de la utilización de bibliotecas de fagos con lectinas o Ac y que podría afectar la capacidad de mimética inmunológica, es que pueden seleccionarse péptidos que fallan en mimetizar contactos críticos que el carbohidrato posee con la proteína. Hay una posibilidad de que esos péptidos se unan a sitios alternativos del Ac que no incluyen o incluyen parcialmente el de unión al glicano. Como se reportó en varios trabajos, péptidos con alta afinidad de unión al Ac no necesariamente mimetizan contactos críticos requeridos para la función deseada^{66,122}.

Adicionalmente, como sólo algunos aspectos de los epítopes tridimensionales son mimetizados, podrían seleccionarse sólo péptidos reactivos contra una sola de las cadenas del Ac de selección. Esto es una desventaja, ya que la elección de los péptidos miméticos debería estar basada en la interacción del péptido tanto con la cadena pasada como la liviana del Ac de manera de producir Ac con propiedades antígeno-específicas similares, ya que la combinación de las cadenas pesadas y livianas influirá en la especificidad^{66,123}.

Aun en el caso de que sea posible identificar miméticos que generen Ac con características moleculares compartidas con los Ac anti-glicanos, los Ac presentes en el suero podrían no unirse efectivamente al carbohidrato nativo¹²⁴.

Otro factor a tener en cuenta al evaluar el éxito o fracaso de un péptido mimético es la conformación de dicho péptido dependiente del entorno. Todavía no se ha dilucidado si es más relevante la conformación del péptido unida al Ac o su conformación en solución, incluyendo distintos solventes. La conformación del péptido unido al Ac está relacionada con la mimética estructural y funcional, como se explicó anteriormente. Pero existen otros dos mecanismos que refieren específicamente a la mimética en solución^{68,123}. Los péptidos podrían organizarse en solución de manera de replicar los arreglos de grupos polares proporcionados por el carbohidrato, esto es esencialmente mimética estructural en la fase en solución. Alternativamente, los péptidos podrían replicar sólo la forma del carbohidrato, pero no todos sus potenciales puntos de contacto con el *target*. Además, los péptidos podrían mimetizar sólo parcialmente la forma o los arreglos de grupos polares del carbohidrato.

No es claro cuál de estos mecanismos o la combinación de los mismos es la más relevante para la mimética inmunológica. Aunque los péptidos en teoría no conforman una estructura secundaria estable debido a su corta longitud, este factor no puede

descartarse. Es posible que el entorno oleoso de la formulación vacunal utilizada en nuestro caso o el contexto fisiológico del ratón afecten la conformación del péptido y esto influya en su mimética molecular^{68,116,117}. Además, en nuestra formulación vacunal, el péptido se encuentra interactuando con el *carrier* BLS, lo que podría afectar la estructura secundaria de la quimera y por ende la exposición del péptido.

Otra dificultad a superar de los péptidos miméticos de glicanos es su baja inmunogenicidad. Se han reportado casos donde los péptidos miméticos han generado respuestas inmunológicas cruzadas contra el antígeno original, pero estas han sido débiles. Como ejemplo se puede citar el caso del péptido mimético de un polisacárido de *Shigella flexneri*, el cual logró demostrar mimética inmunológica. Sin embargo, se requirieron varias inmunizaciones para lograr la respuesta inmune cruzada deseada, indicando una baja inmunogenicidad del péptido¹¹⁸.

Por otro lado, se han reportado estudios donde el título de Ac de isotipo IgM reactivos contra glicanos inducidos por miméticos multivalentes fue similar al inducido por los respectivos glicanos sintéticos multivalentes. Este tipo de Ac tiene una vida media corta y son de baja afinidad. Una respuesta inmune del tipo IgM es inadecuada para combatir un tumor; la inducción de una respuesta inmune robusta y de larga vida media depende de las rutas dependientes de células T⁴⁸. Un ejemplo de esta situación lo constituye el caso de la inmunización con un péptido mimético de LeY, en donde la respuesta IgG contra este antígeno fue baja en comparación con la respuesta IgM, emulando el patrón de respuesta humoral a carbohidratos sintéticos¹¹¹. Esto se correlacionaría con lo observado en la Figura 3.2 donde la respuesta específica para GD2 observada en el ratón 3 mostró ser mayoritariamente de isotipo IgM.

Otro caso donde se obtuvo baja inmunogenicidad lo constituye el de un péptido mimético de un polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, elegido por su alta afinidad de unión al Ac contra este carbohidrato. Cuando se utilizó para inmunizar ratones generó una respuesta cruzada débil contra el glicano, los Ac reactivos contra el mismo constituían una fracción pequeña de los Ac anti-péptido producidos¹²⁵. Esto genera cierta dificultad al momento de evaluar la respuesta inmune a nivel experimental, ya que se deben utilizar diluciones altas de los sueros y esto puede acarrear un pegado inespecífico de los Ac; situación que se refleja en nuestros ensayos.

Teniendo en cuenta estos casos, se decidió evaluar un segundo esquema de inmunización, con más cantidad de inmunógeno y mayor número de inmunizaciones. Sin embargo, como se explicó anteriormente, estos experimentos no tuvieron una respuesta satisfactoria. Se ha reportado que aunque cierta cantidad de inmunógeno es necesaria para romper la tolerancia a antígeno propios, a muy altas concentraciones de antígeno las proteínas pueden ser captadas por células B no específicas, las cuales constituyen el mayor número de células positivas para MHC de clase II. Con el tiempo, estas células B pueden presentar el antígeno peptídico a células T específicas, generando una disminución de la actividad de células T e induciendo tolerancia¹²⁴.

El gran problema con los miméticos seleccionados mediante bibliotecas de fagos es que su respuesta inmune sólo se evalúa luego de seleccionar un péptido para continuar los experimentos. Es por eso que muchas veces, sobre todo al seleccionarse péptidos con mimética inmunológica pero baja inmunogenicidad, se utilizan distintas estrategias para aumentar la habilidad de los miméticos de glicanos para inducir Ac reactivos con títulos más altos y mayores constantes de asociación⁶⁶.

Una estrategia para mejorar el desarrollo de miméticos de glicanos se basa en su poliespecificidad. Se ha demostrado que muchas veces el mismo mimético puede ser reconocido por diferentes Ac o lectinas que reconocen carbohidratos. De esta manera, la utilización de varios Ac aseguraría la selección de un mimético que represente al carbohidrato en más aspectos que sólo el estructural¹²⁶. Sería interesante evaluar si los péptidos miméticos de GD2 y SLeX son reconocidos por otros Ac específicos para esos glicanos, analizando también los candidatos que no fueron seleccionados.

Otra estrategia incluye el mejoramiento de la unión entre el péptido y el Ac, para maximizar interacciones particulares entre las cadenas pesadas y livianas del Ac, poniendo el énfasis en mantener los contactos críticos entre ellos. Esta alternativa necesita definir la configuración nativa del carbohidrato reconocido por el Ac para entender las bases de la especificidad de antígeno y la utilización de técnicas de ingeniería reversa basada en estructura, método que se detalló en la sección Introducción^{66,111}.

En la búsqueda para aumentar la fidelidad de los miméticos y su capacidad de inducir Ac reactivos con títulos más altos y mayores constantes de asociación, el grupo de Kieber Emmons utilizó una estrategia basada en la mejora del patrón de puentes de

H que se establecen entre el péptido mimético y el Ac de selección. De esta manera, se introducen sustituciones de aminoácidos que buscan incrementar la homología con las interacciones existentes entre el ligando azucarado y el Ac. De esta experiencia surge el péptido mejorado P10s el cual mimetiza los gangliósidos GD2 y GD3. El mismo demostró inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*, además de lograr una repuesta con mayor título de Ac contra los glicanos en comparación con el péptido mimético original seleccionado mediante una biblioteca de fagos⁶⁶.

Considerando que los péptidos GdC y SxA tienen mimética antigénica, esta estrategia se podría utilizar para intentar mejorar la unión con los respectivos Ac y evaluar si eso logra mejorar la mimética inmunológica. Para esto se necesitaría contar con la estructura cristalizada de los Ac y un modelado de la estructura de los glicanos.

El hecho de no poder detectar una respuesta inmune contra los glicanos podría no sólo deberse a una ausencia o una muy débil mimética inmunológica. Podría haber otros factores en el diseño de las formulaciones vacunales o en el esquema de inmunización que estén dificultando que el péptido genere respuesta inmune. Sería muy interesante poder realizar un ensayo de ELISA desafiando los sueros contra el péptido sintético sólo. De manera de dilucidar si efectivamente se generó una respuesta inmune contra el péptido y el problema está en la reactividad cruzada contra el glicano.

Como se explicó anteriormente, además de las propiedades intrínsecas de los péptidos miméticos, hay otros factores a tener en cuenta en el diseño de estas formulaciones vacunales. Uno de ellos es la elección del *carrier*. La conjugación de una proteína carrier puede modificar el perfil de inmunoglobulinas al mediar una respuesta dependiente de células T con reactividad cruzada hacia el glicano¹²⁴. La elección de BLS como *carrier* está basada en su alta inmunogenicidad, su capacidad de generar respuestas humorales y celulares y la posibilidad de exponer diez copias del péptido mimético en cuestión⁹³. Para evaluar si se generó una respuesta inmune contra BLS, los sueros de todos los ensayos fueron incubados en un ELISA contra placas sensibilizadas con BLS nativa. En todos los casos se encontraron altos títulos de Ac anti-BLS).

Sin embargo, una respuesta inmunológica muy fuerte contra esta proteína podría disminuir la respuesta específica contra el glicano⁴⁸. Esto podría haber sucedido en las inmunizaciones con los péptidos miméticos, donde el tamaño relativo de los péptidos en relación a BLS es pequeño y donde la respuesta inmune deseada (con reactividad

cruzada contra el glicano) constituye sólo un porcentaje dentro de la respuesta específica contra el péptido en sí.

Otro factor a tener en cuenta es el *linker* que une al péptido con el *carrier*, la identidad de esta secuencia es muy relevante. El *linker* impide obstáculos estéricos. Además, aumenta la exposición de los epitopes antigénicos en la superficie de la vacuna para aumentar su efectividad. Sin embargo, en ciertas circunstancias, estas secuencias podrían generar Ac anti-*linker* que suprimirían la respuesta IgG contra los antígenos azucarados. Un ejemplo de esta situación se observó en un vacuna compuesta por un tetrasacárido de LeY conjugado a KLH mediante un linker 4-(maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato. Se comprobó que este candidato vacunal reprimía la respuesta IgG contra LeY observada en otros candidatos y generaba una fuerte respuesta IgG contra el *linker*¹²⁷.

En nuestro caso, la secuencia espaciadora estaba compuesta por tres glicinas; aunque no se evaluó la respuesta inmune generada contra este *linker*, es poco probable que este factor esté influyendo negativamente en la inmunización.

Aunque una secuencia espaciadora muy larga podría generar respuesta inmune contra ella, una muy corta podría generar impedimentos estéricos. En el caso de la quimera SxA, la secuencia del péptido interactuaría con la de BLS modificando el plegamiento de la proteína. Como se explicó en la Discusión del Capítulo 2, un *linker* más largo podría resolver esta dificultad.

Una estrategia de mejoramiento de vacunas basadas en miméticos de glicanos es la de generar formulaciones vacunales multivalentes, con los péptidos expuestos como motivos repetidos, simulando la estructura que adoptan los glicanos en la biología tumoral¹¹¹. Las células tumorales suelen contener varios carbohidratos expresados en filas repetidas formando racimos o *clusters*⁴⁸.

Algunos ejemplos de vacunas de carbohidratos comprueban que esta estrategia es exitosa. El grupo de Danishefsky probó que vacunas multivalentes, donde los antígenos Tn, TF o STn se presentaban por triplicado en aminoácidos adyacentes, mostraron niveles aumentados de Ac cuando se compararon con sus análogos monoméricos¹²⁸. De hecho, la vacuna con el glicano TF fue evaluada en un ensayo clínico en pacientes con cáncer de próstata obteniendo resultados prometedores¹²⁹.

El fundamento de esta estrategia es que las células B reconocen patrones tales como la estructura repetitiva del lipopolisacárido bacteriano; es por eso que los antígenos monoméricos que están usualmente accesibles a estas células son, en general, antígenos propios. Los péptidos multivalentes desdibujan las distinciones entre las respuestas dependientes e independientes de células T. Por esto, péptidos miméticos sintetizados como *clusters* y formas multivalentes, podrían ser antígenos e inmunógenos superiores, generando respuestas inmunes con reactividad cruzada con la presentación nativa de carbohidratos bacteriales o tumorales¹²⁴. Esta podría ser una estrategia interesante para mejorar las formulaciones vacunales de los péptidos miméticos de GD2 y SLeX.

Conclusión

Capítulo

III

En este capítulo se evaluó la capacidad de las quimeras GdC y SxA de generar una respuesta inmune contra los glicanos GD2 y SLeX en modelos murinos. Se evaluaron dos esquemas de inmunización distintos en tres cepas de ratones con distinto haplotipo de MHC. En el caso de la quimera GdC, sólo el suero de uno de los ratones de la cepa C57 logró reconocer al gangliósido GD2 puro en un ELISA y logró unirse a una línea celular tumoral con alta expresión del antígeno. Sin embargo, este resultado no se pudo volver a replicar en experimentos posteriores. Con respecto a la quimera SxA, sólo los sueros de dos ratones de la cepa CF1 lograron reconocer una línea celular tumoral positiva para SLeX. Se deben realizar otros ensayos para corroborar este resultado.

Aunque los péptidos habían mostrado mimética antigénica, no lograron mostrar una mimética inmunológica robusta en las condiciones evaluadas. El fenómeno de mimética inmunológica es muy complejo y no se encuentra bien estudiado. Aun así, se detallan varias estrategias para mejorar formulaciones vacunales basadas en péptidos miméticos de glicanos, de manera de optimizar su mimética inmunológica.

Conclusión final y perspectivas a futuro

Utilizando Ac específicos contra glicanos como agentes de selección sobre una biblioteca de fagos que expresa todas las variantes posibles de dodecapéptidos, en este trabajo se buscó seleccionar péptidos miméticos de los glicanos GD2, SLeX, PSGL-1, LeA, LeX y STn. De esta manera, se lograron identificar péptidos capaces de ser reconocidos por el Ac anti-GD2, el Ac anti-SLeX, el Ac anti-PSGL-1 y el Ac anti-LeA. De esta primera serie de péptidos se logró seleccionar 4 candidatos para GD2, 2 para SLeX, 4 para PSGL-1 y 7 para LeA que lograron demostrar, en mayor o menor medida, mimética antigénica con los glicanos.

Las secuencias de los candidatos miméticos de GD2 y SLeX, denominadas GdC y SxA respectivamente, fueron fusionadas a la proteína *carrier* BLS generándose dos proteínas quiméricas. La quimera GdC logró ser expresada y purificada, corroborándose su mimética antigénica con el gangliósido GD2. La quimera SxA logró ser expresada en el modelo bacteriano, pero debido a que se encontró en cuerpos de inclusión y el proceso de renaturalización no fue exitoso, se optó por evaluar dos formulaciones de la misma: la quimera agregada por un lado y la quimera en 4M urea por el otro, ambas en *buffer* PBS. A juzgar por el reconocimiento del Ac de selección observado en el ensayo de Western Blot, esta quimera sólo mantuvo su mimética antigénica con el carbohidrato SLeX en condiciones desnaturalizantes. Teniendo en cuenta el resultado obtenido en el modelado de la estructura secundaria, esto se debería a formando parte de la quimera, el péptido no se expone sino que se asocia a estructuras internas de la proteína BLS.

Por último, se evaluó la capacidad de la quimera GdC y de las dos formulaciones de la quimera SxA de generar una respuesta inmune con reactividad cruzada hacia los glicanos de interés. Para ello se ensayaron dos protocolos distintos de inmunización en tres cepas de ratones con distinto haplotipo de MHC: C57, BALB/c y CF1. En el caso de la quimera GdC, sólo se pudo detectar respuesta contra GD2 en el suero de un ratón C57 utilizando el protocolo 1 de inmunización, mediante ELISA contra el gangliósido puro y mediante citometría de flujo contra una línea celular positiva para GD2. Sin embargo este resultado no pudo ser replicado con la misma intensidad en otros ensayos de inmunización. Por otro lado, con respecto a la quimera SxA, sólo se logró obtener una respuesta humoral específica en dos ratones de la cepa CF1 inmunizados utilizando el protocolo 1 y la quimera agregada, demostrando que Ac presentes en el suero de los mismos lograron reconocer células tumorales positivas para SLeX.

Sería interesante realizar otros ensayos con los sueros que mostraron respuesta contra los glicanos, de manera de corroborar los resultados obtenidos, tales como inmunohistoquímicas contra muestras de tumores que expresen estos glicanos. Además de la evaluación de la respuesta humoral en estos sueros, sería interesante medir la capacidad de estos sueros de generar toxicidad celular mediante ADCC y CDC, ya que esto constituye un paso previo a la evaluación de la capacidad antitumoral de las formulaciones vacunales.

El fenómeno de mimética inmunológica es muy complejo y se encuentra en la actualidad en un proceso de evaluación de su utilidad como estrategia terapéutica. En este punto se han publicado casos exitosos relativos a péptidos miméticos de glicanos⁷⁴ y otros que han demostrado mimética antigénica, y que fallan a la hora de generar respuestas inmunes fuertes con reactividad cruzada hacia el glicano de interés^{116,117}. En este trabajo no se alcanzó a realizar la evaluación de la respuesta inmune presente en los sueros de los ratones contra el péptido sintético en un ensayo de ELISA. Se espera poder contar con este reactivo en el futuro para poder determinar si la inmunización fue exitosa y el problema se encuentra en la mimética inmunológica de los péptidos, o si es necesario modificar la formulación vacunal, el protocolo de inmunización u otras condiciones para optimizar la respuesta inmune.

Sería interesante retomar los candidatos a miméticos de PSGL-1, fusionar su secuencia a BLS y realizar inmunizaciones para comprobar si poseen mimética inmunológica y pueden ser utilizados como inmunoterapias antitumorales. Asimismo, se podría realizar este camino con los otros candidatos a miméticos de GD2 y SLeX que no fueron elegidos. Sobre todo en el caso de SLeX, donde el candidato SxB mostró un plegamiento teórico óptimo y podría superar las dificultades en la purificación observadas para SxA.

Esta es la primera vez que se utiliza este diseño experimental para el desarrollo de inmunoterapias antitumorales basadas en péptidos miméticos de glicanos en nuestro país. Aunque las inmunizaciones no hayan arrojado resultados satisfactorios concluyentes, esta experiencia sirvió para comprender mejor estos procesos de manera de optimizar, en el futuro, estrategias terapéuticas similares.

Anexo

Mix digestión del plásmido

1 µg de plásmido
 5 µl de buffer (NEB)
 0,5 µl de Afl II, 10 unidades (NEB)
 1 µl Nsi I, 10 unidades (NEB)
 H2O hasta Vf 50 µl

Incubación ON a 37°C

Tabla A1: condiciones de digestión del plásmido

Mix ligación

2 µl de buffer T4 DNA ligasa (NEB)
 120 ng de plásmido digerido
 14,2 ng de las secuencias sintéticas de los péptidos
 1 µl de T4 DNA ligasa (NEB)
 H2O hasta Vf 20 µl

Incubación ON a 4°C

Tabla A2: condiciones de ligación

Mix Colony PCR

18 µl de platinum PCR supermix (Invitrogen)
 1 µl de *primer Fw* (0,5 µM)
 1 µl de *primer Rv* (0,5 µM)
 1 µl molde

Tabla A3: mezcla de *Colony* PCR

Primer	Secuencia
Fw GDc	TGGATGAGGCTCTGAATCTG
Fw SxA	ACGGCTATTTGGTGGCTGCG
Fw promotor T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Rv terminador T7	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Tabla A4: *primers* utilizados en la *Colony* PCR

1 min de desnaturalización inicial a 94°C
 1 min a 94°C
 30 seg a 55°C } 35 ciclos
 2 min a 72°C
 5 min de extensión final a 72°C

Tabla A5: ciclado de *Colony* PCR

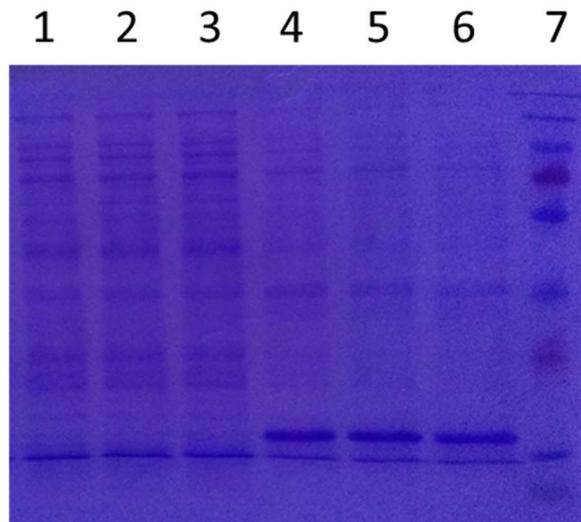


Figura A1: SDS-PAGE 12%, inducción de la quimera SxA a 16°C. **1:** FS, 1 mM IPTG. **2:** FS, 0.5 mM IPTG. **3:** FS, 0.1 mM IPTG. **4:** FI, 1 mM IPTG. **5:** FI, 0.5 mM IPTG. **6:** FI, 0.1 mM IPTG. **7:** Marcador de peso molecular (PageRuler, Invitrogen).

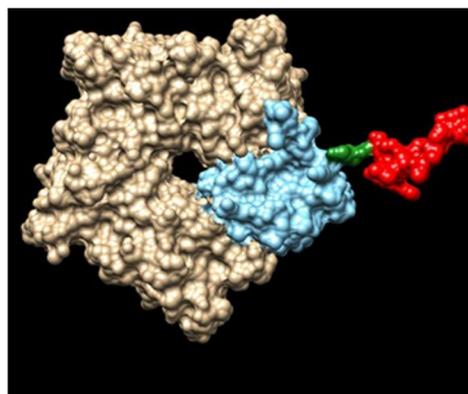


Figura A2: modelado de la estructura tridimensional teórica de la quimera SxB. La sección de color celeste corresponde a una subunidad del decámero. El péptido SxB se encuentra resaltado en rojo, mientras que el *linker* de glicinas se detalla en verde.

Agradecimientos

Bibliografía

1. Gomez, D. E. & Alonso, D. F. *Introducción a la oncología molecular*. (Editorial Universidad Nacional de Quilmes, 1998).
2. Bal de Kier Joffé, E., Puricelli, L. & Alonso, D. F. *Biología tumoral: claves celulares y moleculares del cáncer*. (Eudeba, Bs. As., 2008).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
4. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine* (2013). doi:10.1038/nm.3394
5. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.11.001
6. Vajaria, B. N. & Patel, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J* **34**, 147–156 (2017).
7. Varki, A., Kannagi, R., Toole, B. & Stanley, P. Glycosylation Changes in Cancer. in *Essentials of Glycobiology* (eds. rd et al.) 597–609 (2015). doi:10.1101/glycobiology.3e.047
8. Christiansen, M. N. *et al.* Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* (2014). doi:10.1002/pmic.201300387
9. Häuselmann, I. & Borsig, L. Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis. *Front. Oncol.* (2014). doi:10.3389/fonc.2014.00028
10. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**, 540–555 (2015).
11. Li, X., Wang, X., Tan, Z., Chen, S. & Guan, F. Role of Glycans in Cancer Cells Undergoing Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front. Oncol.* (2016). doi:10.3389/fonc.2016.00033
12. Blanas, A., Sahasrabudhe, N. M., Rodríguez, E., van Kooyk, Y. & van Vliet, S. J. Fucosylated Antigens in Cancer: An Alliance toward Tumor Progression, Metastasis, and Resistance to Chemotherapy. *Front. Oncol.* (2018). doi:10.3389/fonc.2018.00039
13. Rabu, C., McIntosh, R., Jurasova, Z. & Durrant, L. Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies. *Futur. Oncol* **8**, 943–960 (2012).
14. Borsig, L. Selectins in cancer immunity. *Glycobiology* (2017). doi:10.1093/glycob/cwx105

15. Kappelmayer, J. & Nagy, B. The interaction of selectins and PSGL-1 as a key component in thrombus formation and cancer progression. *BioMed Research International* (2017). doi:10.1155/2017/6138145
16. Chen, M. & Geng, J. G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (2006). doi:10.1007/s00005-006-0010-6
17. Natoni, A., Macauley, M. S. & O'Dwyer, M. E. Targeting Selectins and Their Ligands in Cancer. *Front. Oncol.* (2016). doi:10.3389/fonc.2016.00093
18. Tinoco, R., Otero, D. C., Takahashi, A. A. & Bradley, L. M. PSGL-1: A New Player in the Immune Checkpoint Landscape. *Trends in Immunology* (2017). doi:10.1016/j.it.2017.02.002
19. Schultz, M. J., Swindall, A. F. & Bellis, S. L. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer Metastasis Rev.* (2012). doi:10.1007/s10555-012-9359-7
20. Nakagoe, T. *et al.* Expression of Lewisa, sialyl Lewisa, Lewis(x) and sialyl Lewis(x) antigens as prognostic factors in patients with colorectal cancer. *Can. J. Gastroenterol.* (2000). doi:10.1155/2000/149851
21. Chugh, S. *et al.* Pathobiological implications of mucin glycans in cancer: Sweet poison and novel targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2015). doi:10.1016/j.bbcan.2015.08.003
22. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. & Kimura, N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science* (2004). doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03219.x
23. Li, J. *et al.* The correlation between the expression of ABH and Lewis A histo-blood group antigens and the biological behavior of primary pulmonary adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, e19066–e19066 (2009).
24. Pour, P. M. *et al.* Expression of Blood Group-related Antigens ABH, Lewis A, Lewis B, Lewis X, Lewis Y, and CA 19–9 in Pancreatic Cancer Cells in Comparison with the Patient's Blood Group Type. *Cancer Res.* (1988).
25. Zhang, S. *et al.* Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int. J. Cancer* (1997).

- doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970926)73:1<50::AID-IJC9>3.0.CO;2-0
26. Tuccillo, F. M. *et al.* Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *Biomed Res Int* **2014**, 742831 (2014).
 27. Munkley, J. The Role of Sialyl-Tn in Cancer. *Int J Mol Sci* **17**, 275 (2016).
 28. Ju, T. *et al.* Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics - Clin. Appl.* (2013). doi:10.1002/prca.201300024
 29. Yu, R. K., Tsai, Y.-T., Ariga, T. & Yanagisawa, M. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *J. Oleo Sci.* (2011). doi:10.5650/jos.60.537
 30. Lopez, P. H. & Schnaar, R. L. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology* (2009). doi:10.1016/j.sbi.2009.06.001
 31. Yanagisawa, M., Yoshimura, S. & Yu, R. K. Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells. *ASN Neuro* **3**, (2011).
 32. Dobrenkov, K., Ostrovnaya, I., Gu, J., Cheung, I. Y. & Cheung, N. K. Oncotargets GD2 and GD3 are highly expressed in sarcomas of children, adolescents, and young adults. *Pediatr Blood Cancer* **63**, 1780–1785 (2016).
 33. Sait, S. & Modak, S. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **17**, 889–904 (2017).
 34. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (80-.)*. **331**, 1565–1570 (2011).
 35. Hogan, S. A., Levesque, M. P. & Cheng, P. F. Melanoma Immunotherapy: Next-Generation Biomarkers. *Front Oncol* **8**, 178 (2018).
 36. Hu, Z. I. & McArthur, H. L. Immunotherapy in Breast Cancer: the New Frontier. *Curr Breast Cancer Rep* **10**, 35–40 (2018).
 37. Tsiara, A. *et al.* Implementation of immunotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Transl Med* **6**, 144 (2018).
 38. Morrison, A. H., Byrne, K. T. & Vonderheide, R. H. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends Cancer* **4**, 418–428 (2018).
 39. Dolcetti, R., De Re, V. & Canzonieri, V. Immunotherapy for Gastric Cancer: Time for a Personalized Approach? *Int J Mol Sci* **19**, (2018).

40. Fakhrejehani, F. *et al.* Immunotherapies for bladder cancer: a new hope. *Curr Opin Urol* **25**, 586–596 (2015).
41. Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology* (2010). doi:10.1038/nri2747
42. Yang, Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* **125**, 3335–3337 (2015).
43. Wang, M., Yin, B., Wang, H. Y. & Wang, R. F. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **6**, 1265–1278 (2014).
44. van den Bulk, J., Verdegaal, E. & de Miranda, N. Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours. *Open Biol.* **8**, 180037 (2018).
45. Dahlén, E., Veitonmäki, N. & Norlén, P. Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Ther. Adv. Vaccines Immunother.* (2018). doi:10.1177/2515135518763280
46. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. & Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**, 909–915 (2004).
47. Tran, T. *et al.* Therapeutic cancer vaccine: building the future from lessons of the past. *Semin Immunopathol* **5**, (2018).
48. Wei, M. M., Wang, Y. S. & Ye, X. S. Carbohydrate-based vaccines for oncotherapy. *Medicinal Research Reviews* (2018). doi:10.1002/med.21493
49. Melief, C. J. M., Van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F. & Van Der Burg, S. H. Therapeutic cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation* (2015). doi:10.1172/JCI80009
50. Seidel, U. J. E., Schlegel, P. & Lang, P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front. Immunol.* (2013). doi:10.3389/fimmu.2013.00076
51. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S. & Sondel, P. M. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology* (2015). doi:10.3389/fimmu.2015.00368
52. Segatori, V. *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by active immunotherapy based on racotumomab in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* (2018). doi:10.1007/s00262-018-2188-y

53. Sabbatini, P. J. *et al.* Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewis(y)-protein conjugate vaccine: a phase 1 trial. *Int. J. Cancer* (2000).
54. Kirkwood, J. M. *et al.* High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: Results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J. Clin. Oncol.* (2001). doi:10.1200/JCO.2001.19.9.2370
55. Eggermont, A. M. *et al.* EORTC 18961: Post-operative adjuvant ganglioside GM2-KLH21 vaccination treatment vs observation in stage II (T3-T4N0M0) melanoma: 2nd interim analysis led to an early disclosure of the results. *ASCO Meet. Abstr.* (2008).
56. Holmberg, L. A. & Sandmaier, B. M. Vaccination with Theratope® (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Rev. Vaccines* (2004). doi:10.1586/14760584.3.6.655
57. Krug, L. M. *et al.* Vaccination of small cell lung cancer patients with polysialic acid or N-propionylated polysialic acid conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin. Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0101
58. Krug, L. M. *et al.* Vaccination of patients with small-cell lung cancer with synthetic fucosyl GM-1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin. *Clin. Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0482
59. Ragupathi, G. *et al.* Consistent Antibody Response against Ganglioside GD2 Induced in Patients with Melanoma by a GD2 Lactone-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine plus Immunological Adjuvant QS-21. *Clin. Cancer Res.* (2003). doi:10.1097/00008390-199708001-00023
60. Gilewski, T. *et al.* Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin. Cancer Res.* (2000).
61. Sawada, R. *et al.* Human monoclonal antibodies to sialyl-Lewis (CA19.9) with potent CDC, ADCC, and antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* (2011). doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2640
62. Ragupathi, G. *et al.* A preclinical study comparing approaches for augmenting the immunogenicity of a heptavalent KLH-conjugate vaccine against epithelial cancers. *Cancer Immunol. Immunother.* (2003). doi:10.1007/s00262-003-0399-2

63. Sabbatini, P. J. *et al.* Pilot study of a heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *Clin. Cancer Res.* (2007). doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2949
64. Fukuda, M. N. Peptide-displaying phage technology in glycobiology. *Glycobiology* **22**, 318–325 (2012).
65. Riemer, A. B. & Jensen-Jarolim, E. Mimotope vaccines: Epitope mimics induce anti-cancer antibodies. *Immunology Letters* (2007). doi:10.1016/j.imlet.2007.07.008
66. Kieber-Emmons, T., Saha, S., Pashov, A., Monzavi-Karbassi, B. & Murali, R. Carbohydrate-mimetic peptides for pan anti-tumor responses. *Front Immunol* **5**, 308 (2014).
67. Pashov, A., Perry, M., Dyar, M., Chow, M. & Kieber-Emmons, T. Carbohydrate mimotopes in the rational design of cancer vaccines. *Curr Top Med Chem* **5**, 1171–1185 (2005).
68. Agostino, M. *et al.* Carbohydrate-mimetic peptides: structural aspects of mimicry and therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 211–224 (2011).
69. Bolesta, E. *et al.* DNA vaccine expressing the mimotope of GD2 ganglioside induces protective GD2 cross-reactive antibody responses. *Cancer Res.* (2005). doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2164
70. Brämswig, K. H. *et al.* Immunization with mimotopes prevents growth of carcinoembryonic antigen-positive tumors in BALB/c mice. *Clin. Cancer Res.* (2007). doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0692
71. Popa, I. *et al.* GD3-replica peptides selected from a phage peptide library induce a GD3 ganglioside antibody response. *FEBS Lett* **580**, 1398–1404 (2006).
72. Monzavi-Karbassi, B. *et al.* Reduction of Spontaneous Metastases through Induction of Carbohydrate Cross-Reactive Apoptotic Antibodies. *J. Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.174.11.7057
73. Monzavi-Karbassi, B. *et al.* Immunization with a carbohydrate mimicking peptide augments tumor-specific cellular responses. *Int. Immunol.* (2001).
74. Hutchins, L. F. *et al.* Targeting tumor-associated carbohydrate antigens: a phase I study of a carbohydrate mimetic-peptide vaccine in stage IV breast cancer

- subjects. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.21959
75. Cunto-Amesty, G. *et al.* Directing the Immune Response to Carbohydrate Antigens. *J. Biol. Chem.* (2001). doi:10.1074/jbc.M103257200
 76. Vázquez, A. M. *et al.* Racotumomab: an anti-idiotypic vaccine related to N-glycolyl-containing gangliosides – preclinical and clinical data. *Front. Oncol.* (2012). doi:10.3389/fonc.2012.00150
 77. Cacciavillano, W. *et al.* A Phase I Study of the Anti-Idiotypic Vaccine Racotumomab in Neuroblastoma and Other Pediatric Refractory Malignancies. *Pediatr. Blood Cancer* (2015). doi:10.1002/pbc.25631
 78. Rahbarnia, L. *et al.* Evolution of phage display technology: from discovery to application. *J Drug Target* **25**, 216–224 (2017).
 79. Torregrossa, P. *et al.* Selection of poly- α 2,8-sialic acid mimotopes from a random phage peptide library and analysis of their bioactivity. *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M403935200
 80. Wang, A. *et al.* Induction of anti-EGFR immune response with mimotopes identified from a phage display peptide library by panitumumab. *Oncotarget* **7**, 75293–75306 (2016).
 81. Yang, L. *et al.* Active immunization with Tocilizumab mimotopes induces specific immune responses. *BMC Biotechnol* **15**, 46 (2015).
 82. Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J. & Laustsen, A. H. Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins (Basel)* **10**, (2018).
 83. Scott, J. K. & Smith, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science (80-.).* **249**, 386–390 (1990).
 84. Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. & Dower, W. J. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6378–6382 (1990).
 85. Devlin, J. J., Panganiban, L. C. & Devlin, P. E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science (80-.).* **249**, 404–406 (1990).
 86. Russel, M., Linderoth, N. A. & Sali, A. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* **192**, 23–32 (1997).
 87. Rodi, D. J. & Makowski, L. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 87–93 (1999).

88. Oldenburg, K. R., Loganathan, D., Goldstein, I. J., Schultz, P. G. & Gallop, M. a. Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1992). doi:10.1073/pnas.89.12.5393
89. Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T. & Pastan, I. Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene* (1993). doi:10.1016/0378-1119(93)90151-R
90. Lou, Q. & Pastan, I. A Lewis(y) epitope mimicking peptide induces anti-Lewis(y) immune responses in rabbits and mice. *J. Pept. Res.* (1999). doi:10.1034/j.1399-3011.1999.00025.x
91. Zylberman, V. *et al.* High order quaternary arrangement confers increased structural stability to Brucella sp. lumazine synthase. *J Biol Chem* **279**, 8093–8101 (2004).
92. Braden, B. C., Velikovsky, C. A., Cauerhff, A. A., Polikarpov, I. & Goldbaum, F. A. Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from Brucella abortus. *J Mol Biol* **297**, 1031–1036 (2000).
93. Laplagne, D. A. *et al.* Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins* **57**, 820–828 (2004).
94. Sciutto, E. *et al.* Brucella spp. lumazine synthase: A novel antigen delivery system. *Vaccine* (2005). doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.043
95. Mejias, M. P. *et al.* Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *J Immunol* **191**, 2403–2411 (2013).
96. Alvarez, P. *et al.* Tandem repeats of the extracellular domain of Matrix 2 influenza protein exposed in Brucella lumazine synthase decameric carrier molecule induce protection in mice. *Vaccine* **31**, 806–812 (2013).
97. Bellido, D. *et al.* Brucella spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system. *Vaccine* **27**, 136–145 (2009).
98. Estein, S. M. *et al.* The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against Brucella ovis infection in rams. *Vaccine* **27**, 6704–6711 (2009).
99. Clause, M. *et al.* Polymeric antigen BLSOmp31 in aluminium hydroxide induces serum bactericidal and opsonic antibodies against Brucella canis in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* **184**, 36–41 (2017).

100. Clause, M. *et al.* The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine* **31**, 6129–6135 (2013).
101. Rosas, G. *et al.* *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes Infect* **8**, 1277–1286 (2006).
102. Fragoso, G. *et al.* Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol* **18**, 1067–1076 (2011).
103. Berguer, P. M. *et al.* A polymeric protein induces specific cytotoxicity in a TLR4 dependent manner in the absence of adjuvants. *PLoS One* **7**, e45705 (2012).
104. Velikovskiy, C. A. *et al.* *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun* **71**, 5750–5755 (2003).
105. Menendez, A. & Scott, J. K. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry* (2005). doi:10.1016/j.ab.2004.09.048
106. Vodnik, M., Zager, U., Strukelj, B. & Lunder, M. Phage display: Selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules* (2011). doi:10.3390/molecules16010790
107. Brammer, L. A. *et al.* A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site. *Anal. Biochem.* (2008). doi:10.1016/j.ab.2007.10.015
108. Bresson, D. *et al.* Localization of the discontinuous immunodominant region recognized by human anti-thyroperoxidase autoantibodies in autoimmune thyroid diseases. *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M211930200
109. Janson, J. C. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition*. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition* (2011). doi:10.1002/9780470939932
110. Lundin, K. *et al.* Peptides isolated from random peptide libraries on phage elicit a neutralizing anti-HIV-1 response: Analysis of immunological mimicry. *Immunology* (1996). doi:10.1046/j.1365-2567.1996.d01-772.x

111. Cunto-Amesty, G., Luo, P., Monzavi-Karbassi, B. & Kieber-Emmons, T. Exploiting molecular mimicry: Defining rules of the game. *Int. Rev. Immunol.* (2001). doi:10.3109/08830180109043032
112. Cohn, M. Degeneracy, mimicry and crossreactivity in immune recognition. *Molecular Immunology* (2005). doi:10.1016/j.molimm.2004.09.010
113. Yang, H. *et al.* Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. in *Nature Genetics* (2011). doi:10.1038/ng.847
114. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* (2001). doi:10.1021/ac00073a005
115. Kato, H., Utsu, S., Chen, T. P. & Moriwaki, K. H-2 polymorphisms in outbred strains of mice. *Lab. Anim. Sci.* (1990).
116. Hafner, C. *et al.* Cross-reactivity of mimotopes with a monoclonal antibody against the high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) does not predict cross-reactive immunogenicity. *Melanoma Res.* (2005). doi:10.1097/00008390-200504000-00005
117. El Kasmi, K. C., Deroo, S., Theisen, D. M., Brons, N. H. C. & Muller, C. P. Crossreactivity of mimotopes and peptide homologues of a sequential epitope with a monoclonal antibody does not predict crossreactive immunogenicity. in *Vaccine* (1999). doi:10.1016/S0264-410X(99)00199-1
118. Borrelli, S., Hossany, R. B. & Pinto, B. M. Immunological evidence for functional rather than structural mimicry by a *Shigella flexneri* Y polysaccharide-mimetic peptide. *Clin. Vaccine Immunol.* (2008). doi:10.1128/CVI.00050-08
119. Calarese, D. A. *et al.* Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* (80-.). (2003). doi:10.1126/science.1083182
120. Menendez, A. *et al.* A peptide inhibitor of HIV-1 neutralizing antibody 2G12 is not a structural mimic of the natural carbohydrate epitope on gp120. *FASEB J.* (2007). doi:10.1096/fj.07-8983com
121. Hossany, B. R. *et al.* Design, synthesis, and immunochemical characterization of a chimeric glycopeptide corresponding to the *Shigella flexneri* Y O-polysaccharide and its peptide mimic MDWNMHAA. *Carbohydr. Res.* (2009).

- doi:10.1016/j.carres.2009.03.029
122. Pashov, A., Monzavi-Karbassi, B., Raghava, G. & Kieber-Emmons, T. Peptide mimotopes as prototypic templates of broad-spectrum surrogates of carbohydrate antigens for cancer vaccination. *Crit Rev Immunol* **27**, 247–270 (2007).
 123. Ohtaki, A., Kieber-Emmons, T. & Murali, R. Structure-Based Peptide Mimicry of Tumor-Associated Antigens. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* (2013). doi:10.1089/mab.2012.0076
 124. Monzavi-Karbassi, B., Cunto-Amesty, G., Luo, P. & Kieber-Emmons, T. Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. *Trends in Biotechnology* (2002). doi:10.1016/S0167-7799(02)01940-6
 125. Johnson, M. A., Rotondo, A. & Pinto, B. M. NMR studies of the antibody-bound conformation of a carbohydrate-mimetic peptide. *Biochemistry* (2002). doi:10.1021/bi011927u
 126. Pashov, A., Perry, M., Dyar, M., Chow, M. & Kieber-Emmons, T. Defining carbohydrate antigens as HIV vaccine candidates. *Curr Pharm Des* (2007). doi:10.2174/138161207779313678
 127. Buskas, T., Li, Y. & Boons, G. J. The immunogenicity of the tumor-associated antigen Lewisy may be suppressed by a bifunctional cross-linker required for coupling to a carrier protein. *Chem. - A Eur. J.* (2004). doi:10.1002/chem.200400074
 128. Kuduk, S. D. *et al.* Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer. *J. Am. Chem. Soc.* (1998). doi:10.1021/ja9825128
 129. Slovin, S. F. *et al.* Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: Clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* (2005). doi:10.1007/s00262-004-0598-5