



Universidad de La Habana

Facultad de Biología

Estudio a nivel molecular de la polirreactividad  
idiotípica y el reconocimiento de linfocitos B por el  
anticuerpo B7Y33

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor  
en Ciencias Biológicas

Autora: M. C. Tays Hernández García

Tutores: Dr. C. Cristina María Mateo de Acosta del Río

Dr. C. Rolando Pérez Rodríguez



Centro de Inmunología Molecular

La Habana

2011



*A mi mamá*



## **ABREVIATURAS MÁS FRECUENTES**

AcM: Anticuerpo monoclonal

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AcQ: Anticuerpo quimérico

CDR: Región determinante de la complementariedad

CDR H: CDR de la cadena pesada

Fc: Fragmento cristalizante del anticuerpo

Fc $\gamma$ R: Receptor del Fc de las IgG

FR: Región marco

HMS: Hipermutación somática

IVIg: Inmunoglobulinas intravenosas

J $\kappa$ : Segmento génico de unión de la cadena ligera *kappa*

J $\mu$ : Segmento génico de unión de la cadena pesada

KLH: *Keyhole Lympet Haemocyanin*

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

RCB: Receptor de antígeno de células B

SSTF: Solución salina tamponada con fosfatos

V $\kappa$ : Segmento génico variable de la cadena ligera *kappa*

V $\kappa$ : Región variable de la cadena ligera *kappa*

V $\mu$ : Segmento génico variable de la cadena pesada

VH: Región variable de la cadena pesada

VL: Región variable de la cadena ligera

---



**SÍNTESIS**

En el presente trabajo se hace un estudio de las bases moleculares que sustentan la polirreactividad idiotípica y el reconocimiento de linfocitos B por el anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  B7. El análisis inmunogenético de este, y otro anti-idiotipo  $\alpha$ , el 34B7, con similar multiespecificidad antigénica y reactividad con otras inmunoglobulinas, demostró que no comparten las mismas restricciones genéticas descritas para los anticuerpos naturales. Se obtienen variantes quiméricas del anticuerpo B7, con mutaciones en los CDRs de la cadena pesada y el Fc, así como anticuerpos quiméricos híbridos que contienen la región variable de la cadena pesada de una variante del B7, y de cadenas ligeras irrelevantes. La región variable de la cadena pesada es determinante en la amplia reactividad idiotípica de la variante mutada B7Y33, aunque la región variable de la cadena ligera la modula. Se demuestra la existencia de más de un sitio de unión a los diferentes anticuerpos dentro de la propia región variable del B7Y33, los cuales no coinciden con los responsables de su unión a los linfocitos B. A esta última interacción contribuyen las regiones variables y constante del anticuerpo, así como el Fc $\gamma$ RIIb sobre los linfocitos B. Se evidencia la capacidad del B7Y33 de potenciar la inmunogenicidad de IgMs autólogas reconocidas por él, para lo cual es importante la formación de inmunocomplejos entre el B7Y33 y estos anticuerpos. El reconocimiento de linfocitos de pacientes con desórdenes linfoproliferativos B por el B7Y33 sugiere las potencialidades terapéuticas de este anticuerpo en ese tipo de patologías.

---



---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Inmunogenética</b> .....	<b>7</b>
2.1.1 <i>Estructura de las inmunoglobulinas</i> .....	7
2.1.2 <i>Genes empleados en el ensamblaje de las regiones variables</i> .....	9
2.1.3 <i>Genes de línea germinal</i> .....	11
2.1.4 <i>Hipermutaciones somáticas</i> .....	12
<b>2.2 Actividad de reconocimiento de los anticuerpos</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 <i>Reconocimiento por la región variable</i> .....	14
2.2.1.1 Contribución de los aminoácidos al sitio de unión .....	14
2.2.1.2 Unión a múltiples ligandos .....	16
2.2.1.2.1 Autorreconocimiento .....	20
2.2.1.3 La teoría de la red idiotípica .....	21
2.2.1.4 Anticuerpos naturales.....	22
2.2.2 <i>Reconocimiento de la región constante de las IgG por receptores Fcγ</i> .....	24
2.2.2.1 Interacciones anticuerpo-FcγR.....	26
2.2.2.2 Glicosilación del anticuerpo y unión al FcγR .....	27
2.2.2.3 FcγRs e inmunidad adaptativa .....	28
<b>2.3 El FcγRIIb y la biología de la célula B</b> .....	<b>29</b>
2.3.1 <i>El FcγRIIb</i> .....	29
2.3.2 <i>Estrategias terapéuticas relacionadas con el FcγRIIb</i> .....	32
2.3.2.1 El FcγRIIb y las enfermedades malignas de células B.....	33
<b>2.4 Ingeniería de anticuerpos</b> .....	<b>34</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Medios de cultivo</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 Microorganismos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3 Hibridomas y líneas celulares</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4 Animales</b> .....	<b>40</b>
<b>3.5 Vectores plasmídicos</b> .....	<b>40</b>
<b>3.6 Oligonucleótidos</b> .....	<b>41</b>
3.6.1 <i>Oligonucleótidos para la síntesis del ADN complementario y la amplificación de las regiones variables por reacción en cadena de la polimerasa</i> .....	41
3.6.2 <i>Construcción de las variantes mutadas de la VHB7</i> .....	42
<b>3.7 Genes sintéticos</b> .....	<b>43</b>
<b>3.8 Anticuerpos monoclonales</b> .....	<b>43</b>
<b>3.9 Fragmentos de anticuerpos</b> .....	<b>44</b>
<b>3.10 Técnicas de uso corriente en Biología Molecular</b> .....	<b>44</b>

---

<b>3.11</b>	<b>Análisis inmunogenético .....</b>	<b>45</b>
3.11.1	<i>Identificación de los segmentos génicos V, D y J empleados en las regiones variables.....</i>	45
3.11.1.1	Análisis de las secuencias en las regiones de recombinación V-(D)-J....	45
3.11.2	<i>Agrupamiento de genes de la familia V<sub>H</sub>J558.....</i>	46
<b>3.12</b>	<b>Modelación de la estructura tridimensional de la región variable del B7Y33.</b>	<b>46</b>
<b>3.13</b>	<b>Construcción y expresión de los anticuerpos quiméricos B7, sus mutantes e híbridos.....</b>	<b>46</b>
<b>3.14</b>	<b>Acoplamiento de anticuerpos a biotina .....</b>	<b>48</b>
<b>3.15</b>	<b>Ensayos de interacción entre anticuerpos .....</b>	<b>48</b>
<b>3.16</b>	<b>Ensayos de interacción del B7Y33 con antígenos de naturaleza no inmunoglobulínica.....</b>	<b>49</b>
<b>3.17</b>	<b>Inoculación de ratones con las IgMs anti-gangliósidos y los AcQs.....</b>	<b>49</b>
<b>3.18</b>	<b>Ensayo de medición de anticuerpos específicos en el suero de los ratones.....</b>	<b>49</b>
<b>3.19</b>	<b>Citometría de flujo .....</b>	<b>50</b>
3.19.1	<i>Aislamiento de linfocitos de bazo de ratones BALB/c no inmunizados.....</i>	50
3.19.2	<i>Aislamiento de células mononucleares humanas.....</i>	50
3.19.3	<i>Reconocimiento de linfocitos B y líneas celulares .....</i>	51
3.19.4	<i>Expresión del FcγRII en líneas celulares de ratón.....</i>	51
3.19.5	<i>Ensayos de inhibición.....</i>	52
3.19.6	<i>Experimento de unión por complementariedad molecular .....</i>	53
<b>3.20</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Análisis inmunogenético de los AcMs B7 y 34B7 .....</b>	<b>55</b>
4.1.1	<i>Origen de los genes V<sub>K</sub> y V<sub>H</sub> de los AcMs B7 y 34B7.....</i>	55
4.1.2	<i>Análisis del CDR3 y el FR4.....</i>	59
4.1.3	<i>Agrupamiento de genes de la V<sub>H</sub> J558 .....</i>	60
<b>4.2</b>	<b>Diseño de variantes mutadas de la VHB7 .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Obtención de los AcQs B7 y las variantes mutadas B7Y33 y B7STK .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4</b>	<b>Influencia de las cadenas pesada y ligera del B7Y33 en su polirreactividad idiopática.....</b>	<b>65</b>
4.4.1	<i>Reactividad de los AcQs híbridos .....</i>	65
4.4.2	<i>Participación de los CDRs H del B7Y33 en su polirreactividad idiopática ....</i>	66
4.4.2.1	<i>Diseño de mutaciones en la VHB7Y33 basado en análisis bioinformático ....</i>	66
4.4.2.2	<i>Reactividad del B7Y33 y sus variantes mutadas frente a las IgMs anti-gangliósidos.....</i>	67
4.4.2.3	<i>Propiedad de autounión del B7Y33 y sus variantes mutadas.....</i>	68
<b>4.5</b>	<b>Reactividad del B7Y33 frente a variantes mutadas del AcQ P3 .....</b>	<b>69</b>

---

---

<b>4.6</b>	<b>Efecto inmunopotenciador del B7Y33.....</b>	<b>70</b>
4.6.1	<i>Respuesta de anticuerpos en ratones BALB/c inoculados con IgMs anti-gangliósidos y B7Y33.....</i>	70
4.6.2	<i>Importancia de la coinyección IgM/AcQ para la función inmunopotenciadora del B7Y33.....</i>	72
4.6.3	<i>Importancia de la interacción IgM/AcQ para el efecto de inmunopotenciación.....</i>	74
4.6.4	<i>Importancia de las células B-1 para el efecto de inmunopotenciación.....</i>	74
4.6.5	<i>Determinación de efecto “priming” en la capacidad inmunopotenciadora del B7Y33.....</i>	75
<b>4.7</b>	<b>Reconocimiento de linfocitos B.....</b>	<b>75</b>
4.7.1	<i>Reconocimiento del RCB por el B7Y33.....</i>	75
4.7.2	<i>Reconocimiento del FcγRII por el B7Y33.....</i>	77
4.7.3	<i>Participación de las regiones variable y constante del B7Y33 en su interacción con los linfocitos B.....</i>	81
4.7.4	<i>Reconocimiento de linfocitos de pacientes con desórdenes proliferativos de las células B por el B7Y33.....</i>	86
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
5.1	<b>La necesidad de un modelo recombinante para el estudio de las propiedades inmunoquímicas del AcM anti-idiotipo B7.....</b>	<b>87</b>
5.2	<b>AcMs B7 y 34B7:¿anticuerpos naturales?.....</b>	<b>87</b>
5.3	<b>La cadena pesada del AcM B7 en la interacción con otras inmunoglobulinas 91</b>	
5.4	<b>Efecto inmunopotenciador del B7Y33.....</b>	<b>93</b>
5.5	<b>Interacción B7Y33-célula B.....</b>	<b>96</b>
5.6	<b>Potencial terapéutico del B7Y33 a partir de la interacción con el FcγRIIb.....</b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>119</b>

---



## 1. INTRODUCCIÓN

La postulación de la teoría de la red idiotípica por Jerne (Jerne, 1974), introdujo el concepto de que la función de los anticuerpos sobrepasa la interacción con sus antígenos, e incluye las relaciones complejas que estos pueden establecer entre sí, de potencial relevancia para la regulación del sistema inmune (Winkler y cols., 1979; Shoenfeld, 2004). La existencia de anticuerpos anti-idiotipo  $\beta$ , con la habilidad de inhibir la unión del anticuerpo que le dio origen al antígeno nominal, y de mimetizarlo, se ha explotado ampliamente para el diseño de vacunas (Poskitt y cols., 1991; Betakova y cols., 1998). Sin embargo, los anticuerpos anti-idiotipo  $\alpha$ , los cuales no afectan esta unión antígeno-anticuerpo, no se han estudiado a profundidad.

Los gangliósidos, glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico, son componentes normales de la membrana plasmática de la mayoría de las células de mamíferos y se han asociado también con la transformación maligna (Marquina y cols., 1996; Malykh y cols., 2001; Kannagi y cols., 2008).

Diversas estrategias se han desarrollado para inducir anticuerpos específicos por estas moléculas poco inmunogénicas (Helling y cols., 1994; Helling y cols., 1995; Livingston y Ragupathi, 1997). En el Centro de Inmunología Molecular (CIM) se han obtenido diversos anticuerpos específicos por los gangliósidos, entre los que figuran los anticuerpos monoclonales (AcMs) P3 (Vázquez y cols., 1995), E1, A3, F6 (Alfonso y cols., 1995) y 14F7 (Carr y cols., 2000). Algunos de estos, en diferentes formulaciones, han sido capaces de inducir fuertes respuestas anti-idiotípicas en ratones (Vázquez y cols., 1998). De esta manera, se han aislado AcMs que se han comportado como  $\beta$ , o como  $\gamma$  (aquellos capaces de inhibir la interacción del anticuerpo que lo originó, con el antígeno nominal, pero no lo mimetizan), en dependencia de las especies en las cuales se han usado como inmunógenos para la obtención de anticuerpos anti-anti-idiotipo. El carácter de imagen interna o mímica antigénica solo se expresó en aquellas especies en las que los gangliósidos *N*-glicolilados no son antígenos propios (Vázquez y cols., 1998; Hernandez y cols., 2005).

Además, se han generado mediante la inmunización de animales con los anticuerpos anti-gangliósidos antes mencionados, AcMs anti-idiotipo  $\alpha$ , no específicos por el paratopo. Dos de ellos son los AcMs polirreactivos B7 y 34B7, de isotipo IgG2a e IgG1, respectivamente (Macías y cols., 1999). Estos se obtuvieron a partir de la inmunización de ratones BALB/c con el AcM E1, específico por el gangliósido *N*-acetil-GM2 (NeuAcGM2) (Alfonso y cols., 1995).

Desde el punto de vista inmunoquímico, ambos anticuerpos se clasifican como anti-idiotipos  $\alpha$ , pues no interfieren en la unión del AcM E1 al gangliósido referido.

Una propiedad sorprendente que distingue a los AcMs B7 y 34B7 es su polirreactividad idiotípica, al reconocer no solo al AcM E1 sino, además, a otros anticuerpos murinos específicos por gangliósidos, y sus anti-idiotipos (Portuondo, 1996; Macías y cols., 1999). Se comprobó que el AcM B7 se autorreconoce (Macías A., comunicación personal) y es capaz de interactuar con anticuerpos neonatales, descritos como altamente polirreactivos en la red idiotípica (Holmberg y cols., 1984a). No se conoce si los inmunocomplejos que estas interacciones puedan generar tienen algún papel biológico, aunque algunos autores han reseñado que los inmunocomplejos, en general, pueden activar células dendríticas y estimular la presentación antigénica a células T (Regnault y cols., 1999).

El empleo de proteínas de mieloma humano, así como fragmentos  $F(ab')_2$  obtenidos a partir de inmunoglobulinas del suero de donantes humanos sanos, demostró que las interacciones idiotípicas del AcM B7 cruzan la barrera de la especie. Por otro lado, estudios de citometría de flujo evidenciaron que ambos anti-idiotipos son capaces de reconocer linfocitos humanos de sangre periférica al igual que líneas tumorales B humanas y murinas (Portuondo, 1996; Macías y cols., 1999).

Macías y colaboradores, en 1999, demostraron que los AcMs B7 y 34B7 manifiestan, *in vitro*, propiedades similares a las de la preparación de inmunoglobulinas intravenosas (IVIg, siglas del inglés *intravenous immunoglobulins*), purificado policlonal de inmunoglobulinas IgG humanas procedente de miles de donantes sanos. Entre dichas propiedades figura la inhibición de la proliferación de líneas celulares B humanas.

Tales hallazgos sugieren que estos anti-idiotipos pueden desempeñar un papel inmunorregulador como el propuesto para las IVIg, las cuales se han usado exitosamente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y desórdenes linfoproliferativos (Kazatchkine y Kaveri, 2001; Krause y Shoenfeld, 2005). La presencia de anticuerpos naturales poliespecíficos por antígenos propios es esencial en el efecto terapéutico de esta preparación policlonal, para la cual se han propuesto diferentes mecanismos de acción. Estos recaen tanto en la región variable como la constante de las IgGs que la componen. La región variable es responsable del reconocimiento de moléculas solubles y asociadas a membrana, así como idiotipos de inmunoglobulinas y el receptor de antígeno de células B (RCB). Por otro lado, el fragmento cristizable (Fc) contribuye a los efectos de las IVIg, a través de las interacciones con receptores de dicho fragmento para las IgG (FcγRs), la modulación de la expresión de FcγRIIb, y la expresión y saturación de receptores Fc neonatales (FcRn) (Negi y cols., 2007).

Los FcγRs constituyen una pieza clave en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa mediada por los anticuerpos, además de ser críticos en algunas funciones efectoras de estos (Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Entre ellos destaca el FcγRIIb, único FcγR expresado en las células B, como un importante modulador de las señales activadoras transmitidas por el RCB. El FcγRIIb, punto de control en el desarrollo periférico de los linfocitos B, influye, incluso, en la supervivencia de las células plasmáticas (Xiang y cols., 2007). Su papel regulador de la inmunidad adaptativa comprende, adicionalmente, el efecto inhibitorio sobre la internalización dependiente de FcγRs, la presentación de antígeno y la consiguiente activación de las células dendríticas (Kalergis y Ravetch, 2002; Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Diferentes técnicas, entre ellas la inmunohistoquímica, han permitido identificar el FcγRIIb en muestras provenientes de pacientes con desórdenes proliferativos de las células B (Cassard y cols., 2006; Rankin y cols., 2006). Todo lo anteriormente expuesto convierte a este receptor en un atractivo blanco para el tratamiento de esas patologías, así como infecciones microbianas y enfermedades autoinmunes, que incluiría el uso de AcMs como una de las herramientas más poderosas.

La capacidad de uno de los anti-idiotipos  $\alpha$  mencionados anteriormente, el AcM B7, de reproducir algunas de las propiedades de las IVIg sugiere su potencial aplicabilidad clínica. Para garantizar un resultado satisfactorio en la terapia es necesario disponer, al menos, de una versión quimérica de este con la cual reducir el desarrollo de una probable respuesta HAMA (siglas del inglés *human anti-mouse antibodies*) que pueda dificultar el éxito del tratamiento (LoBuglio y cols., 1989), y asegurar la eficacia de las funciones efectoras del anticuerpo. Otro motivo que justifica la obtención de una molécula recombinante es la inestabilidad del hibridoma secretor del AcM B7 (Macías A., comunicación personal), la cual limita, además, la producción de cantidades de molécula necesarias para la experimentación en modelos animales. Por lo tanto, una variante quimérica del AcM B7 se convierte en una herramienta útil para el uso clínico de este anticuerpo y el estudio de la naturaleza de sus interacciones con diferentes células del sistema inmune.

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

*La multiespecificidad idiotípica de una versión quimérica del AcM anti-idiotipo  $\alpha$  B7 es determinante para su unión a los linfocitos B, y contribuye a potenciar la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas a las cuales se une, aunque en su interacción con los linfocitos B el Fc $\gamma$ RIIb también participa.*

Para demostrar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Caracterizar a nivel molecular la polirreactividad idiotípica y el reconocimiento de linfocitos B por una versión quimérica del anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  B7.

Objetivos específicos

1. Caracterizar a nivel molecular los sitios responsables de la polirreactividad idiotípica de una versión quimérica del anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  B7.
2. Caracterizar a nivel molecular el sitio de unión a los linfocitos B, de una versión quimérica del anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  B7, evaluando la contribución

del Fc $\gamma$ RIIb a dicho reconocimiento.

3. Definir si una versión quimérica del anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  B7 puede modular la inmunogenicidad de anticuerpos anti-gangliósidos en el modelo singénico.

El presente trabajo se inserta en los estudios realizados en el CIM de caracterización de anticuerpos anti-idiotipo generados contra anticuerpos anti-gangliósidos, en particular, los encaminados a conocer las posibles propiedades inmunorreguladoras de algunos de ellos. A través del análisis inmunogenético de dos anticuerpos anti-idiotipo  $\alpha$  con similar comportamiento inmunoquímico y actividad biológica, se demostró que no comparten las mismas restricciones genéticas de los anticuerpos naturales, a pesar de exhibir, al igual que estos, una alta polirreactividad idiotípica. Constituye un aporte al conocimiento, la demostración de que el proceso de hipermutación somática (HMS) no es incompatible con la polirreactividad de los anticuerpos, contrario a la asunción general de que la HMS contribuye mayoritariamente a un refinamiento de la especificidad de un anticuerpo (Manivel y cols., 2000; Jimenez y cols., 2003; Jimenez y cols., 2004). Mediante estudios de mutagénesis se demostró la existencia en la región variable del anticuerpo B7Y33, versión quimérica del AcM B7, de más de un sitio de unión para diferentes IgM anti-gangliósidos. Los experimentos realizados *in vivo* evidenciaron la capacidad de dicho anticuerpo de potenciar la inmunogenicidad de algunos de estos últimos. Se pudiera entonces hipotetizar una función reguladora de los anticuerpos anti-idiotipo  $\alpha$  en el sistema inmune, tema poco comprendido y apenas abordado en la literatura.

Tributan a la novedad científica de este trabajo, el hallazgo y caracterización de una inesperada e inusual interacción de un anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  con linfocitos B murinos y humanos, que involucra tanto la región variable como la constante del anticuerpo, y el receptor Fc $\gamma$ RIIb expresado en la superficie de los linfocitos B. El reconocimiento del receptor Fc $\gamma$ RIIb no está asociado a la polirreactividad idiotípica del B7Y33. Este trabajo brinda evidencias experimentales de cómo un anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$  incrementa la inmunogenicidad de una inmunoglobulina autóloga, lo que teóricamente contribuiría a sustentar la posible existencia de una red idiotípica

“natural”. Los resultados presentados sugieren que la interacción con los linfocitos B, pudiera ser importante para la actividad potenciadora que tiene este anticuerpo anti-idiotipo  $\alpha$ , de la inmunogenicidad de otros anticuerpos en el modelo singénico. Por otro lado, el reconocimiento por parte del B7Y33 de células tumorales provenientes de pacientes de leucemia linfocítica crónica B y leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, sugiere su posible aplicación terapéutica; de ahí la importancia práctica de estos resultados.

Los mismos han sido presentados en varios eventos nacionales e internacionales. Se encuentran publicados en dos artículos de las revistas internacionales “Hybridoma” y “Molecular Immunology” y forman parte de un manuscrito en preparación. Han tributado, además, a una tesis de maestría.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sistema inmune adaptativo tiene como base la existencia de múltiples genes que se han fijado durante millones de años de evolución. La recombinación de estos genes, junto a otros mecanismos de diversificación, ha dado origen a moléculas como los anticuerpos, capaces de reconocer un amplio repertorio antigénico. La versatilidad y especificidad de unión, así como su actividad biológica, caracterizan la comunicación de estos con otros componentes del sistema inmune, su papel en la articulación de una respuesta eficiente frente a un antígeno, y su regulación. El conocimiento de estos temas es de gran utilidad para el desarrollo de anticuerpos cada vez más eficaces en la clínica y el diseño de procedimientos de intervención en la biología de la célula B, también con fines terapéuticos.

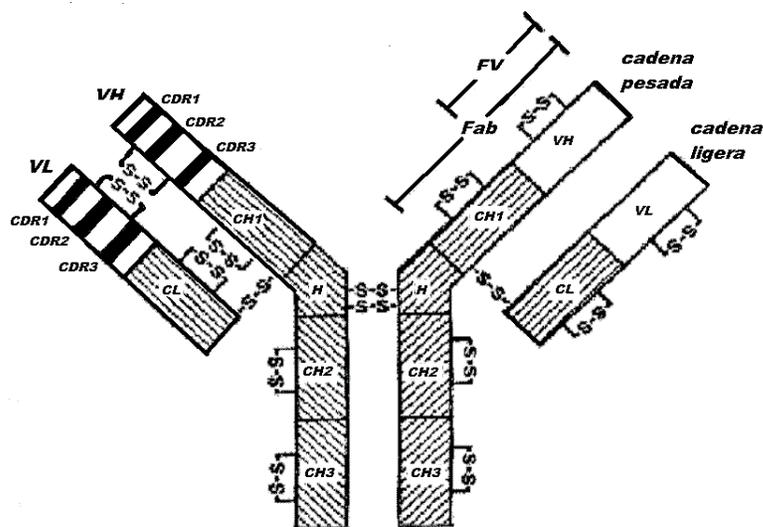
### 2.1 *Inmunogenética*

#### 2.1.1 *Estructura de las inmunoglobulinas*

La estructura de las inmunoglobulinas se ha estudiado ampliamente (Padlan, 1994). Las inmunoglobulinas monoméricas como la IgG están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, idénticas entre sí, unidas por puentes disulfuro. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas están organizadas en dominios de aproximadamente 110 aminoácidos cada uno, agrupados en número diferente: dos en las primeras y cuatro o cinco en las segundas (Padlan, 1994) (Fig. 1).

Los dominios constantes de la cadena pesada, ubicados hacia el extremo C-terminal, son los responsables de las funciones efectoras de la inmunoglobulina, tales como la fijación de complemento, la transferencia placentaria, la unión a receptores celulares, etc. Por su parte, los dominios variables se encuentran en la porción N-terminal de ambas cadenas y se asocian al reconocimiento antigénico. Datos cristalográficos de la estructura tridimensional de estos dominios inmunoglobulínicos han demostrado la formación de estructuras globulares compactas (Poljak y cols., 1973). Cada dominio está formado por reordenamientos estables de puentes de hidrógeno y hojas  $\beta$ -plegadas, antiparalelas, que forman una estructura en bicapa estabilizada por puentes

disulfuro. Las dos capas se componen de plegamientos de diferentes tamaños y conformaciones, con zonas de hélices  $\alpha$  encontradas en algunos de los plegamientos.



**Figura 1:** Representación esquemática de la estructura de una inmunoglobulina IgG.

Un análisis detallado de los aminoácidos de la región variable demuestra la presencia de segmentos de elevada variabilidad. Dichas posiciones se denominan regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDRs, siglas del inglés *complementarity determining regions*) con el antígeno, de las cuales se identifican tres en cada cadena. Los restantes aminoácidos conforman los llamados marcos (FRs, del inglés *frameworks*), que de un anticuerpo a otro conservan una secuencia de aminoácidos y de estructura tridimensional similares. Algunos aminoácidos de las regiones FRs también contribuyen a la adecuada proyección espacial de los CDRs.

Los anticuerpos son moléculas glicosiladas, con los carbohidratos añadidos al segundo dominio de la región constante de la cadena pesada (CH2) (Fig. 1). Esta unión se establece frecuentemente entre el grupo  $\text{NH}_2$  de la Asn y la *N*-acetilglucosamina. La glicosilación parece desempeñar un papel en la secreción de las inmunoglobulinas y en el control de su catabolismo. Los dominios CH3 forman un glóbulo compacto debido a que están muy asociados, mientras los CH2 están apartados debido a la unión de carbohidratos al residuo Asn297. Ambos dominios están formados por muchos residuos hidrofóbicos.

Estudios realizados con secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario (ADNc) arrojaron que aproximadamente el 9% de los anticuerpos presenta sitios de *N*-glicosilación en la región variable (Zhu y cols., 2002), mientras los sitios de *O*-glicosilación son menos frecuentes. La glicosilación de la región variable también influye en la biodistribución *in vivo* del anticuerpo (Morrison, 2005), así como en su inmunogenicidad (Wright y cols., 1991).

La región bisagra es una zona de flexibilidad que permite a los fragmentos de los anticuerpos rotar o moverse (Padlan, 1994). Presenta tres partes: una región flexible superior, que determina la separación entre los dos brazos; un fragmento intermedio que actúa como espaciador entre el fragmento de unión al antígeno (Fab, acrónimo en inglés) y el Fc, de conformación más bien rígida; y una región inferior flexible que permite el movimiento del Fc. La región bisagra modula las funciones efectoras a través de la exposición de los sitios de unión del CH2 en la interfase CH2-CH3 (Harris y cols., 1997).

### 2.1.2 *Genes empleados en el ensamblaje de las regiones variables*

Una gran parte de la diversidad en el repertorio de anticuerpos se crea por recombinación de los segmentos génicos que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Estos segmentos génicos se agrupan en *loci*, que se encuentran adyacentes a los genes que codifican las regiones constantes correspondientes (Mak y Simard, 1998).

Los segmentos génicos que contribuyen a la formación de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) están agrupados en tres regiones localizadas hacia el extremo 5' de los *loci* que contienen los segmentos que codifican las regiones constantes de cada isotipo. Estos son los genes variables (V<sub>H</sub>), de diversidad (D) y de unión (J<sub>H</sub>, del inglés *joining*) que, al recombinar, codifican los primeros 100-130 aminoácidos de la cadena pesada. Los genes V<sub>H</sub> contienen las secuencias que codifican la mayoría de los aminoácidos del dominio V<sub>H</sub> (los primeros residuos hasta la posición 94, según Kabat (Kabat y cols., 1991). Durante el proceso de recombinación que tiene lugar en la ontogenia B, uno de los segmentos génicos D recombina con uno de los J<sub>H</sub> (Sakano y cols., 1980). Los segmentos D y J reordenados (D-J) lo hacen seguidamente con

uno de los genes  $V_H$ , para dar lugar a la secuencia V-D-J que codifica el dominio VH. Los conocimientos acumulados durante años muestran que la información requerida para este proceso está comprendida en secuencias que resultan desplazadas durante la recombinación. Estas secuencias, denominadas secuencias señal de recombinación o RSS (del inglés *recombination signal sequences*), se encuentran localizadas hacia el extremo 5' de los genes  $J_H$ , en el 3' de los genes  $V_H$  y hacia los extremos 5' y 3' de los segmentos génicos D. Las secuencias RSS consisten en dos motivos conservados, un heptámero palindrómico y un nonámero rico en A-T, separados por un espaciador de 12 o 23 pares de bases.

Por su parte, la región variable de la cadena ligera (VL) se origina de la recombinación de los segmentos génicos  $V_K$  y  $J_K$  o los segmentos  $V_\lambda$  y  $J_\lambda C_\lambda$ . Estos genes están flanqueados por RSS similares a las que anteceden o preceden los segmentos génicos que tributan a la región VH, con espaciadores de 12 o 23 pares de bases. La región  $V_\lambda$  es el resultado de un solo evento de recombinación de los segmentos  $V_\lambda$  y  $J_\lambda C_\lambda$ , mientras la  $V_K$  proviene del ensamblaje del segmento génico  $V_K$  con uno de los cinco del locus  $J_K$ , que preceden el gen  $C_K$ .

El proceso de recombinación incluye el corte de la doble hebra de ADN en las secuencias RSS y, finalmente, la unión de los segmentos codificadores. En este participan enzimas responsables de la sustracción y adición de nucleótidos, lo que contribuye a la diversidad en el sitio de unión (Kuby, 1998). Aunque no todos los elementos involucrados en la recombinación han sido descritos, sí se conoce la importancia de algunos de ellos, como las recombinasas RAG-1 y RAG-2 y la enzima TdT (transferasa terminal de desoxinucleótidos) (Mak y Simard, 1998; Fugmann y cols., 2000).

La enzima TdT es la única polimerasa independiente de molde conocida y cataliza la adición al azar de desoxinucleótidos 5' trifosfato al extremo 3' OH de las cadenas de ADN (Tonegawa y cols., 1981). La TdT muestra una mayor preferencia por los nucleótidos CTP y GTP, y este rasgo es empleado con frecuencia en la identificación de las secuencias originadas por esta enzima. Además, se ha visto que la TdT es más activa durante la recombinación de la cadena pesada que en la recombinación de la

cadena ligera (Mak y Simard, 1998). Para identificarlos por su origen, los nucleótidos adicionados por esta enzima se denominan nucleótidos N (de inserción no cebada de nucleótidos), y las secuencias de nucleótidos N, secuencias o regiones N. Se ha visto que las secuencias N aparecen en el 83% de las células B esplénicas de ratones adultos, al menos en uno de los extremos 5' o 3' colindantes con las regiones D, aunque con una mayor frecuencia hacia el extremo 5'. Es importante señalar que la enzima TdT no es expresada durante el período fetal, lo que explica la rara aparición de los nucleótidos N en los recombinantes V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> generados durante esta etapa (Bangs y cols., 1991). Las recombinaciones que tienen lugar durante este período también sugieren una disminución de la actividad exonucleasa, lo cual trae como consecuencia la aparición en los puntos de recombinación de nucleótidos colindantes con los segmentos génicos reordenados y que normalmente, producto de la actividad exonucleasa, no llegan a formar parte del producto final (Bangs y cols., 1991; Kuby, 1998). Estos son los llamados nucleótidos P (Lafaille y cols., 1989).

### 2.1.3 *Genes de línea germinal*

En humanos y ratones existe un número elevado de genes V, D y J de línea germinal, los cuales manifiestan un elevado polimorfismo. Debido a su complejidad y elevado número, los genes V se han agrupados en diversas familias de acuerdo a su identidad nucleotídica. Los genes pertenecientes a una misma familia poseen más de un 80% de similaridad en sus secuencias de nucleótidos, mientras que se consideran de diferentes familias aquellos genes con niveles de similaridad inferiores al 70% (Kofler y cols., 1992).

Se han creado diferentes bases de datos para recopilar los genes de línea germinal descritos. Entre ellas se encuentran la del IMGT, sistema internacional de información sobre inmunogenética, de acceso en Internet: <http://www.imgt.org>; la VBASE2, base integrativa de genes variables de línea germinal de los *loci* de inmunoglobulinas humanas y de ratón, con secuencias extraídas de EMBL-Bank (Retter y cols., 2005); y la base de genes de línea germinal del programa IgBlast, de acceso en Internet: [www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast). Esta última se caracteriza por una interfase cómoda para el usuario, y se nutre, además, de datos aportados por la base

de IMGT. Recopila genes de línea germinal funcionales, así como genes con marco abierto de lectura y pseudogenes. Contiene 349 secuencias de genes funcionales  $V_H$  de línea germinal que se agrupan en 16 familias en el caso de los ratones: J558, Q52, 36-60, X24, 7183, J606, S107, 3609, VGAM3.8, VH10, VH11, VH12, 3609N, SM7, VH15 y VH16. También recopila 98 genes de línea germinal  $V_K$ , tres  $V_\lambda$ , 23 D, cuatro  $J_H$ , cinco  $J_K$  y tres  $J_\lambda$ .

#### *2.1.4 Hipermutaciones somáticas*

Las células B que se movilizan durante la respuesta inmune migran a los folículos linfoides donde, junto a los linfocitos T específicos y las células dendríticas foliculares, forman los centros germinales y se replican. Durante esta fase se introducen mutaciones en los genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas con una frecuencia  $10^5$ - $10^6$  veces mayor que la frecuencia de las mutaciones espontáneas. Este proceso programado de cambios se denomina hipermutación somática (HMS), y se expresa fundamentalmente en forma de sustituciones de una sola base, siendo menos comunes las deleciones y las inserciones.

Las variantes resultantes se seleccionan según su afinidad por el antígeno. Las células que sobreviven a este proceso son reclutadas para el compartimiento de memoria y tienen, en general, mayor afinidad por el antígeno. Como resultado, esta se eleva desde los valores típicos de las respuestas primarias ( $K_d=10^{-7}$  M) hasta los valores alcanzados en las respuestas maduras ( $K_d=10^{-9}$  M) (Mak y Simard, 1998). De esta manera, la HMS diversifica los receptores usados por el sistema inmune para el reconocimiento de los antígenos y le permite adaptar su respuesta a nuevas amenazas durante el tiempo de vida de un organismo (Janeway, 2005).

Los FRs tienen fundamentalmente un papel estructural, mientras que los CDRs son responsables, en su mayoría, de las interacciones antígeno-anticuerpo. Por esa razón, las mutaciones que originan reemplazo de aminoácidos en los FRs tienen una mayor probabilidad de generar anticuerpos no funcionales, con la afectación de la estabilidad estructural y/o ensamblaje de los polipéptidos. A pesar de esto, se piensa que los dominios variables han evolucionado con la capacidad de acomodar cierto nivel de mutaciones en su estructura, sin afectarla (Andersson y cols., 1998). Tanaka

y Nei (1989) demostraron que la tasa de sustituciones de reemplazo en los CDRs es mayor que la de mutaciones silentes, lo que favorece la existencia de organismos con CDRs diferentes.

En general, se ha observado un uso diferencial de codones entre los FRs y los CDRs de los genes de anticuerpos. Considerando que la funcionalidad de la molécula de anticuerpo está determinada por su secuencia aminoacídica, el uso sesgado de codones en los FRs minimiza la probabilidad de mutaciones de reemplazo en el proceso de HMS, contrario a lo que ocurre en los CDRs (Wagner y cols., 1995).

Aunque inicialmente se pensó que las interacciones antígeno-anticuerpo requerían de una perfecta complementariedad química y física, ahora se conoce que estas interacciones pueden producirse mediante encaje inducido (Padlan, 1994), y que en algunos casos pueden aparecer moléculas de agua retenidas entre las superficies de interacción luego de la formación del complejo (Bhat y cols., 1994; Fields y cols., 1995). La visión menos restringida del proceso de unión al antígeno que se desprende de estos hallazgos, podría explicar la capacidad observada en ciertos anticuerpos de acomodar mutaciones somáticas sin mayores efectos en la unión al antígeno (Tulip y cols., 1992).

Se ha demostrado que, en humanos, la diversidad en los CDRs codificada por los genes de línea germinal es mayor que la diversidad aportada por las mutaciones somáticas (Tomlinson y cols., 1996). De esta forma, las mutaciones somáticas podrían constituir un medio para complementar la diversidad codificada en los genes V de línea germinal (Andersson y cols., 1998). Esta observación es sustentada por datos que muestran que, como promedio, las mutaciones somáticas en los anticuerpos tienden a aparecer en la periferia del sitio de combinación, mientras que el centro de este sitio no resulta afectado (Tomlinson y cols., 1996; Wedemayer y cols., 1997).

Generalmente se plantea que durante el proceso de HMS la acumulación gradual de mutaciones resulta en un aumento de la rigidez del centro de combinación con el antígeno, y por ende, un estrechamiento del espectro de antígenos reconocidos (Manivel y cols., 2000; Jimenez y cols., 2003; Jimenez y cols., 2004). Sin embargo, se ha observado para determinados anticuerpos la adquisición de un patrón de unión

multiespecífica durante el proceso de maduración de la afinidad (James y Tawfik, 2003b).

La identificación de las mutaciones somáticas en los dominios VH y VL de los anticuerpos requiere del conocimiento de las secuencias de los genes de línea germinal de origen. La vía más rigurosa para acceder a estas secuencias consiste en la clonación y la secuenciación de los segmentos génicos V de mayor identidad a partir de una colección de ADN embrionario (Sakano y cols., 1980). Una alternativa frecuentemente empleada es la identificación de los segmentos V de línea germinal de mayor similitud descritos con anterioridad y colectados en bases de datos. Cuando no es posible encontrar entre los genes descritos secuencias que muestren un nivel de identidad suficiente, se hace necesaria la comparación con todas las secuencias V de anticuerpos informadas, con vistas a la determinación de la secuencia prototipo (consenso). Al analizar numerosas secuencias similares, se considera que los nucleótidos conservados provienen de la línea germinal, mientras que los nucleótidos específicos de una secuencia particular constituyen mutaciones.

## ***2.2 Actividad de reconocimiento de los anticuerpos***

### ***2.2.1 Reconocimiento por la región variable***

#### ***2.2.1.1 Contribución de los aminoácidos al sitio de unión***

Como se describe en el epígrafe 2.1, los dominios variables de los anticuerpos median el reconocimiento antigénico. Se ha demostrado que en los CDRs se encuentra la mayoría de los aminoácidos que interactúan con el antígeno, mediante complementariedad físico-química (Chothia y cols., 1986), ya sean puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos, fuerzas de van der Waals, etc.

Una vista superior de la molécula revela que la alta variabilidad de los CDRs se localiza en el centro del sitio de unión, donde se concentran los lazos de las regiones VH y VL, a pesar de la ubicación discontinua de estos segmentos en la secuencia lineal de la molécula. La proyección de los CDRs es una superficie caracterizada por depresiones y protuberancias (Padlan y cols., 1989; Garcia y cols., 1992), ubicada en

la estructura sobre el plegamiento de los residuos más conservados de la propia región variable, y constituye entre el 15-20% de esta (Chothia y cols., 1986). En el plegamiento espacial de los CDRs se observa una disposición conservada del esqueleto polipeptídico, denominada estructura canónica (Chothia y cols., 1986). Cada CDR es capaz de adoptar solamente un mínimo de dichas estructuras. En la disposición del sitio de unión al antígeno, estas imponen *grosso modo* la geometría del sitio de reconocimiento, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos determinan la especificidad antigénica (Chothia y Lesk, 1986; Chothia y cols., 1989; Tramontano y cols., 1990).

La variabilidad en secuencia y longitud del CDR 3 de la cadena pesada (CDR H3) impide generalmente la imposición de una estructura canónica, por lo que se deduce su elevada contribución a la interacción con el antígeno. Especialmente, la participación de la cadena pesada es vital para el correcto plegamiento del sitio de unión, lo que no excluye la importancia de las CDRs de la cadena ligera en la estabilización de los enlaces débiles.

Dentro de los mismos CDRs hay posiciones más hipervariables que otras. Análisis topográficos de las estructuras tridimensionales de los anticuerpos indican que los contactos con el antígeno generalmente ocurren con los residuos centrales del sitio de unión (MacCallum y cols., 1996). Los residuos más conservados en los CDRs pueden desempeñar una función más estructural y servir para estabilizar la estructura del sitio de combinación con el antígeno (Padlan, 1994). Hay residuos característicos que pueden estar más o menos expuestos si están en los CDRs o en los FRs, como el Trp y la Tyr, que están más enterrados cuando están en los FRs y más expuestos cuando están en los CDRs. Los residuos Trp, Tyr y Phe de los FRs se encuentran normalmente en los interdominios (Padlan, 1994). Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas pueden contribuir significativamente a la unión con el antígeno, debido a sus características de hidrofobicidad y gran contribución a la formación de las fuerzas de van der Waals, su capacidad para formar puentes de hidrógenos (Levitt y Perutz, 1988), y además por su relativa rigidez, lo que les permite tener ciertos grados de libertad. Las Val, Ile y Leu son incapaces de formar interacciones iónicas, por lo que estos residuos pueden contribuir a la unión con el antígeno a través de

interacciones de van der Waals (Padlan, 1994). Las Asn están más enterradas cuando están en los CDRs que cuando están en los FRs, y pueden influir en la estabilización de los lazos de los CDRs (Padlan, 1994). Incluso, se conoce que residuos de los FRs pueden interactuar directamente con el antígeno (Chothia y cols., 1986). Cambios en la carga superficial de residuos de los FRs pueden ser determinantes no solo en la solubilidad y estabilidad del anticuerpo, sino también en su reconocimiento antigénico.

### 2.2.1.2 Unión a múltiples ligandos

Muchos han sido los términos usados para definir la capacidad de una proteína de unirse a más de un ligando o ejercer más de una función. Algunos de estos términos no son necesariamente excluyentes y pueden superponerse, por lo que suelen, en ocasiones, utilizarse indistintamente. En un esfuerzo por homogeneizar la terminología, James y Tawfik (2003a) han propuesto algunas definiciones relacionadas con dicha capacidad (Tabla 1).

**Tabla 1:** Definición de distintos tipos de unión múltiple a ligandos (James y Tawfik, 2003a).

Diversidad conformacional	Existencia de una proteína en más de una conformación (conformaciones pre-existentes o plasticidad)
Reactividad cruzada	Desempeño de actividades de una proteína que se superponen con la actividad original, sobre ligandos o sustratos similares al blanco original de la proteína
<i>Moonlighting</i>	Desempeño de diferentes funciones usando partes de la proteína generalmente diferentes del sitio activo original (papel <i>in vivo</i> )
Multiespecificidad	Realización de una función similar (ej. unión) sobre ligandos diferentes, mediante el uso de diferentes residuos del sitio activo
Promiscuidad (polirreactividad)	Realización de diferentes funciones usando el mismo sitio que es responsable de la actividad original

Aunque ha existido siempre una tendencia a pensar que los anticuerpos tienen una única estructura tridimensional, existen evidencias físicas y bioquímicas de su multiespecificidad o reactividad cruzada (Richards y cols., 1975).

La extensión de la complementariedad molecular y la naturaleza de los residuos aminoácidos en el sitio de combinación determinan el grado de especificidad del anticuerpo. El papel de los residuos en la definición de la estructura del sitio de unión puede ser estimado como una función de las propiedades estructurales de cada aminoácido individualmente (Mian y cols., 1991). Por ejemplo, los residuos Tyr y Trp, de gran tamaño y con dos ángulos de torsión, pueden conferir plasticidad al sitio de unión, lo que permite el acomodo de una variedad de antígenos de formas ligeramente diferentes (Mian y cols., 1991). Se ha sugerido que estos residuos confieren a los anticuerpos la propiedad de “adherencia hidrofóbica”, que permite a antígenos diferentes unirse a través de interacciones hidrofóbicas no específicas (Padlan, 1994). En este sentido, se ha demostrado que algunos anticuerpos se unen a varios ligandos con afinidades directamente proporcionales a la hidrofobicidad de dichas moléculas (Barbas y cols., 1997). Sin embargo, James y Tawfik (2003b) probaron que la afinidad de un anticuerpo con reactividad cruzada con diferentes ligandos no tiene que depender necesariamente del grado de hidrofobicidad de estos.

El tipo de reactividad múltiple donde el blanco y el ligando adicional están relacionados e interactúan de manera similar con el sitio de unión, se denomina mímica antigénica o molecular. La mímica molecular, también reactividad cruzada, constituye el tipo de reactividad múltiple que más se describe en la literatura (Oldstone, 1998). Diversos estudios han referido casos de unión de un anticuerpo a diferentes ligandos, basada en la química compartida entre estos, y el uso de pequeñas adaptaciones del sitio de unión (Arevalo y cols., 1994; Kramer y cols., 1997; Trinh y cols., 1997; James y cols., 2003). Otros autores han demostrado que los ligandos adicionales similares al antígeno *original* no tienen necesariamente que mimetizarlo estructural o químicamente para unirse al anticuerpo, sino que también pueden usar diferentes contactos específicos con su sitio de unión (James y Tawfik, 2003b). Estos trabajos han evidenciado, además, que la afinidad y especificidad de unión por varios ligandos similares entre sí está controlada por el número y la naturaleza de las

interacciones por puente de hidrógeno específicas entre el ligando y el anticuerpo (James y Tawfik, 2003b).

Mientras la reactividad cruzada implica la unión a ligandos que son similares o se superponen con el antígeno original (Arevalo y cols., 1994; Trinh y cols., 1997), la multiespecificidad se refiere a la unión a ligandos verdaderamente diferentes. Algunos modelos teóricos plantean que el número de moléculas complementarias para un sitio de unión dado es una función del tamaño de la biblioteca de proteínas con que se explora y el límite de afinidad con que esta se selecciona (Inman y 1978; Perelson y Oster, 1979). La multiespecificidad se ha podido explicar de diversas maneras. Una de ellas es la pre-existencia de un equilibrio de varias formas isoméricas del anticuerpo (Foote, 2003), al comprobarse que una misma inmunoglobulina puede adoptar diferentes conformaciones del sitio de combinación y unir, por lo tanto, antígenos no relacionados (James y cols., 2003). Una explicación alternativa para la multiespecificidad es el uso de diferentes grupos de residuos del sitio de combinación (Kramer y cols., 1997).

Algunos autores, retomando aspectos del antiguo modelo “instructivo” de la formación de anticuerpos y la explicación del “encaje inducido”, plantean que la plasticidad del sitio de unión y los cambios conformacionales que puede adoptar un sitio de unión después de la interacción con el antígeno son la explicación más plausible para justificar la multiespecificidad. Sin embargo, se desconoce aún lo que en la secuencia o en la estructura de un anticuerpo polirreactivo le confiere a este más flexibilidad que un anticuerpo monorreactivo (Notkins, 2004). No obstante, se han hallado anticuerpos monorreactivos que han evidenciado ser más flexibles y dúctiles que lo que se pensaba anteriormente (Keitel y cols., 1997; Kramer y cols., 1997). Se han identificado, incluso, cambios conformacionales por encaje inducido en muchos anticuerpos maduros, aun cuando las estructuras sugieren que el anticuerpo libre y el acomplejado no difieren entre sí (Lindner y cols., 1999).

Un dogma central de la inmunología es que la especificidad del anticuerpo es solamente el resultado de las interacciones de la región variable con el antígeno. Sin

embargo, se ha demostrado que los dominios de la región constante pueden afectar la afinidad de unión y la especificidad (Torres y Casadevall, 2008).

La unión de glucanos al fragmento variable (Fv) puede modular la interacción con el antígeno. En este sentido, Fernández y cols. (1997), probaron que la capacidad de unión de los anticuerpos polirreactivos a sus ligandos depende más del contenido de carbohidratos en la región variable que en el caso de los monoespecíficos.

Desde el punto de vista biológico, la unión a un número de antígenos diferentes puede aumentar la talla efectiva del repertorio de anticuerpos, y con ello, la posibilidad de interceptar un patógeno invasor. El isomerismo conformacional de anticuerpos puede conferir ventajas, sobre todo, cuando la segunda conformación reconoce un epítopo en la misma molécula de antígeno, particularmente, si este es monomérico. Esto permitiría un posible entrecruzamiento: dos conformaciones del anticuerpo sobre dos epítopos de la misma molécula. En la literatura se ha establecido bien la importancia del entrecruzamiento y la agregación de complejos inmunes en la eliminación de antígenos, la activación del complemento, la endocitosis y la transducción de señales (Metzger, 1992). A pesar de las ventajas evolutivas de la reactividad cruzada y la diversidad conformacional, estos fenómenos pueden también conducir a alergia y autoinmunidad (James y cols., 2003).

Otro ejemplo de unión a múltiples ligandos lo aportan los llamados superanticuerpos. Este término surgió para designar aquellas inmunoglobulinas capaces de interactuar con diferentes ligandos por sitios distintos a los de unión clásica al antígeno (Kohler y Paul, 1998). Estos anticuerpos combinan la función de unión convencional al antígeno con una función biológica no clásica, cualitativamente diferente. Sitios discretos de unión al ligando en el dominio variable de estos anticuerpos son los responsables de funciones tales como la catálisis química (Paul, 1998), la unión a nucleótidos (Rajagopalan y cols., 1996), la unión a sí mismos (Kang y Kohler, 1986) y la unión a superantígenos (Sasso y cols., 1989). A estos sitios contribuyen, fundamentalmente, residuos conservados de los dominios variables localizados tanto en los CDRs como en los FRs (Kohler y Paul, 1998).

El estudio de esta propiedad que poseen naturalmente algunos anticuerpos ha permitido el establecimiento de la tecnología de superanticuerpos, la cual representa una vía para aumentar la potencia y utilidad de los AcMs. Esta se basa en el acoplamiento químico de determinados péptidos a los anticuerpos, con el objetivo de conferir funciones biológicas no detectadas en la mayoría de las inmunoglobulinas. De esta manera, se han ingenierizado tres tipos de anticuerpos: anticuerpos dimerizantes con potencial efector incrementado, superanticuerpos con la capacidad de penetrar células vivas y superanticuerpos como vacunas con propiedades adyuvantes. En conjunto, estos resultados demuestran que la tecnología de superanticuerpos genera una nueva clase de moléculas con mayor eficacia terapéutica (Zhao y cols., 2005).

#### *2.2.1.2.1 Autorreconocimiento*

La descripción de un AcM murino específico por la fosfatidilcolina (Rajagopalan y cols., 1996), perteneciente a la familia inmunogenética T15/S107, con la capacidad de autorreconocimiento, llevó a nombrar estas moléculas como autocuerpos o anticuerpos autofílicos.

Al sintetizarse un péptido de la región 50-74 de la VH y comprobar su efecto inhibitorio sobre la autounión, se pudo deducir que dicha zona, que involucra al CDR H2 y al FR H3, pudiera ser la responsable de este fenómeno (Kang y Kohler, 1986). A propósito, uno de los modelos del complejo de autounión propuestos predice la interacción entre los residuos 50-60 del CDR H2 de una molécula de anticuerpo y los residuos 63-74 en el FR H3 de la otra (Kohler y Paul, 1998). Experimentos realizados con otro anticuerpo con capacidad de autounión mostraron que el residuo Ser52a (numeración de Kabat) es importante en la formación del complejo (Yan y cols., 1996), lo que confirma la participación del CDR H2 en este fenómeno.

Por mutagénesis dirigida y posteriores estudios de especificidad y autounión, se concluyó que las actividades de unión al antígeno e interacción homofílica son funciones independientes que involucran diferentes residuos de contacto en los dominios variables (Kaveri y cols., 1991).

La capacidad de los autocuerpos de agregarse en la superficie de células blanco como bacterias o células tumorales (Yan y cols., 1996) podría resultar en una amplificación de los efectos biológicos. El incremento de la densidad del anticuerpo puede conducir a una potenciación de la fijación del complemento y la lisis de la célula blanco. Además, concentraciones elevadas de los anticuerpos podrían aumentar la afinidad aparente por el antígeno (avidez) (Schillbach y cols., 1993).

El mecanismo de autounión ha sido explotado para mejorar el uso terapéutico de anticuerpos ya existentes. Un ejemplo lo constituye un anticuerpo anti-CD20, al cual se le acopló el péptido responsable del fenómeno de autounión del T15/S107 (Kang y cols., 1988). Después de esta modificación se verificó su capacidad de autorreconocimiento, con un consiguiente aumento en la actividad de la molécula original, dada por el incremento en la tasa de apoptosis inducida e inhibición del crecimiento de células tumorales *in vitro* (Zhao y cols., 2002).

Anticuerpos naturales encontrados en humanos y otras especies han mostrado unión al péptido sintético anterior. Este hallazgo sugiere la existencia de anticuerpos anti-idiotipos que reconocen este sitio, lo que podría hacer de los autocuerpos, componentes de circuitos idiotípicos regulatorios (Kohler y Paul, 1998).

### 2.2.1.3 *La teoría de la red idiotípica*

En 1974 Niels Jerne enuncia la teoría de la red idiotípica (Jerne, 1974), que plantea que el sistema inmune es controlado internamente por una red de idiotipos y anti-idiotipos. El concepto de idiotipo, surgido en los años 60 con los experimentos de Oudin y Michel (Oudin y Michel, 1963), planteaba que las inmunoglobulinas tenían no solo determinantes antigénicos comunes, sino también individuales. Mediante experimentos en los cuales inmunizaron conejos con una inmunoglobulina de mieloma humano, se demostró que los antiseros mantenían la reactividad hacia esta inmunoglobulina luego de ser absorbidos con inmunoglobulinas no relacionadas. A la colección de determinantes epitópicos asociados a la región variable se le denominó idiotipo. A los determinantes individuales reconocidos en el idiotipo por cada anticuerpo se les denominó idiotopos. Por otra parte, los anticuerpos portan sitios de

combinación con los antígenos convencionales que, a su vez, pueden ser reconocidos por otras moléculas de inmunoglobulina. Jerne denominó este sitio como paratopo.

Jerne postuló que los idiotipos podían constituir dianas regulatorias del sistema inmune y que existían parejas de regiones variables complementarias que coexistían en el repertorio de cada individuo. En una versión posterior (Jerne, 1984), propuso que la línea germinal codificaba “pares” de autoanticuerpos y anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra estos, que de esta forma establecían series de anticuerpos interactuantes. El postulado fundamental de la teoría de la red idiotípica es que debido a la extraordinaria diversidad de las regiones variables en las inmunoglobulinas, estas expresan idiotopos que reaccionan cruzadamente con un gran número de epítomos, si no con todos. Por lo tanto, en la colección de idiotopos del individuo existe una configuración molecular similar a las encontradas en los determinantes de los antígenos involucrados en la inmunización natural o experimental. Los anticuerpos portadores de estos idiotopos miméticos, pueden interactuar con los anticuerpos antígeno-específicos. Un anticuerpo antígeno-específico, denominado Ab1, presenta múltiples idiotopos, por lo que la respuesta anti-idiotípica es muy heterogénea y se clasifica frecuentemente de la siguiente forma (Bona, 1992): Ab2  $\alpha$ , que reconocen idiotopos en el Ab1 que no están relacionados estructuralmente con el sitio de combinación con el antígeno; Ab2  $\beta$ , que reconocen el idiotopo que corresponde con el sitio de unión con el antígeno (paratopo) y mimetizan el epítopo reconocido por el Ab1; Ab2  $\gamma$ , que reconocen idiotopos asociados estructuralmente con el sitio de combinación del Ab1 con el antígeno, pero no son capaces de mimetizarlo.

Los anticuerpos anti-idiotipo  $\beta$  son los más utilizados en la práctica, como vacunas, por su capacidad de mimetizar el antígeno. Esto ha sido de gran utilidad en la inducción de respuesta inmune específica contra antígenos poco inmunogénicos como los carbohidratos (Betakova y cols., 1998).

#### *2.2.1.4 Anticuerpos naturales*

Entre las evidencias posteriores que sustentan la teoría idiotípica, se encuentran los estudios realizados en animales libres de gérmenes, donde se han detectado

anticuerpos en ausencia de estimulación antigénica (Avrameas, 1991; Varela y Coutinho, 1991). Estos surgen independientemente de cualquier inmunización y se denominan anticuerpos naturales (Ternynck y Avrameas, 1986). Una fracción mayoritaria de ellos está constituida por inmunoglobulinas multiespecíficas que reaccionan con una amplia, pero bien definida, colección de moléculas diferentes, incluidos otros anticuerpos (Ternynck y Avrameas, 1986) (Araujo y cols., 1987; Sigounas y cols., 1994; Tchernychev y cols., 1995; Tchernychev y Wilchek, 1996; Notkins, 2004). Esta multirreactividad forma una red temprana de inmunoglobulinas en el sistema inmune y su interferencia resulta en distorsiones del repertorio de células B en el adulto (Vakil y Kearney, 1986). La amplia reactividad de los anticuerpos naturales incluye antígenos propios como hormonas, ácidos nucleicos, fosfolípidos, polisacáridos y/o antígenos foráneos como componentes de bacterias, virus, protozoos y hongos. Igualmente, son capaces de reconocer proteínas autólogas y heterólogas y haptenos como el dinitrofenol (Martin y Martin, 1975; Geller y cols., 1993; Hardy y cols., 1994). La afinidad de los anticuerpos polirreactivos por diferentes antígenos es generalmente más baja ( $K_d = 10^{-3}$  a  $10^{-7}$  M) que la de un anticuerpo monorreactivo hipermutado generado durante la respuesta inmune ( $K_d = 10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M); sin embargo, muestran una elevada avidéz (Casali y Notkins, 1989; Adib-Conquy y cols., 1993; Hardy y cols., 1994).

Estas inmunoglobulinas, generalmente de isotipo IgM, aunque también existen como IgA e IgG, son secretadas por un subconjunto de células B llamadas B-1 y que son predominantes en el repertorio B temprano (fetal y neonatal), aunque persisten en el individuo adulto (Kasaian y cols., 1991). Se localizan preferentemente en las cavidades peritoneal y pleural (Hayakawa y cols., 1986). En humanos constituyen entre el 10% y el 30% de los linfocitos B periféricos (Kasaian y cols., 1992), y son también abundantes entre las células de la lámina propia del intestino (Kroese y cols., 1992).

Los anticuerpos naturales son capaces de reconocerse entre sí y formar una densa red idiotípica, lo que constituye la base estructural del alto grado de conectividad idiotípica interclonal presente en el repertorio neonatal (Holmberg y cols., 1984b; Vakil y Kearney, 1986). En la existencia de tales contactos, según la teoría de Jerne

(Jerne, 1974), se basa la regulación del sistema inmune. En enfermedades tales como la cirrosis hepática, cáncer de mama y enfermedad de Alzheimer, se observan alteraciones en los niveles normales de anticuerpos naturales (Louzir y cols., 1988; Ounanian y cols., 1990). Además, en modelos animales sensibles a enfermedades autoinmunes como los ratones B/W, en los que se establece un estado patológico similar al lupus eritematoso sistémico, se encuentran niveles anormales de anticuerpos naturales, fundamentalmente elevadas concentraciones de IgM e IgG polirreactivas (Dietrich y cols., 1992).

Las células B-1 de la cavidad peritoneal utilizan un repertorio limitado de genes de región variable de línea germinal, generalmente no mutados, sin adición de nucleótidos N, y no modificados por hipermutación somática (Lalor y Morahan, 1990; Kantor, 1996; Kantor y cols., 1997; Seidl y cols., 1999). Algunos autores refieren la existencia de restricciones genéticas en las VHs, las que generalmente están codificadas a partir de genes que pertenecen a las familias génicas 7183 y Q52 en el ratón (Holmberg, 1987). Otros, sin embargo, defienden el criterio de que los anticuerpos polirreactivos pueden ser codificados por todas las familias V<sub>H</sub> (Striebich y cols., 1990; Chen y cols., 1991). Por otra parte, no se ha descrito un uso preferencial de familias génicas de segmentos V<sub>κ</sub> en el repertorio neonatal (Lawler y cols., 1989). Las secuencias correspondientes a las VL, al igual que las pesadas, aparecen en un estado muy próximo al de la línea germinal (Carlsson y cols., 1991).

### *2.2.2 Reconocimiento de la región constante de las IgG por receptores Fcγ*

La región constante de los anticuerpos les permite interactuar con diferentes poblaciones celulares portadoras de diversos receptores. Entre estos se encuentran los FcγRs, que a través de las señales positivas o negativas que transmiten, logran armar una respuesta inmune balanceada. Se convierten en un ejemplo típico de cómo la excitación simultánea de vías de señalización activadoras e inhibitorias determina un umbral para la activación celular (Ravetch y Lanier, 2000).

La mayoría de los FcγRs son activadores e incluyen el receptor de alta afinidad FcγRI, y una familia de receptores de moderada y baja afinidad que comprenden los FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa y FcγRIIIb en humanos, y FcγRIII y FcγRIV, en ratones.

El FcγRIIb, presente en ambas especies, es el único que tiene una función inhibitoria (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

Los FcγRs conectan las respuestas inmunes humoral y celular. La interacción entre la IgG unida al patógeno y los receptores activadores media directamente la eliminación del patógeno a través de mecanismos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, siglas del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), la desgranulación de células citotóxicas y fagocitosis, e indirectamente, la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios. Igualmente, los FcγRs son importantes en la neutralización de toxinas patogénicas unidas a IgG (Perez y cols., 2009; Verma y cols., 2009). Estas funciones son inhibidas por el FcγRIIb.

A la expresión pareada de moléculas inhibitorias y activadoras en la misma célula se suma un segundo nivel de complejidad en la familia de los FcγRs: la existencia de cuatro subclases diferentes de IgG en humanos (IgG1-IgG4) y en ratones (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), las cuales se unen con afinidad y especificidad variables a dichos receptores. Esto es de gran importancia para las funciones efectoras de los anticuerpos dependientes de los FcγRs, y el diseño de terapias basadas en anticuerpos (Nimmerjahn y Ravetch, 2006).

Los FcγRs se expresan ampliamente en todo el sistema hematopoyético. Se desconoce aún con certeza la expresión de FcγRs en las células T; aunque estudios iniciales sugirieron que ciertas subpoblaciones de estos linfocitos los expresaban, evidencias más recientes lo niegan (Stout y Herzenberg, 1975; Takai, 2002; Ravetch, 2003). Las células efectoras del sistema inmune innato como monocitos, macrófagos, células dendríticas, basófilos y mastocitos expresan ambos tipos de receptores, activadores y el inhibitorio. Solo dos tipos de células no los co-expresan: las células NK (expresan únicamente el FcγRIII) y los linfocitos B (solo expresan el FcγRIIb) (Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

El tipo de señalización que transducen los FcγRs depende de la presencia de motivos de Tyr que pueden ser inhibidores (ITIM, siglas del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), o activadores (ITAM, siglas del inglés *immunoreceptor*

*tyrosine-based activation motif*), y que se encuentran en la región citoplasmática de estos receptores. El FcγRIIb transmite sus señales a través del ITIM, mientras el resto de los receptores, con excepción del FcγRIIIB humano anclado a glucosilfosfatidilinositol (GPI, siglas del inglés *glycosylphosphatidylinositol*), lo hacen a través del ITAM.

El FcγRI es el único receptor de alta afinidad en humanos y en ratones; se une a IgG2a en ratones, o IgG1 e IgG3 en humanos, con una afinidad de  $10^{-8}$ - $10^{-9}$ M. El resto de los receptores tienen afinidades cien a mil veces más bajas y muestran una especificidad de subclases IgG más amplia (Ravetch, 2003).

La baja afinidad de la mayoría de los FcγRs impide la unión de moléculas de anticuerpo monoméricas libres que están presentes siempre a altos niveles en el suero, y por lo tanto, evita la potencial activación no específica de respuestas pro-inflamatorias. En contraste, el FcγRI está constantemente saturado con ligando.

#### *2.2.2.1 Interacciones anticuerpo-FcγR*

Los FcγRs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y, con excepción del FcγRIIIB anclado a GPI, son glicoproteínas transmembrana tipo I. A pesar de la especificidad variable del ligando, la estructura general de los FcRs está estrechamente relacionada y puede ser superpuesta con otros miembros de la familia con mínimas diferencias (Radaev y Sun, 2002).

Los receptores de baja afinidad constan de dos dominios extracelulares (D1 y D2) separados por un ángulo de 50-55°, y están conectados por una región bisagra. Sin embargo, el FcγRI contiene un dominio adicional, D3, el cual se ha sugerido es importante para la unión de alta afinidad (Allen y Seed, 1989). Estructuras resueltas de anticuerpos libres y acomplexados con otras proteínas, revelan que el Fc (dominios CH2 y CH3) adquiere una estructura tipo “herradura”, con la porción sacarídica ligada al residuo Asn 297 del CH2 sobresaliente hacia la cavidad central.

Las variaciones en la composición de azúcares pueden conducir a cambios conformacionales sutiles en regiones del Fc (Matsumiya y cols., 2007). La estructura cristalina del complejo FcγRIIIA-Fc de IgG1 humana (Sondermann y cols., 2000;

Radaev y cols., 2001), sugiere una estequiometría 1:1 para las interacciones IgG1-Fc $\gamma$ Rs (Kato y cols., 2000; Zhang y cols., 2000). Solo un dominio de los Fc $\gamma$ Rs hace contacto con las regiones más bajas de la bisagra, y por lo tanto, se intercala en el surco formado por dos cadenas diferentes del Fc.

El conocimiento acumulado sobre las interacciones Fc $\gamma$ Rs-IgG ha facilitado la obtención de variantes de la región Fc con diferentes afinidades por los receptores antes mencionados, para ser usadas convenientemente en una u otra aplicación terapéutica de los anticuerpos. Por ejemplo, a partir del mapeo de alta resolución del sitio de unión de las IgG1 humanas a los Fc $\gamma$ Rs, se han diseñado variantes mutadas de dicho isotipo con una unión mejorada a estos receptores (Shields y cols., 2001; Lazar y cols., 2006). Por el contrario, con el objetivo de obtener moléculas de anticuerpo que retengan su especificidad, pero que disminuyan su inmunogenicidad y activación de células T, se han generado variantes mutadas con unión reducida a los Fc $\gamma$ Rs I y II. Un ejemplo de este tipo son las diferentes versiones de IgG1 humanizada del AcM anti-CD3 humano OK-T3, obtenidas a partir de las sustituciones de los residuos de Leu 234 y 235 del CH2 por Ala. Las variantes retienen la capacidad inmunosupresora del anticuerpo original y reducen significativamente el indeseado síndrome de liberación de citocinas, asociado a la activación de las células T (Xu y cols., 2000).

#### 2.2.2.2 *Glicosilación del anticuerpo y unión al Fc $\gamma$ R*

Además de las interacciones con los diferentes aminoácidos, la porción sacarídica unida a la Asn297 del Fc también participa en la interacción con los Fc $\gamma$ Rs. Estas cadenas laterales de azúcares consisten en un núcleo heptasacarídico conservado de dos antenas, que contiene manosa y *N*-acetilglucosamina, con adiciones variables de residuos de fucosa, *N*-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. Mientras el núcleo de azúcar es altamente ordenado en la estructura del cristal, los residuos terminales son más flexibles. Existe un parche hidrofóbico en cada cadena  $\gamma$  del Fc que interactúa con estos azúcares (Deisenhofer, 1981). Cada glucano interviene en aproximadamente 70 interacciones no covalentes con la superficie de la proteína, lo que restringe su movimiento. Estas interacciones estabilizan el Fc y contribuyen a mantener su estructura (Mimura y cols., 2000; Mimura y cols., 2001). De hecho, la

eliminación completa de la porción sacarídica de la región Fc, cambia su estructura y conduce a una afectación de la unión a los FcγRs celulares. Cambios más sutiles en la glicosilación del anticuerpo también tienen impacto en la unión a los FcγRs y su actividad *in vivo*. Por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de fucosa modula la unión al FcγRIIIa (Okazaki y cols., 2004). Cuando no hay fucosa se genera una interacción de alta avidéz debido a que una mayor superficie del Fc está disponible para interacciones adicionales con el residuo Asn162 del receptor.

Otro residuo sacarídico que afecta la actividad del anticuerpo es la galactosa. La ausencia de galactosa terminal y ácido siálico se ha observado en los anticuerpos presentes en pacientes con algunos desórdenes autoinmunes como la artritis (Arnold y cols., 2007).

### *2.2.2.3 FcγRs e inmunidad adaptativa*

La familia de los FcγRs ha demostrado tener una importancia capital en el establecimiento de un umbral de activación de las células dendríticas y la modulación de la respuesta celular adaptativa. En estas células, los FcγRs son determinantes en la fagocitosis o endocitosis de los inmunocomplejos y la presentación de péptidos derivados del antígeno en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Woelbing y cols., 2006).

Varios estudios han demostrado que los inmunocomplejos son potentes activadores de las células dendríticas e inducen respuestas inmunes más fuertes que el antígeno solo. Su internalización conduce, además de a la presentación por MHC-II, a la presentación cruzada por MHC-I, con la consiguiente activación de células T CD4+ y CD8+ (Regnault y cols., 1999). Este proceso es controlado por el FcγRIIb.

Adicionalmente, la deficiencia o bloqueo del FcγRIIb en células dendríticas ha conducido a su maduración espontánea (Boruchov y cols., 2005; Dhodapkar y Dhodapkar, 2005). Esto demuestra el papel regulador de dicho receptor sobre este proceso en condiciones no inflamatorias.

En situaciones en las cuales se desea una respuesta inmune máxima, como la inmunoterapia de tumores o infecciones microbianas, el bloqueo de la actividad del

Fc $\gamma$ RIIb puede ser una forma de obtener mejores efectos terapéuticos (Nimmerjahn y Ravetch, 2007). De acuerdo con esto, se ha demostrado que la eliminación del gen codificador del Fc $\gamma$ RIIb resulta en una mayor estimulación de las células T antígeno-específicas (Kalergis y Ravetch, 2002).

### 2.3 *El Fc $\gamma$ RIIb y la biología de la célula B*

#### 2.3.1 *El Fc $\gamma$ RIIb*

Los anticuerpos constituyen las herramientas principales con las cuales los linfocitos B participan en la respuesta inmune. Sin embargo, estas moléculas tienen un papel importante en la biología y regulación de la actividad de este tipo de células, más allá de sus funciones efectoras relacionadas con componentes del sistema inmune innato. Este papel lo realizan fundamentalmente mediante la interacción específica del Fc con el Fc $\gamma$ RIIb expresado en las células B, lo cual contribuye a un efecto supresor de la inmunidad humoral (Sidman y Unanue, 1976; Phillips y Parker, 1984).

El Fc $\gamma$ RIIb está conservado en ratones y humanos (Nimmerjahn y Ravetch, 2008) y es el único Fc $\gamma$ R expresado en las células B (Amigorena y cols., 1989). La función principal del Fc $\gamma$ RIIb es inhibir señales activadoras, lo cual realiza a través del cocomprometimiento del RCB por los inmunocomplejos. Esta señal conduce a la fosforilación del ITIM citoplasmático del Fc $\gamma$ RIIb por la cinasa Lyn de la familia Src (Amigorena y cols., 1992; Muta y cols., 1994). La unión subsiguiente de fosfatasa de inositol que contienen motivos SH2, en particular la SHP1, resulta en la desfosforilación de intermediarios del fosfatidilinositol, lo que impide el reclutamiento de cinasas como la BTK o la fosfolipasa C a la membrana celular, y disminuye los eventos siguientes de la cascada de señalización activadora (Ono y cols., 1996; Ono y cols., 1997). De esta manera, el Fc $\gamma$ RIIb regula la activación de la célula B aumentando su umbral y suprimiendo la presentación antigénica a las células T mediada por el mecanismo inhibitorio dependiente de ITIM antes descrito.

El Fc $\gamma$ RIIb puede también interrumpir la formación de la sinapsis inmune, importante en la activación temprana de la célula B (Sohn y cols., 2008), debido, en parte, a la

alteración de las interacciones RCB-lípidos y a la obstaculización de su oligomerización inducida por el antígeno (Liu y cols., 2010).

La señalización inhibitoria a través del Fc $\gamma$ RIIb se ha demostrado en todas las células que lo expresan con excepción de las dendríticas foliculares, en las cuales solo se ha comprobado una función de unión a inmunocomplejos. A diferencia de estas células presentes en los folículos primarios, las de los centros germinales expresan altos niveles de Fc $\gamma$ RIIb, y de hecho, su expresión puede ser requerida para la activación (El Shikh y cols., 2006). La ausencia de este receptor en estas células de los centros germinales afecta el atrapamiento de los inmunocomplejos y, en consecuencia, una disminución de la respuesta de anticuerpos y la memoria (Qin y cols., 2000; Barrington y cols., 2002).

Adicionalmente, el entrecruzamiento del RCB y el Fc $\gamma$ RIIb en ratones deficientes de SHIP (Ono y cols., 1996), así como la homo-oligomerización del Fc $\gamma$ RIIb, han resultado en un incremento de los niveles de muerte celular. Esta inducción depende de la fosforilación de un residuo de Tyr (probablemente el 269) del Fc $\gamma$ RIIb por la proteína cinasa de Tyr ABL (Pearse y cols., 1999; Tzeng y cols., 2005) y la activación de miembros de la familia Bcl-2 (Carter y Harnett, 2004).

Se ha sugerido que este escenario puede surgir en los centros germinales, en los cuales las células B están en contacto directo con los inmunocomplejos presentados en la superficie de las células dendríticas foliculares. Mientras las células B que generan RCB de mayor afinidad reciben señales del RCB y del Fc $\gamma$ RIIb, aquellas que pierden afinidad por el antígeno solo reciben señales por el Fc $\gamma$ RIIb, y son por lo tanto eliminadas. Esto es un mecanismo que permite la eliminación de células autorreactivas de baja afinidad del repertorio inmaduro de la médula ósea o que se generan *de novo* durante el proceso de maduración de la afinidad.

Otra situación en la cual la célula B virtualmente no expresa RCB y sí altos niveles de Fc $\gamma$ RIIb, es la célula plasmática terminalmente diferenciada. Estas células residen predominantemente en nichos de la médula ósea, donde reciben señales de sobrevivencia de las células del estroma (Radbruch y cols., 2006). Las señales pro-apoptóticas disparadas por el entrecruzamiento exclusivo del Fc $\gamma$ RIIb por los

inmunocomplejos sobre las células plasmáticas, pueden explicar un posible mecanismo de generación de espacio en este órgano linfoide para acomodar la vasta cantidad de células plasmáticas que son necesarias para proteger al organismo de todos los tipos de patógenos (Tzeng y cols., 2005). Los inmunocomplejos generados *de novo* durante una respuesta inmune podrían unirse a las células plasmáticas en la médula ósea e inducir apoptosis en una fracción de estas, dando espacio a las nuevas células plasmáticas generadas. De hecho, las inmunizaciones secundarias con un nuevo antígeno resultan en la disminución en la médula ósea del número de células plasmáticas específicas por el antígeno primario (Xiang y cols., 2007). En concordancia con lo anterior, está la resistencia a la inducción de apoptosis en las células plasmáticas en cepas de ratones propensos a la autoinmunidad, con ausencia o niveles bajos de Fc $\gamma$ RIIb (Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Por lo tanto, el fallo en el control de la persistencia de células plasmáticas con niveles afectados de Fc $\gamma$ RIIb puede contribuir, en última instancia, al desarrollo de enfermedades autoinmunes.

En conjunto, los hallazgos anteriores prueban que el Fc $\gamma$ RIIb es un importante punto de control tardío en la tolerancia periférica humoral. La corrección de sus niveles de expresión puede ser una estrategia prometedora para interferir con el proceso de autoinmunidad patológica y restaurar la tolerancia.

El Fc $\gamma$ RIIb se expresa también en las células pre-B y algunos estudios sugieren una potencial contribución a la tolerancia central (Kato y cols., 2002; Brauweiler y Cambier, 2004), aunque esto no está aún respaldado por experimentos realizados en ratones deficientes del receptor (Fukuyama y cols., 2005).

En ratones y humanos se han identificado tres isoformas del Fc $\gamma$ RIIb. Dos de estas, el Fc $\gamma$ RIIb1 y Fc $\gamma$ RIIb2, codifican proteínas de membrana que tienen un ITIM en el dominio citoplasmático. La isoforma principal, el Fc $\gamma$ RIIb1, se expresa mayoritariamente en las células B, en bajos niveles en los monocitos (Joshi y cols., 2006), y tiene capacidad reducida de endocitar inmunocomplejos. Esta variante contiene una inserción citoplasmática posterior al ITIM, que inhibe la endocitosis al impedir la acumulación del receptor en vesículas recubiertas de clatrina (Miettinen y cols., 1992). Por su parte, el Fc $\gamma$ RIIb2 es la isoforma más expresada en células de

origen mieloide y puede mediar endocitosis (Miettinen y cols., 1989), proceso dependiente de un motivo de dileucinas en su dominio citoplasmático (Hunziker y Fumey, 1994; Matter y cols., 1994). La tercera isoforma, el Fc $\gamma$ RIIb3, es soluble, y se caracteriza por la ausencia del dominio transmembrana y los primeros citoplasmáticos, y puede inhibir la presentación de los complejos antígeno-anticuerpo (Esposito-Farese y cols., 1995).

En general, el Fc $\gamma$ RIIb inhibe la internalización y presentación de antígenos por la célula dendrítica (Kalergis y Ravetch, 2002). Sin embargo, se ha probado que el Fc $\gamma$ RIIb expresado por este tipo de células puede entregar el antígeno a un compartimento no degradativo, lo cual permite su recirculación a la superficie celular, donde podría interactuar con el RCB y activar la célula B (Bergtold y cols., 2005).

### 2.3.2 *Estrategias terapéuticas relacionadas con el Fc $\gamma$ RIIb*

Dado el amplio papel del Fc $\gamma$ RIIb en la regulación de la respuesta inmune, este se ha convertido en el centro de diversas estrategias terapéuticas dirigidas contra tumores, autoinmunidad e inflamación. Entre ellas figura la modulación de la expresión del Fc $\gamma$ RIIb en células efectoras. El aumento *in vitro* de la expresión del receptor en monocitos de pacientes con artritis reumatoide, y la consiguiente disminución de la producción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , siglas del inglés *tumor necrosis factor*) por estas células, propone la modificación de la presencia del Fc $\gamma$ RIIb como una opción para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Adicionalmente, algunas evidencias sugieren que la eficiencia de agentes terapéuticos como la IVIg y el infliximab (AcM anti-TNF $\alpha$ ), usados con éxito en estos padecimientos, es debida a su efecto en la expresión del Fc $\gamma$ RIIb (Bruhns y cols., 2003; Belostocki y cols., 2008).

Otro enfoque terapéutico basado en este receptor se concentra en la modulación de su unión a la molécula de IgG. Este se funda en el mejoramiento de la eficacia de anticuerpos terapéuticos a partir de la disminución de su unión al Fc $\gamma$ RIIb o el aumento de su unión a los Fc $\gamma$ R activadores (Shields y cols., 2001; Lazar y cols., 2006). Una forma de lograr lo anterior consiste en la modulación de los niveles de glicosilación de dichos AcMs (Kalergis y Ravetch, 2002; Dhodapkar y cols., 2005; Ferrara y cols., 2006).

Una tercera aproximación considera directamente el FcγRIIb como un blanco terapéutico. Su implementación implica el uso de AcMs dirigidos contra el receptor que permitan su entrecruzamiento y, con ello, la inducción de apoptosis de células B y plasmáticas en enfermedades como linfoma, mieloma y las autoinmunes (Rankin y cols., 2006; Xiang y cols., 2007; Zhou y cols., 2008). Igualmente se está considerando el uso clínico de anticuerpos biespecíficos que se unan simultáneamente al RCB y el FcγRIIb, lo cual inhibiría las células B autorreactivas (Smith y Clatworthy, 2010). Otra alternativa, que de hecho ha demostrado su eficacia en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico (Werwitzke y cols., 2008), comprende la administración de FcγRIIb soluble, lo que podría inhibir la activación mediada por los inmunocomplejos.

#### 2.3.2.1 *El FcγRIIb y las enfermedades malignas de células B*

Las patologías malignas de las células B comprenden más del 85% de los linfomas diagnosticados, con el linfoma B de células grandes difusas y el linfoma folicular, como los más comunes de todos los linfomas no Hodgkin diagnosticados (Armitage y Weisenburger, 1998).

El FcγRIIb se expresa en altos niveles en linfomas de origen B. Se ha observado una sobreexpresión de la isoforma FcγRIIb2 en algunos foliculares (Callanan y cols., 2000), como resultado de una translocación del cromosoma 1q21 (Chen y cols., 2001). Por su parte, la sobreexpresión de la isoforma FcγRIIb1 ha demostrado aumentar el potencial tumorigénico *in vivo* en experimentos de xenotrasplante (Zusman y cols., 1996). Estudios inmunohistoquímicos han revelado que el 54% de todos los linfomas no Hodgkin son positivos al receptor (Camilleri-Broet y cols., 2004). En este estudio todos los linfomas de zona marginal de bazo y linfocíticos pequeños, y solo la mitad de los foliculares, fueron positivos al receptor.

El 2B6 es un AcM de alta afinidad específico por el FcγRIIb humano. Sus versiones quimérica y humanizada han demostrado la capacidad, *in vitro*, de dirigir la citotoxicidad de células mononucleares de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos a líneas de linfoma B (Rankin y cols., 2006). En un modelo de xenotrasplante de linfoma B humano en ratón, la administración del anticuerpo redujo

la tasa de crecimiento tumoral y la aumentó la supervivencia. Estas evidencias avalan al FcγRIIb como un blanco viable para el tratamiento de desórdenes linfoproliferativos.

Por otro lado, la leucemia crónica de células B es la más común en el mundo occidental (Parker, 1997), y los individuos que la padecen desarrollan frecuentemente enfermedades autoinmunes, lo cual sugiere una desregulación inmune (Kipps, 1997). Se ha observado un incremento en los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de FcγRIIb en células de pacientes con leucemia linfocítica crónica B (Zheng y cols., 2002), lo que lo convierte en una diana potencial para el tratamiento de esta patología. El hallazgo de la expresión del FcγRIIb en células tumorales de tejido no hematopoyético abre una posibilidad al uso de anticuerpos contra este receptor más allá de las enfermedades malignas del tipo B (Cassard y cols., 2002).

#### **2.4 Ingeniería de anticuerpos**

De principios de la década del 80 datan los primeros trabajos referentes a la clonación de secuencias génicas de anticuerpos a partir de ADN obtenido de linfocitos, hibridomas y linfomas, y la manipulación de los genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas para la creación de moléculas con nuevas propiedades (Morrison y cols., 1984; Morrison, 1985). No es hasta finales de esta década que se produce el desarrollo impetuoso de la ingeniería genética de anticuerpos, impulsado fundamentalmente por tres factores: a) la necesidad de mejorar la eficacia terapéutica de los AcMs murinos, b) las limitaciones tecnológicas para obtener AcMs humanos (Wright y cols., 1992) y c) el desarrollo de la Biología Molecular.

De la experiencia terapéutica de cientos de pacientes, se ha podido definir que una alta proporción de los individuos sometidos a altas dosis y esquemas repetidos con AcMs desarrollan una respuesta HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón), que puede limitar la efectividad del tratamiento (LoBuglio y cols., 1989; Blanco y cols., 1997). Esta respuesta está dirigida fundamentalmente a la región constante del anticuerpo, aunque se ha detectado también una cierta respuesta anti-idiotípica (contra la región variable). Este fenómeno puede disminuir la eficiencia del tratamiento al eliminar los AcMs circulantes, lo cual altera sus propiedades farmacocinéticas, y/o causar

hipersensibilidad a los inmunocomplejos o reacciones alérgicas que son dañinas a los pacientes. A ello se suma que los anticuerpos murinos pueden ser poco eficientes en la promoción de funciones efectoras por las células humanas, y que su patrón de glicosilación es diferente al de los anticuerpos humanos, hecho este que parece afectar su biodistribución y transporte (Nose y Wigzell, 1983). Los factores que probablemente influyen en la inmunogenicidad de los AcMs terapéuticos son: las regiones constantes y variables murinas; los alotipos de las inmunoglobulinas humanas y la glicosilación inusual; el método, frecuencia y dosis de administración; el estado inmunitario y de la enfermedad del paciente, así como su haplotipo MHC; la especificidad del anticuerpo, la naturaleza del antígeno (soluble o de superficie celular) y la formación de los inmunocomplejos; la activación del complemento y la unión al receptor del Fc del anticuerpo, y la inflamación con liberación de citocinas (Clark, 2000).

Las primeras modificaciones hechas a los AcMs de ratón mediante la ingeniería genética se dirigieron principalmente a la creación de inmunoglobulinas quiméricas, donde las regiones variables de anticuerpos murinos con potencial terapéutico se asociaron a regiones constantes humanas, en el afán de eliminar la respuesta HAMA y mejorar sus funciones efectoras, conservando la especificidad original (Morrison y cols., 1984; Wright y cols., 1992).

Otros autores han logrado disminuir aún más la inmunogenicidad, insertando los CDRs de los anticuerpos xenogénicos sobre los FRs de inmunoglobulinas humanas (Riechmann y cols., 1988). Este procedimiento trae muchas veces una pérdida de la afinidad por el antígeno. Para resolver este problema un número mínimo de residuos murinos en la región de los FRs son restituidos dentro de los correspondientes FRs humanos (Jones y cols., 1986b; Riechmann y cols., 1988; Kettleborough y cols., 1991; Tempest y cols., 1991; Mateo y cols., 1997).

Las características del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo dependen de su estructura primaria y la relativa disposición de los CDRs, aunque algunos aminoácidos de la región de los FRs intervienen en la unión al antígeno (Davies y cols., 1990; Foote y Winter, 1992; Mateo y cols., 1997). Un grupo de residuos en los

FRs ha sido definido como zona "Vernier", la cual puede ajustar la estructura de los CDRs y ayuda en la fijación al antígeno de una forma fina (Foote y Winter, 1992). Sustituciones de estos residuos pueden ser importantes en la recuperación de la afinidad en los anticuerpos humanizados a los que se les ha injertado CDRs murinos, por lo que esta zona de "Vernier" tiene una consecuencia obvia en el diseño de los anticuerpos humanizados.

Además de las células B, las células T juegan un papel importante en la respuesta inmune. En el 2001, Mateo y colaboradores describieron una nueva metodología para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos (AcQs) sin afectar su afinidad. Los epítomos inmunogénicos hipotéticos de la región variable, frecuentemente presentes en regiones anfipáticas, son identificados mediante análisis *in silico*. Posteriormente, son sujetos a mutagénesis dirigida para sustituir los residuos murinos involucrados por los correspondientes humanos y/o romper los motivos anfipáticos. Una búsqueda de posibles epítomos anfipáticos en la base de datos de Kabat (<http://immuno.bme.nwu.edu/>), reveló la presencia de patrones conservados en las diferentes familias de las secuencias de las regiones variables, lo cual sugiere que el método propuesto podría ser de aplicabilidad general (Roque-Navarro y cols., 2003; Fernandez-Marrero y cols., 2011).

Otras estrategias han creado anticuerpos completamente humanos mediante la selección de regiones variables humanas en bibliotecas de fagos (Kretzschmar y von Ruden, 2002). Por otra parte, el reemplazo de los genes inmunoglobulínicos murinos por su contraparte humana en animales transgénicos, ha permitido que estos produzcan anticuerpos humanos luego de la inmunización (Green, 1999; Tomizuka y cols., 2000). Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos realizados para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos, se ha observado en muchos casos una respuesta HAH (siglas del inglés *human anti-human antibodies*) que persiste luego de la humanización, dirigida fundamentalmente contra la porción idiotípica (Iwahashi y cols., 1999; Ritter, 2000). Incluso, se ha evidenciado que las modificaciones genéticas pueden generar nuevos idiotopos en la variante humanizada. Solo los ensayos clínicos son concluyentes sobre la inmunogenicidad en

pacientes, y esclarecer cuál de estos métodos es el más ventajoso para su aplicación terapéutica.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Medios de cultivo

Para el cultivo de las bacterias se empleó el medio Luria-Bertani (LB) (Sigma, St. Louis, EUA), con o sin antibióticos. Para la selección de colonias recombinantes mediante la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se añadió a las placas con agar X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil- $\beta$ -Dtiogalactopiranosido) (Sigma).

El medio Eagles Modificado de Dulbecco (D'MEM-F12) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFT) inactivado por calor, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100  $\mu$ g/mL), y L-glutamina 2 mM, se utilizó para el cultivo de las líneas celulares NS0, K562, Daudi, MB16F0, F3II, los hibridomas y los transfectomas. Para la selección de las células NS0 transfectadas se añadió al medio histidinol 10 mM (Sigma).

#### 3.2 Microorganismos

Para la clonación y purificación de los vectores plasmídicos se empleó la cepa de *Escherichia coli* TG1 {*supE hsd $\Delta$ 5 thi  $\Delta$ (lac-proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15]*} que se obtuvo de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, EUA).

#### 3.3 Hibridomas y líneas celulares

Los hibridomas productores de los AcMs B7 y 34B7 (Macías y cols., 1999) se obtuvieron en el laboratorio de Hibridomas del CIM. Los hibridomas productores de los AcMs 2.4G2 y M5/114.15.2 fueron gentilmente donados por el Dr Vincenzo Bronte, *Istituto Oncologico Veneto*, Italia.

Se utilizó la línea celular NS0 (mieloma murino no secretor de inmunoglobulinas; Galfrè y Milstein, 1981), y los transfectomas NS0 productores de las cadenas ligeras quiméricas de los AcMs P3 y 1E10 (López-Requena y cols., 2003), para la expresión estable de los anticuerpos recombinantes.

Se utilizaron además las líneas celulares K562 (eritroleucemia humana; Koefler y

cols., 1980), Raji (Linfoma de Burkitt; Pulvertaft, 1964), Daudi (Linfoma de Burkitt; Klein y cols., 1968), MB16F0 (melanoma no metastásico de ratón C57/Bl6; Voulot y cols., 1985) y F3II (tumor mamario murino; Alonso y cols., 1996). Las cuatro primeras se obtuvieron de la ATCC, mientras la F3II fue donada gentilmente por el Doctor Daniel Alonso, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Argentina.

La línea celular A20 (linfoma B murino) y su mutante natural A20IIA1.6 (Jones y cols., 1986a) fueron donadas gentilmente por el Dr. Oscar Burrone (*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology*, Italia). La línea transfectada A20IIA1.6 huIIB1 (Siberil y cols., 2006) fue donada por el Dr. Srinu Kaveri (INSERM, Francia).

### **3.4 Animales**

Los ratones hembras BALB/c y BALB/c *xid*, de seis a ocho semanas de edad, se obtuvieron del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana). Los animales se mantuvieron y alimentaron en condiciones de aislamiento de acuerdo con las directivas estipuladas por el Comité de Animales de Laboratorio del CIM bajo estricto control veterinario. Los estudios se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

### **3.5 Vectores plasmídicos**

Para la secuenciación de las VHs y VLs de los AcMs se empleó el vector pMOS-Blue (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), el cual codifica la  $\beta$ -lactamasa (resistencia a ampicilina). El sitio de inserción se encuentra dentro de la secuencia del gen que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo cual permite la selección de transformantes con el inserto deseado por discriminación de colonias blancas y azules, mediante la inducción del gen por IPTG y el desarrollo del color azul con el sustrato cromogénico X-Gal.

Se utilizaron como vectores de expresión el pAG4622, que contiene el segmento génico de la región constante *kappa* de la cadena ligera humana y confiere resistencia al ácido micofenólico, y el pAH4604, el cual contiene el segmento génico de la

región constante  $\gamma 1$  de la cadena pesada humana, y confiere resistencia al histidinol (Coloma y cols., 1992), gentilmente donados por la Dra. Sherrie L. Morrison de la Universidad de California, Los Angeles (UCLA). Se empleó, además, el pAH4604 (Ala/Ala), versión mutada del pAH4604, donde los residuos de leucina de las posiciones 234 y 235 se sustituyeron por alaninas (Hinojosa y cols., 2010). Estos vectores contienen un promotor de inmunoglobulinas, y para la inserción de los segmentos génicos variables, presentan los sitios *EcoRV-SalI* (pAG4622) y *EcoRV-NheI* (pAH4604). Contienen un sitio único de restricción *PvuI* para su linealización y codifican la  $\beta$ -lactamasa.

### **3.6 Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos se sintetizaron en un equipo Applied Biosystems 381 DNA synthesizer (Amersham Pharmacia, Reino Unido) en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, y se purificaron por PAGE (del inglés *polyacrylamide gel electrophoresis*), en condiciones desnaturalizantes (urea 6 M). Los nucleótidos entre paréntesis indican que existe una mezcla con uno o el otro en esa posición del oligonucleótido.

#### *3.6.1 Oligonucleótidos para la síntesis del ADN complementario y la amplificación de las regiones variables por reacción en cadena de la polimerasa*

Para la síntesis del ADNc de las regiones variables de los AcMs B7 y 34B7 se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

VL: 5'-GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG-3'

VH: 5'-AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC-3'

Para la amplificación de las regiones variables de los AcMs B7 y 34B7 se emplearon los siguientes oligonucleótidos (hibridan en la región 5' de la secuencia codificadora del péptido señal y en el extremo 3', al final del FR4, de ambas cadenas):

VL extremo-5'	5'-GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)TA - 3'
VL extremo-3'	5'-AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC-3'
VH extremo-5'	5'-GGGGTTAACCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT- 3'
VH extremo-3'	5'-GGGGCTAGCGACAGTGACCAGAGTCCCTTG - 3'

CACC: Sitio de unión del ribosoma GATATC: Sitio de restricción *EcoRV*

GTCGAC: Sitio de restricción *SalI* GCTAGC: Sitio de restricción *NheI*

GTAAAC: Sitio de restricción *HincII*

### 3.6.2 Construcción de las variantes mutadas de la VHB7

VHB7Y33: Residuo Thr33 → Tyr (CDR H1)

RCP 1	5'-CATCCAGTGCATG <u>TAGT</u> ATTCAGTGAA- 3' (inverso) 5'-GGGGTTAACCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT-3' (extremo 5')
RCP2	5'-TTCACTGAATACTACATGCACTGGATG- 3' (directo) 5'-GGGGCTAGCGACAGTGACCAGAGTCCCTTG- 3' (extremo 3')
RCPs	5'-GGGGTTAACCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT-3' (extremo 5') 5'-GGGGCTAGCGACAGTGACCAGAGTCCCTTG- 3' (extremo 3')

VHB7STK: Residuos Gly56 → Ser, Ala57 → Thr, Ser58 → Lys (CDR H2)

RCP 1	5'-CTTCTGGTTGTA <u>CTTAGT</u> ACTACCATTGTTAGG- 3'(inverso) 5'-GGGGTTAACCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT-3' (extremo 5')
RCP2	5'-CCTAACAATGGT <u>AGTACT</u> AAGTACAACCAGAAG- 3' (directo) 5'-GGGGCTAGCGACAGTGACCAGAGTCCCTTG- 3' (extremo 3')
RCPs	5'-GGGGTTAACCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT-3' (extremo 5') 5'-GGGGCTAGCGACAGTGACCAGAGTCCCTTG - 3' (extremo 3')

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RCPs: RCP con los productos mezclados de la RCP 1 y la RCP 2.

Los codones mutados se encuentran subrayados.

### **3.7 Genes sintéticos**

Los genes mutados de la VHB7Y33 se sintetizaron químicamente (Genearth GmbH, Regensburg, Alemania). Las variantes H1, H2, H3 y H4 contienen cambios en los CDRs H1, H2, H3, y el FR H3, respectivamente. El diseño de las modificaciones contenidas en cada uno se detallan en la sección *Resultados*.

### **3.8 Anticuerpos monoclonales**

Los AcMs (IgM,  $\kappa$ ) E1 (Alfonso y cols., 1995), P3 (anti-gangliósidos *N*-glicolilados; Vázquez y cols., 1995), y F6 (anti-gangliósido NeuAcGM1; Alfonso y cols., 1995) se purificaron a partir de fluido ascítico por cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Sephacryl S-300 de alta resolución (XK-26/1000) (Pharmacia, Uppsala, Suecia), equilibrada con solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) con NaCl 0,5 M pH 7,4, previa precipitación con sulfato de amonio.

El AcQ C5 (IgG1,  $\kappa$ ) (Roque-Navarro y cols., 2003), se generó en el grupo de Biología Molecular a partir de la región variable del AcM ior-C5, el cual reconoce a una glicoproteína de PM 145-190 kDa en células de tumores colorrectales (Vázquez y Giscombe R. , 1995). Los AcQs (IgG1,  $\kappa$  humanas) 14F7 (anti-gangliósido NeuGc GM3, Roque-Navarro y cols., 2008), 1E10 (López-Requena y cols., 2003), P3 (López-Requena y cols., 2003) y sus mutantes P3S31 y P3S98; 100a (López-Requena y cols., 2007c), así como B7Y33, sus mutantes y el AcQ C5, se obtuvieron de los sobrenadantes de cultivo de los transfectomas correspondientes y se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A (Pharmacia). El anticuerpo Rituximab se adquirió de la firma Roche (Basilea, Suiza).

Los AcMs 2.4G2 (rata, IgG2a; específico por Fc $\gamma$ RII/III murino) y M5/114.15.2 (rata, IgG2b; específico por MHC-II murino), se obtuvieron a partir de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas correspondientes y se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína G.

Las IgGs purificadas se analizaron por SDS (del inglés *sodium dodecyl sulfate*)-PAGE bajo condiciones reductoras.

La especificidad de los anticuerpos purificados se confirmó mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA), y la concentración proteica se estimó por absorbancia a 280 nm y se confirmó por ELISA (Mateo y cols., 2000).

### **3.9 Fragmentos de anticuerpos**

Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de las proteínas PM2 y PM5 de mieloma IgG humano se obtuvieron por digestión de los anticuerpos con pepsina, según Lamoyi y Nisonoff, 1983. Los fragmentos Fc y las inmunoglobulinas no digeridas se removieron por adsorción a proteína A acoplada a sefarosa (Pharmacia). La fracción no adsorbida, que contiene los F(ab')<sub>2</sub>, se dializó extensivamente contra solución salina tamponada con fosfatos (SSTF).

### **3.10 Técnicas de uso corriente en Biología Molecular**

La preparación de las células competentes, la transformación de estas, la purificación del ADN plasmídico en pequeña y gran escala, las reacciones de ligamiento, las electroforesis de ADN en geles de agarosa y poliacrilamida, y las digestiones con enzimas de restricción se hicieron según Sambrook y cols., 1989. Se emplearon juegos de reactivos para la purificación de ADN plasmídico y extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa de la firma Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Las enzimas de restricción, la T4 ADN ligasa y el juego de reactivos para la RCP con la Vent ADN polimerasa, se obtuvieron de la firma New England Biolabs (EUA). Las reacciones de RCP se realizaron en un termociclador PTC-150 (MJ Research Inc., Watertown, EUA).

La extracción del ARN total a partir de los hibridomas productores de los AcMs se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Gibco BRL). Las reacciones de transcripción inversa-RCP se realizaron empleando el juego de reactivos Access RT-PCR (Promega, Madison, EUA).

Las regiones VL y VH amplificadas se insertaron en el vector pMOSBlue para su secuenciación. Esta se realizó por el método de los didesoxinucleótidos (Sanger y cols., 1979), usando el juego de reactivos T7 ADN polimerasa (USB, Cleveland, EUA) de acuerdo con el protocolo descrito por los fabricantes, o utilizando el servicio comercial de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

### 3.11 Análisis inmunogenético

#### 3.11.1 Identificación de los segmentos génicos V, D y J empleados en las regiones variables

Las secuencias de nucleótidos individuales de las regiones variables se analizaron mediante su alineación con secuencias V, D y J de línea germinal contenidas en la base de datos de genes de línea germinal del IgBlast, NCBI (siglas del inglés *National Center for Biotechnology Information*), de acceso en Internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast)). Para determinar si las secuencias habían sufrido el proceso de HMS, se calculó la relación mutaciones de reemplazo aminoacídico sobre mutaciones silentes (R/S) [valor igual o mayor a 2,9 ante una selección positiva de cambios nucleotídicos que afectan la secuencia aminoacídica (Shlomchik y cols., 1987)]. Las secuencias obtenidas se analizaron también empleando el programa BLAST del NCBI, de acceso en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), con el objetivo de identificar las secuencias de mayor similitud. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos enviadas a BLAST se compararon con secuencias contenidas en bases de datos en NCBI (GenBank). Los aminoácidos se numeraron de acuerdo al esquema de Kabat, empleando el servicio de acceso en Internet (<http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>) del grupo de Bioinformática de Andrew C. R. Martin, del *University College of London (UCL)*.

##### 3.11.1.1 Análisis de las secuencias en las regiones de recombinación V-(D)-J

El origen de los nucleótidos en los CDR H3 se analizó según Bangs y cols. (1991). El segmento génico V<sub>H</sub> codifica hasta el codón 94 en la región variable de la cadena pesada. La región codificada por los segmentos génicos D se identificó mediante el análisis por alineación con todos los genes D de línea germinal. Los nucleótidos en las uniones V<sub>H</sub>-D o D-J<sub>H</sub> que pudieron haber sido originados tanto en el gen D como en los genes V<sub>H</sub> o J<sub>H</sub> adyacentes, se asignaron a V<sub>H</sub> o J<sub>H</sub>. Las regiones N se definieron como los segmentos de nucleótidos colindantes con la región D en sus extremos 5' o 3', y que no pudieron ser explicados por ninguno de los segmentos génicos descritos (Alt y Baltimore, 1982). Los genes de línea germinal J<sub>H</sub> y D se tomaron de la base de datos IgBlast accesible en el sitio del NCBI en Internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

En las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligeras, los segmentos  $V_{\kappa}$  donantes generalmente explican las secuencias de estas regiones variables hasta el codón 95 en el CDR L3. Asimismo, la identificación del gen  $J_{\kappa}$  donante permite identificar el extremo 3' del CDR L3, que termina en el codón 97.

### *3.11.2 Agrupamiento de genes de la familia $V_H J558$*

El análisis filogenético de las secuencias génicas de la familia  $V_H J558$  (156 genes) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline)) se realizó con el programa CLUSTALW7 y se visualizó con el programa Tree View (V 1.6.6). La búsqueda de anticuerpos que usan los genes  $V_H$  agrupados se hizo con el *nucleotide-nucleotide* BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

### *3.12 Modelación de la estructura tridimensional de la región variable del B7Y33*

El modelo computacional de la región variable del AcQ B7Y33 se construyó a partir de las secuencias aminoacídicas, empleando el servidor *web* de modelación de anticuerpos WAM, del inglés *Web Antibody Modelling* ((Whitelegg y Rees, 2000); <http://antibody.bath.ac.uk>). El modelo se analizó empleando el programa *Swiss PDB Viewer* (Guex y Peitsch, 1997).

### *3.13 Construcción y expresión de los anticuerpos quiméricos B7, sus mutantes e híbridos*

Los segmentos génicos VLB7 y VHB7, clonados en el vector pMOS-Blue, se digirieron *EcoRV/SalI* (el primero) y *HincII/NheI* (el segundo). Posteriormente, se transfirieron a los vectores de expresión pAG4622 (cadena ligera, digerido *EcoRV/SalI*) y pAH4604 (cadena pesada, digerido *EcoRV/NheI*), respectivamente.

La introducción de las mutaciones en las posiciones 33 (B7Y33) y 56-58 (B7STK) de la cadena pesada del AcQ B7 se realizó mediante la técnica de solapamiento de los productos de la RCP (Kammann y cols., 1989), con el uso del juego de reactivos de la Vent ADN polimerasa. Las bandas clonadas en pMOSBlue se digirieron con las enzimas *HincII/NheI*, y se transfirieron a los vectores de expresión pAH4604 o pAH4604 (Ala/Ala) (cadenas pesadas), previamente digeridos *EcoRV/NheI*.

Los derivados sintéticos de VHB7Y33, clonados en el vector pGA4 (Geneart), se digirieron *HincII/NheI* y se transfirieron al vector de expresión pAH4604 digerido *EcoRV/NheI*.

Las células NS0 se electroporaron, con un pulso de 200 V y 960  $\mu$ F (electroporador GeneZapper; Kodak, New Haven, EUA), con 20  $\mu$ g de los vectores de expresión que contienen las cadenas ligera y pesada, linealizados con la enzima *PvuI*, como ha sido previamente descrito (Mateo y cols., 2000). Para la obtención del AcQ B7 y las variantes mutadas de su región VH se cotransfectaron las construcciones V $\kappa$ B7pAG4622 y aquellas obtenidas a partir del vector pAH4604, mientras para el B7Y33LALA se usó la misma cadena ligera quimérica y la construcción VHB7Y33 pAH4604 (Ala/Ala). La producción de inmunoglobulinas quiméricas se cuantificó por ELISA, partiendo de los sobrenadantes de los clones resistentes (Mateo y cols., 2000). Brevemente: las placas se recubrieron con un antisuero de chivo anti-cadena  $\gamma$  humana (Sigma), durante toda la noche, a 4°C. Después de lavadas con SSTF-T (SSTF con 0,5% Tween 20, pH 7,5), se añadieron las muestras diluidas en SSTF-T-suero fetal de ternera 5% (SSTF-T-SFT). Como segundo anticuerpo se empleó un antisuero de chivo anti-cadena  $\kappa$  humana conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch, WestGrove, EUA). Todas las incubaciones se hicieron durante 1 h, a 37 °C. Tras otro lavado con SSTF-T se desarrolló la reacción con la adición de la solución sustrato (*o*-fenilendiamina en tampón de citrato-fosfato, pH 4,2, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,06%), y se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico. La absorbancia del producto de la reacción se midió a 492 nm en un lector de ELISA (Organon Teknika, Salzburg, Austria). Para la cuantificación, se empleó un patrón de inmunoglobulinas humanas con un rango de concentraciones de 7 a 500 ng/ml. Los clones de mayor productividad de anticuerpos se subclonaron dos veces por dilución limitante.

Para la construcción de los AcQs híbridos, los transfectomas productores de las cadenas ligeras quiméricas de los anticuerpos P3 y 1E10 (López-Requena y cols., 2003) se transfectaron, como ha sido descrito, con el vector para la expresión de la cadena pesada quimérica del anticuerpo B7Y33 para obtener los anticuerpos híbridos VHB7Y33/V $\kappa$ P3 y VHB7Y33/V $\kappa$ 1E10, respectivamente.

### **3.14 Acoplamiento de anticuerpos a biotina**

El acoplamiento de los anticuerpos a biotina se realizó según un procedimiento previamente descrito (Bayer y Wilchek, 1980). El anticuerpo (1 mg/ml) se incubó con 100 µg/ml de biotina *N*-hidroxisuccinimida (Sigma) en tampón borato (0,1 M; pH 8,8) por 4 h a 25°C, en la oscuridad. La reacción se detuvo con la adición de 20 µl de NH<sub>4</sub>Cl 1 M por cada 250 µg de biotina empleada. A continuación las soluciones se dializaron durante 48 h contra SSTF.

### **3.15 Ensayos de interacción entre anticuerpos**

La reactividad de los AcQs generados, frente a las IgMs anti-gangliósidos, se determinó través de un ensayo de ELISA descrito previamente (López-Requena y cols., 2007c). Las placas (Microlon® 600, high binding, Greiner Bio One, Alemania) se recubrieron durante toda la noche, a 4°C, con los correspondientes AcMs murinos a 10 µg/ml, y se bloquearon por 1 h con SSTF-T-seroalbúmina bovina 1% (SSTF-T-SAB). Después de la incubación con los AcQs durante 2 h, a 37°C, las placas se lavaron y se añadió un antisuero de chivo anti-cadena  $\gamma$  humana conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). La solución sustrato consistió en 1 mg/ml de *p*-nitrofenilfosfato en tampón dietanolamina, pH 9.8. La absorbancia del producto de la reacción se midió a 405 nm en un lector de ELISA (Organon Teknika).

Un experimento similar al descrito anteriormente se utilizó para evaluar la unión del B7Y33 o la muteína B7Y33LALA a otros AcQs, con los cuales se recubrieron las placas. Después de bloqueadas, se añadió el B7Y33 o el B7Y33LALA biotinilados, y la reactividad se detectó con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch). De manera semejante se midió la capacidad de autounión de los diferentes AcQs. En este caso, diferentes concentraciones de anticuerpos biotinilados se añadieron a placas recubiertas con las mismas moléculas no biotiniladas. La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch).

Todos los experimentos de interacción entre anticuerpos se hicieron por triplicado.

### **3.16 Ensayos de interacción del B7Y33 con antígenos de naturaleza no inmunoglobulínica**

Las placas de microtitulación antes mencionadas se recubrieron con los antígenos P64K (proteína de *Neisseria meningitidis*, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB, La Habana), toxoide tetánico (TT) (Instituto Finlay, La Habana), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr, siglas del inglés *human epidermal growth factor*) (CIGB), insulina humana (Novo Nordisk A/S, Dinamarca), insulina bovina (Gibco BRL) y transferrina bovina (Gibco BRL), a 10 µg/ml en tampón de recubrimiento, durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron con SSTF-T, y se bloquearon con SSTF-T-SAB. Se añadieron los AcQs purificados y después del lavado con SSTF-T, se utilizó como segundo anticuerpo un antisuero de chivo anti-cadena humana  $\gamma$  conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). Como criterio de reconocimiento positivo se estableció el valor de absorbancia superior al doble del correspondiente al anticuerpo irrelevante, y mayor a 0.2 unidades de absorbancia.

### **3.17 Inoculación de ratones con las IgMs anti-gangliósidos y los AcQs**

Con el objetivo de caracterizar la respuesta de anticuerpos inducida por la coadministración de IgMs anti-gangliósidos (AcMs P3, E1 y F6), y el B7Y33 o una de sus variantes (VHB7Y33/VκP3), se inocularon ratones BALB/c o BALB/c *xid* por vía subcutánea, a intervalos de 14 días, con dos dosis de 80 µg de los AcQs y 50 µg de las IgMs, en SSTF. Los anticuerpos murinos y quiméricos se administraron en una mezcla única, o de manera independiente por diferentes flancos del animal. En uno de los experimentos se inyectó la mezcla solo en una de las dosis, mientras la restante consistió exclusivamente en la IgM murina. Las extracciones de los sueros se realizaron antes del inicio del protocolo y siete días después de cada dosis. Como control se empleó el AcQ C5.

### **3.18 Ensayo de medición de anticuerpos específicos en el suero de los ratones**

Se determinó por ELISA la presencia en el suero de los ratones de anticuerpos IgG específicos por las IgMs inoculadas. Las placas se recubrieron durante toda la noche, a 4°C, con la IgM correspondiente, a 10 µg/ml. Después de lavadas con SSTF y bloqueadas con SSTF-T-SAB, se añadieron los sueros diluidos 1:50 en SSTF-T-SAB,

los cuales se incubaron 2 h a 37°C. Como segundo anticuerpo se empleó un antisuero de chivo anti-cadena  $\gamma$  murina conjugado a fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch). Se asumió como respuesta positiva el valor de absorbancia superior al doble del correspondiente al suero preinmune. Las mediciones se hicieron por triplicado.

### ***3.19 Citometría de flujo***

En todos los ensayos de citometría de flujo los conjugados se usaron a las concentraciones sugeridas por los fabricantes. Los análisis se llevaron a cabo empleando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, EUA). Las muestras se caracterizaron en cuanto a la intensidad de fluorescencia emitida por los fluoróforos con los que se marcaron, y en cuanto a la granulosidad y al tamaño de las células. Estos dos últimos parámetros están dados por la dispersión del láser hacia los lados (SSC, siglas del inglés *side scatter*) y hacia delante (FSC, siglas del inglés *forward scatter*), respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa WinMDI 2.8. En cada medición se adquirieron  $10^4$  células. Los experimentos se repitieron, al menos, dos veces.

#### ***3.19.1 Aislamiento de linfocitos de bazo de ratones BALB/c no inmunizados***

Para la obtención de los linfocitos de bazo de ratones BALB/c no inmunizados, se perfundió este órgano con SSTF. La suspensión celular se centrifugó, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de solución de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M,  $\text{KHCO}_3$  10 mM,  $\text{EDTANa}_2$  0,1 mM, pH 7.2), en la que se incubaron a 25°C durante 5 min. Después se centrifugaron y se resuspendieron en una solución de SAB al 2% en SSTF (SSTF-SAB), a una densidad de  $10^6$  células/ml.

#### ***3.19.2 Aislamiento de células mononucleares humanas***

La sangre humana utilizada se obtuvo del Banco de Sangre del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ, La Habana) (donante sano) o de pacientes diagnosticados con desórdenes proliferativos de células B (leucemia linfocítica crónica B y leucemia linfoblástica aguda B), del Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana. Para el aislamiento de las células mononucleares del

donante sano o de los pacientes con leucemia linfocítica crónica B se procesaron muestras de sangre periférica, mientras que para el paciente de leucemia linfoblástica aguda B, aspirado de médula ósea.

Se colectaron 10 ml de sangre o aspirado de médula ósea en tubos BD Vacutainer™ (Becton Dickinson, NJ, EUA) que contienen heparina, y se diluyeron en igual volumen de SSTF. La sangre diluida se añadió a 1/3 del volumen de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Pharmacia Biotech), y se centrifugó 20 min a 2000 rpm, a 25°C. Las células contenidas en la interfase se lavaron con SSTF y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. Finalmente, se resuspendieron en SSTF-SAB a una densidad de 10<sup>6</sup> células/ml.

### *3.19.3 Reconocimiento de linfocitos B y líneas celulares*

Los esplenocitos de ratón BALB/c, y las líneas NS0, Raji, Daudi, MB16F0 y F3II (10<sup>6</sup>) se incubaron con los AcQs a 4°C durante 30 min y se lavaron con SSTF-SAB. Posteriormente, se mantuvieron en iguales condiciones con una preparación policlonal de F(ab')<sub>2</sub> de conejo anti-IgG humana conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, acrónimo del inglés *fluorescein isothiocyanate*) (Dako, Dinamarca), para detectar la unión de los AcQs, y un anticuerpo anti-B220 de ratón, conjugado a ficoeritrina (PE, acrónimo del inglés *phycoerythrin*) (BD Biosciences Pharmingen, NJ, EUA), para la identificación de las células B.

Las células mononucleares humanas y las células K562 (10<sup>6</sup>) se incubaron durante 30 min a 4°C con los AcQs biotinilados. Después de lavadas con SSTF-SAB se mantuvieron a 4°C durante 20 min con estreptavidina conjugada a PE (BD Biosciences Pharmingen) y, en el caso de las células mononucleares humanas, un anticuerpo anti-CD19 humano conjugado a FITC (AbD Serotec, Raleigh, EUA). Los AcQs C5, 1E10 y P3 se usaron como controles de isotipo.

### *3.19.4 Expresión del FcγRII en líneas celulares de ratón*

Para evaluar la expresión del FcγRII en tres líneas celulares murinas (NS0, MB16F0 y F3II), se incubaron 10<sup>6</sup> células con el AcM 2.4G2. Después de lavadas con SSTF-SAB se les añadió un anticuerpo de chivo anti-inmunoglobulinas de rata, biotinilado

(BD Biosciences Pharmingen) y, después de un lavado intermedio, estreptavidina conjugada a FITC (BD Biosciences Pharmingen). En todos los pasos las incubaciones se realizaron a 4°C durante 30 min.

### *3.19.5 Ensayos de inhibición*

Un millón de células de bazo de ratón BALB/c se incubaron con concentraciones crecientes de un antisuero de burro específico por IgM (anti-cadena  $\mu$  de ratón; Jackson Immunoresearch) durante 30 min a 4°C. Después de un lavado con SSTF-SAB, las células se incubaron con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de B7Y33 biotinilado durante 30 min, a la misma temperatura. La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a FITC (BD Biosciences Pharmingen). Un anticuerpo anti-B220 (BD Biosciences Pharmingen) conjugado a PE se utilizó para identificar la población de células B.

El ensayo de inhibición con un anticuerpo específico por el Fc $\gamma$ RII de ratón se realizó incubando esplenocitos de ratón BALB/c o células NS0 con el anticuerpo 2.4G2, por 30 min a 4°C. A continuación, las células se incubaron con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de B7Y33 biotinilado en iguales condiciones. La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a PE (BD Biosciences Pharmingen). El porcentaje de inhibición se calculó como sigue:

% inhibición=  $[(\% \text{ unión sin inhibidor} - \% \text{ unión con inhibidor}) / \% \text{ unión sin inhibidor}] * 100$ . En el experimento con células de bazo se usó un anticuerpo anti MHC-II como control negativo de inhibición. En el caso de las células NS0, el AcQ 14F7 biotinilado, específico por el gangliósido NeuGcGM3, se usó como control negativo.

Las células humanas K562 y Raji se incubaron primeramente con el B7Y33 a 15  $\mu\text{g/ml}$  (K562) o 5  $\mu\text{g/ml}$  (Raji), y posteriormente con el anticuerpo comercial AT10 conjugado a PE (AbD Serotec), específico por el Fc $\gamma$ RII humano, siempre durante 30 min a 4°C. La unión del AT10 se evaluó también en ausencia del B7Y33. El AcQ Rituximab se utilizó como control negativo.

### *3.19.6 Experimento de unión por complementariedad molecular*

Las muteínas H3 o H4 se mezclaron con el AcQ B7Y33LALA en diferentes proporciones (1:10, 10:1 y 1:1, donde 1: 2,5 µg/ml; 10: 25 µg/ml) y se incubaron durante 30 min a 37°C. Las mezclas se añadieron a esplenocitos de ratón BALB/c y mantuvieron a 4°C por 30 min. La reactividad se midió con una preparación policlonal de F(ab')<sub>2</sub> de conejo anti-IgG humana conjugado a FITC (Dako). Un anticuerpo anti-B220 conjugado a PE (BD Biosciences Pharmingen) se usó para marcar los linfocitos B.

### *3.20 Análisis estadístico*

Para la comparación entre los diferentes grupos experimentales, se determinó previamente la normalidad de la distribución de los datos, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianza, mediante la prueba de Bartlett. Como en los casos analizados no existe distribución normal ni homogeneidad de varianza, aun después de diferentes transformaciones, se aplicó el método no paramétrico Kruskal-Wallis y la post-prueba de Dunn. Todas estas técnicas están contenidas en el programa GraphPad Prism versión 5.03 de 2010, para Windows.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análisis inmunogenético de los AcMs B7 y 34B7

#### 4.1.1 Origen de los genes $V_K$ y $V_H$ de los AcMs B7 y 34B7

Los AcMs anti-idiotipos  $\alpha$  B7 y 34B7 comparten un alto grado de multiespecificidad y de conectividad idiotípica, propiedades similares a los anticuerpos que forman parte del repertorio neonatal natural (Holmberg y cols., 1984b; Avrameas, 1991). Por lo tanto, algunas analogías inmunogenéticas podrían esperarse entre estos y aquellos.

Los genes de la VH y VL de los AcMs B7 y 34B7 se aislaron, amplificaron y clonaron en el vector pMOSBlue para su secuenciación.

Las secuencias correspondientes a los genes  $V_L$  ( $V_K$ ) del B7 y el 34B7 (Fig. 2) exhiben sustituciones nucleotídicas cuando son comparadas con los genes de línea germinal de los cuales presumiblemente se originaron (Tabla 2).

**Tabla 2:** Origen potencial de los genes V de los AcMs B7 y 34B7, según comparaciones con genes de línea germinal de la base de datos IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

Genes V	Base de datos IgBlast (genes V de línea germinal)		
	Nombre del gen de origen	Número de acceso en la base de datos GenBank	% identidad
$V_H$ B7	J558.5	AF303836	96,2
$V_K$ B7	21-7	K02158	98
$V_H$ 34B7	J558.7	AF3838	94
$V_K$ 34B7	19-13	J00569	95,4

El gen  $V_K$ B7 (del codón 1 al 95) deriva del gen de línea germinal 21-7 (Heinrich y cols., 1984) con el que comparte un 98% de identidad. Los cambios con respecto a dicho gen ocurren en los FRs y en los CDRs. En estos últimos solo existen reemplazos, a diferencia de los FRs, donde no hay prevalencia de un tipo particular de mutación (Fig. 2 y Tabla 3).

Por otra parte, el gen  $V_K$ 34B7 proviene probablemente del gen de línea germinal 19-13 (Hawley y cols., 1982; Hawley y cols., 1984) (Tabla 2). Las mutaciones que lo originaron conducen a ocho cambios aminoacídicos que se distribuyen en FRs y CDRs. En ambas regiones los reemplazos superan las mutaciones silentes, aunque en

los FRs los cambios conservativos son mayoría. La relación R/S en estas zonas supera el valor de 2,9 (FRs: 5 y CDRs: 2/0), que se asume como criterio para indicar la selección positiva de cambios nucleotídicos que afectan la secuencia aminoacídica (Shlomchik y cols., 1987).

**Tabla 3:** Distribución y clasificación de las mutaciones en las regiones  $V_H$  y  $V_K$  de los AcMs B7 y 34B7, al compararse con los potenciales genes de línea germinal de origen.

Gen	Región		M	S	R		R/S
					C	NC	
V <sub>H</sub> B7	FR	FR1	2	1	0	1	4/3
		FR2	1	0	1	0	
		FR3	4	2	1	1	
	CDR	CDR1	0	0	0	0	3
		CDR2	4	1	1	2	
V <sub>K</sub> B7	FR	FR1	1	1	0	0	1
		FR2	0	0	0	0	
		FR3	1	0	0	1	
	CDR	CDR1	1	0	1	0	2/0
		CDR2	1	0	1	0	
V <sub>H</sub> 34B7	FR	FR1	6	2	2	2	5
		FR2	1	0	1	0	
		FR3	5	0	2	3	
	CDR	CDR1	1	0	0	1	3
		CDR2	3	1	1	1	
V <sub>K</sub> 34B7	FR	FR1	3	0	2	1	5
		FR2	0	0	0	0	
		FR3	3	1	2	0	
	CDR	CDR1	1	0	1	0	2/0
		CDR2	1	0	0	1	

**M:** total de mutaciones; **R:** reemplazos; **S:** mutaciones silentes; **C:** cambios conservativos;

**NC:** cambios no conservativos

Las V<sub>H</sub>s B7 y 34B7 usan genes de la familia J558. El gen V<sub>H</sub>B7 muestra un 96,2% de identidad con el gen de línea germinal J558.5 y se diferencia de este en siete residuos aminoacídicos (Fig. 3). El análisis cuantitativo y cualitativo de las mutaciones indica un patrón característico de anticuerpos hipermutados. Hay una

prevalencia de reemplazos, sobre todo no conservativos, en los CDRs, con un R/S de

3. En las regiones FRs esta relación es inferior a dicho valor (Tabla 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
VKB7	GAC	ATT	GTG	CTG	ACA	CAG	TCT	CCT	GCT	TCC	TTA	GCT	GTA	TCT	CTG	GGG	CAG	AGG	GCC	ACC
21.7	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VKB7	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T
21.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	CDR1																			
	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Vkb7	ATC	TCA	TGC	AGG	GCC	AGC	CAA	AGT	GTC	AGT	ACA	TCT	ACC	TAT	AGT	TAT	ATG	CAC	TGG	TAC
21.7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...
VKB7	I	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	T	S	T	Y	S	Y	M	H	W	Y
21.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.
	CDR2																			
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
VKB7	CAA	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	AAG	AAT	GCA	TCC	AAC	CTA	GAA	TCT
21.7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	...	...	...
VKB7	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	N	A	S	N	L	E	S
21.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.
	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
VKB7	GGG	GTC	CCT	GCC	AGG	TTC	AGT	GAC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT
21.7	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VKB7	G	V	P	A	R	F	S	D	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H
21.7	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	
VKB7	CCT	GTG	GAG	GAG	GAG	GAT	ACT	GCA	ACA	TAT	TAC	TGT	CAG	CAC	AGT	TGG	GAG	GTT	CCG	
21.7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T
VKB7	P	V	E	E	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	S	W	E	V	P	
21.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
VK34B7	GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CAA	GAA	TTC	TTG	TCC	ACA	TCA	TTA	GGA	GAC	AGG	GTC	AGC
19.13	...	...	...	...	...	...	...	...	A	...	A	...	...	...	G	...	...	...	...	...
VK34B7	D	I	V	M	T	Q	S	Q	E	F	L	S	T	S	L	G	D	R	V	S
19.13	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	M	.	.	.	V	.	.	.	.	.
	CDR1																			
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
VK34B7	ATC	ACC	TGC	AAG	GCC	AGT	CAG	AAT	GTG	GGT	AGT	GCT	GTA	GCC	TGG	TAT	CAA	CAG	AAA	CCA
19.13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...
VK34B7	I	T	C	K	A	S	Q	N	V	G	S	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
19.13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	CDR2																			
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
VK34B7	GGA	CAA	TCT	CCT	AAA	CTA	CTG	ATT	TAC	TCG	GCA	TCC	AAT	CGG	TAC	ATT	GGA	GTC	CCT	GAT
19.13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...
VK34B7	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	N	R	Y	I	G	V	P	D
19.13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
VK34B7	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAA	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	ACC	AAT	ATG	CAG	TCT
19.13	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...
VK34B7	R	F	T	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	T	N	M	Q	S
19.13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94						
VK34B7	GAA	GAC	CTG	GCA	GAC	TAT	TTC	TGC	CAG	CAA	TAT	AGC	AGC	T--	-CG					
19.13	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	..AT	C.T					
VK34B7	E	D	L	A	D	Y	F	C	Q	Q	Y	S	S	S						
19.13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y						

**Figura 2:** Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de las regiones  $V_k$  de los AcMs B7 y 34B7, comparadas con las secuencias génicas de línea germinal más similares, según la base de datos IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Los puntos representan identidad. Los CDRs están señalados con líneas continuas y la numeración se hizo según Kabat, 1991.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
VHB7	GAG	GTC	CAG	CTG	CAA	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	ACT	TCA	GTC	AAG	ATA
J558.5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G...	...	..G	...	...
VHB7	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	T	S	V	K	I
J558.5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
VHB7	TCC	TGC	AAG	ACT	TCT	GGA	TAC	ACA	TTC	ACT	GAA	TAC	ACC	ATG	CAC	TGG	ATG	AAG	CAG	AGC
J558.5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G...	...	...	...
VHB7	S	C	K	T	S	G	Y	T	F	T	E	Y	T	M	H	W	M	K	Q	S
J558.5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59
VHB7	CAT	GGA	AAG	AGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	GGT	GTT	AGT	CCT	AAC	AAT	GGT	GGT	GCT	AGT	TAC
J558.5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	.A.	...	...	...	...	...	A..	..C	...
VHB7	H	G	K	S	L	E	W	I	G	G	V	S	P	N	N	G	A	S	Y	
J558.5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	.	.	T	.
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
VHB7	AAC	CAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTA	GAC	AAG	TCC	TCC	AAC	ACA	GCC	TAC
J558.5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G.	...	...	...
VHB7	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	N	T	A	Y
J558.5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.
	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94		
VHB7	ATG	GAG	CTC	CGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAC	GAT	TCT	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCA	AGG		
J558.5	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	..A	...	...	...	...	...	..A		
VHB7	M	E	L	R	S	L	T	S	D	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R		
J558.5	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
VH34B7	GAG	GTC	CAG	CTA	CAA	CAG	TCT	GGA	CCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CGT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG	ATG
J558.7	...	...	...	..G	...	...	..T	...	...	..G	...	C..	..G	..C	...	...	...	...	...	...
VHB34B7	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	R	G	A	S	V	K	M
J558.7	.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	L	R	P	.	.	.	.	.	.
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
VH34B7	TCC	TGT	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACA	TTC	ACT	GAC	TAC	TCC	ATG	GAC	TGG	GTG	AGG	CAG	AGC
J558.7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..A	...	...
VH34B7	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	S	M	D	W	V	R	Q	S
J558.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	K	.	.
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59
VH34B7	CAT	GGA	GAA	AGC	TTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CGT	GTT	AAT	CCT	TTC	AAT	GGT	GTT	ACT	AGT	TAC
J558.7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	..A	...	..C
VH34B7	H	G	E	S	F	E	W	I	G	R	V	N	P	F	N	G	V	T	S	Y
J558.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	G	.	.	.
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
VH34B7	AAC	CAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTT	GAC	CAG	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TTC
J558.7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	..A	...	...	...	...	...	..A	...
VH34B7	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	Q	S	S	S	T	A	F
J558.7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	K	.	.	.	.	.	Y
	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94		
VH34B7	ATG	GAG	CTC	AAC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAT	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	ACA	AGA		
J558.7	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	G..	...		
VH34B7	M	E	L	N	S	L	T	S	D	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R		
J558.7	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	A	.		

**Figura 3:** Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de las regiones V<sub>H</sub> de los AcMs B7 y 34B7, comparadas con las secuencias génicas de línea germinal más similares, según la base de datos IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Los puntos representan identidad. Los CDRs están señalados con líneas continuas y la numeración se hizo según Kabat, 1991.

Similar comportamiento tiene el gen V<sub>H</sub>34B7, que muestra un 94,5% de identidad con su posible gen de origen, el J558.7 (Haines y cols., 2001). Difiere de este en 13 residuos (Fig. 3), y tanto en FRs como en CDRs exhibe un R/S superior a 2,9. Mientras en los FRs predominan los cambios conservativos y silentes, en los CDRs son mayoría las sustituciones no conservativas (Tabla 3).

Resalta el hecho de que el número de mutaciones en la V<sub>H</sub> de ambos anticuerpos es mayor al de ambas V<sub>L</sub>, lo que se ha descrito en la literatura (Chen y cols., 1992; David y Zouali, 1995), aunque no sea la generalidad (Milstein, 1993). En su conjunto, estos resultados apuntan a que ambos anticuerpos son hipermutados.

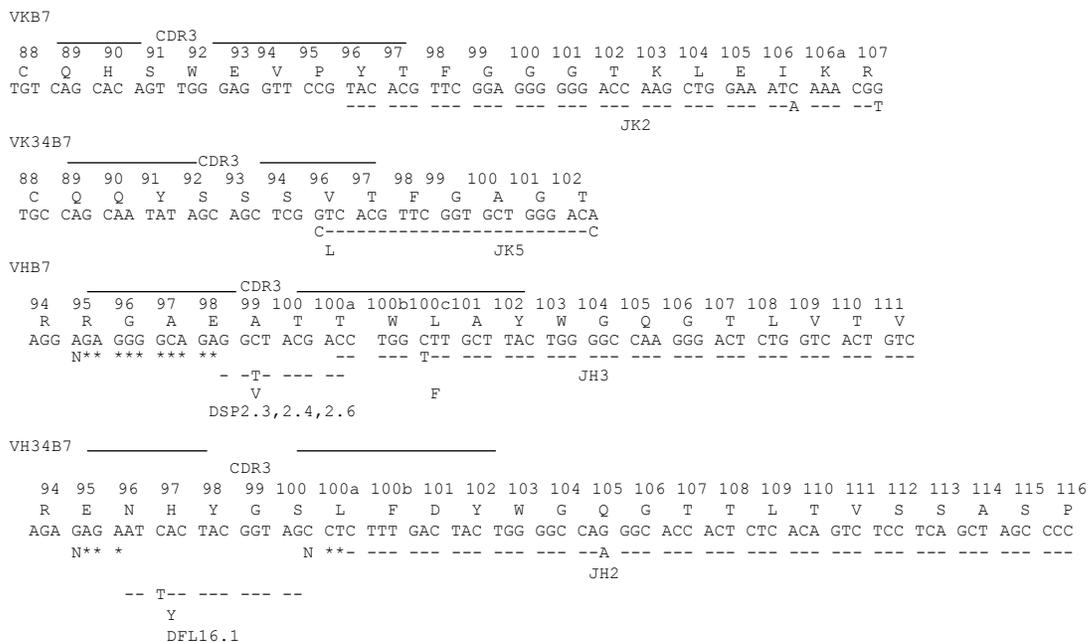
#### 4.1.2 Análisis del CDR3 y el FR4

Parte del CDR3 y el FR4 de las cadenas ligeras del B7 y el 34B7 usan los segmentos génicos J<sub>κ</sub>2 y J<sub>κ</sub>5, respectivamente (Fig. 4). Las mutaciones en el FR4 de V<sub>κ</sub>B7 no dan lugar a reemplazos. Por su parte, el cambio en el CDR3 de V<sub>κ</sub>34B7 origina una sustitución, a diferencia del ocurrido en FR4, donde la mutación no significó una variación en la secuencia aminoacídica.

La secuencia nucleotídica codificante de las posiciones 95 a 113 de la región VHB7 revela que el CDR H3 y FR 4 se originaron del rearrreglo de los segmentos DSP2.3, DSP2.4 o DSP2.6 con el segmento génico J<sub>H</sub>3, y la adición de nucleótidos N.

En el caso del AcM 34B7, para esta zona se usan los segmentos génicos DFL16.1 y J<sub>H</sub>2, al igual que los nucleótidos N. Dos de los cambios nucleotídicos en el CDR3 del gen VHB7 y uno en el CDR3 del VH34B7 condujeron a reemplazos, mientras uno adicional, en FR4 del VH34B7, fue silente. En conjunto, estas evidencias refuerzan la ocurrencia de mutaciones somáticas en la generación de estos anticuerpos.

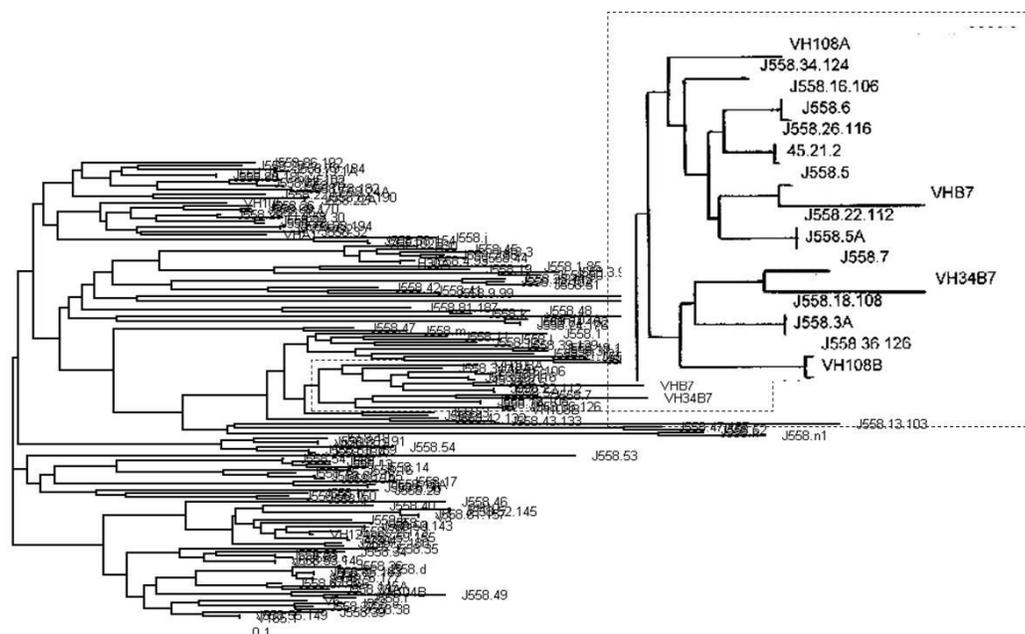
Con un origen genético diferente, los CDRs H3 de ambos anticuerpos no muestran una regularidad en la naturaleza química de los residuos que los componen.



**Figura 4:** Posible origen de los CDRs 3 y FRs 4 de las cadenas ligera y pesada de los AcMs B7 y 34B7. Los nucleótidos N se representan con asteriscos (\*). Las líneas discontinuas indican homología con los genes J y D correspondientes. Las secuencias de línea germinal J y D provienen de la base de datos de Kabat, 1991.

#### 4.1.3 Agrupamiento de genes de la $V_H$ J558

Los genes de la familia J558 se agruparon de acuerdo a la similaridad de sus secuencias. Como evidencia el dendrograma evolutivo (Fig. 5), existe un subgrupo formado por genes  $V_H$  expresados por los AcMs B7 y 34B7 y sus potenciales genes de línea germinal de origen. En este grupo también se encuentran los genes  $V_H$ 108A (Givol y cols., 1981), J558.6 (Haines y cols., 2001), J558.34.124, J558.16.106, J558.26.116, J558.22.112, J558.18.108, J558.36.126 (Johnston y cols., 2006), 45.21.2, J558.5A, J558.3A y VH108B (Chang y Mohan, 2005). El análisis de anticuerpos cuyas secuencias génicas de  $V_H$  son altamente similares a estos genes (hasta un 94%) no mostró prevalencia de inmunoglobulinas conectadas idiotípicamente, lo cual no permite asociar la polirreactividad idiotípica a un subconjunto particular de la familia  $V_H$  J558 (Tabla 4).



**Figura 5:** Dendrograma evolutivo que muestra el análisis de las secuencias V<sub>H</sub> de genes de línea germinal de la familia J558 (156 secuencias). El árbol evolutivo se obtuvo con el programa CLUSTALW7 y se visualizó con el Tree View (V1.6.6). El subgrupo en el cual se incluyen los genes V<sub>H</sub>B7 y 34B7 se encierra en un cuadrado de líneas discontinuas.

**Tabla 4:** Frecuencia de anticuerpos anti-idiotipo codificados por genes del subgrupo de la familia V<sub>H</sub> J558 o sus derivados más similares (mayor de un 94% de identidad de sus secuencias nucleotídicas).

Gen	Número de secuencias (>94% homología)	Anticuerpos anti-idiotipos
VH 108A	32	0
J558.34.124	30	0
J558.16.106	31	0
J558.34.124	31	2
J558.6	36	0
J558.26.116	42	3
45.21.2	46	4
J558.22.112	33	1
J558.5A	39	0
J558.18.108	31	0
J558.3A	44	0
J558.36.126	38	0
VH 108B	37	0

#### 4.2 *Diseño de variantes mutadas de la VHB7*

Datos publicados por Macías y colaboradores mostraron que los AcM B7 y 34B7 son altamente multiespecíficos (Macías y cols., 1999). A diferencia de sus genes  $V_H$ , que derivan de genes de línea germinal pertenecientes a la familia J558, los que les dan origen a sus respectivas  $V_L$  comparten un bajo porcentaje de identidad (65%).

Teniendo en cuenta lo anterior, y el papel determinante de las cadenas pesadas en la especificidad de algunos anticuerpos anti-idiotipo generados por nuestro grupo (López-Requena y cols., 2007b), se decidió evaluar la contribución de la región VH a la reactividad de inmunoglobulinas de este tipo. Para realizar este estudio se escogió el AcM B7.

Con el propósito de hacer un mapeo preliminar del sitio de unión de dicho anticuerpo se diseñaron mutaciones para investigar, en particular, la posible participación de los CDRs H1 y H2. Se propuso una sola mutación en el CDR H1, para la cual se seleccionó la posición H33, que ocupa una posición central en el sitio de unión del anticuerpo. Se sustituyó el residuo de Thr por otro de Tyr, ya que es un cambio no conservativo, e introduce una alteración significativa en la topografía local del sitio de unión. Además, la Tyr es frecuente en esa posición. Este cambio caracterizaría a la variante mutada B7Y33.

En el caso del CDR H2, se decidió introducir cambios en las posiciones 56-58, que identificarían la muteína B7STK. Este segmento está comprendido en la región 50-73, la cual se considera la responsable de las interacciones homofílicas en anticuerpos de diferentes especificidades de la familia  $V_H$ S107 (Kaminski y cols., 1999). En este caso, se sustituyeron los residuos escogidos por otros que cumplían los siguientes requerimientos:

- diferente naturaleza química (cambio no conservativo),
- alta frecuencia de aparición en la base de datos de Kabat para las posiciones seleccionadas, para asegurar la viabilidad estructural de la construcción.

De esta manera, para la zona 56-58 de la VHB7 se propusieron los siguientes cambios: Gly 56 por Ser; Ala 57 por Thr y Ser 58 por Lys.

Los cambios sugeridos para obtener las dos variantes mutadas se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5:** Mutaciones propuestas en la VH del AcM B7.

Variantes	Posiciones			
	H33	H56	H57	H58
VHB7	Thr	Gly	Ala	Ser
VHB7Y33	<b>Tyr</b>	-	-	-
VHB7STK	-	<b>Ser</b>	<b>Thr</b>	<b>Lys</b>

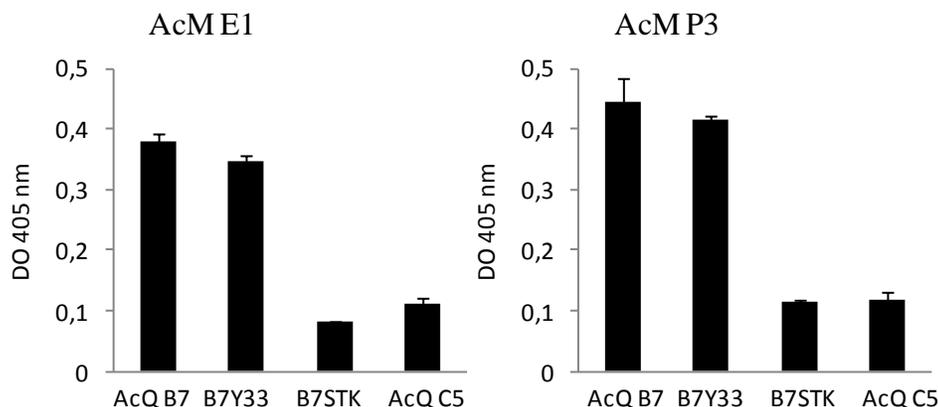
Las regiones variables del AcM B7 salvaje y sus variantes mutadas se expresaron como AcQs recombinantes, para disponer así de moléculas más eficaces para su uso potencial en humanos, y acometer un estudio más profundo de caracterización a nivel molecular de la reactividad de este anticuerpo.

#### 4.3 *Obtención de los AcQs B7 y las variantes mutadas B7Y33 y B7STK*

Los segmentos génicos de las VH y VL del AcM B7 aislados, se digirieron y clonaron en los vectores de expresión que contienen las regiones constantes humanas correspondientes. Se procedió de manera similar con los genes mutados VHB7Y33 y VHB7STK.

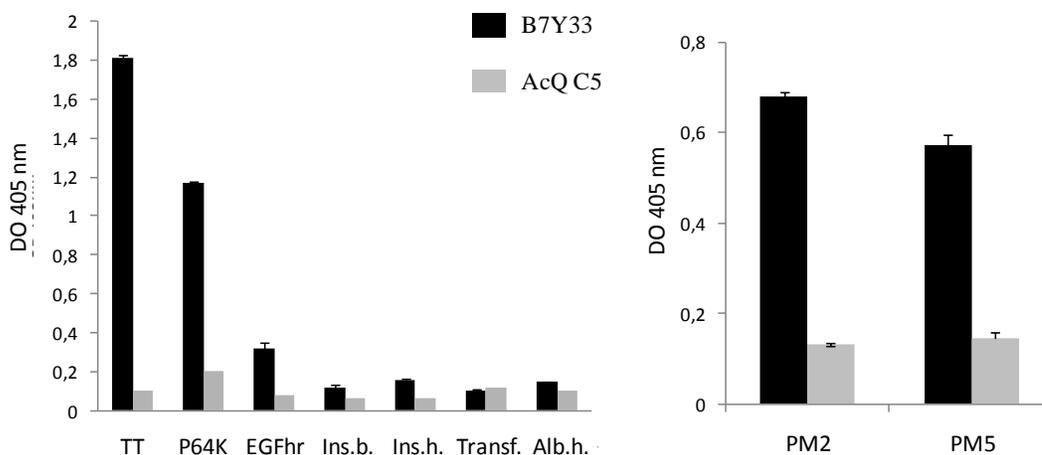
Se obtuvieron transfectomas estables de células NS0 que producen 0,5 µg/ml del AcQ B7 y 12 µg/ml de los AcQs B7Y33 y B7STK, en cultivo estacionario.

El estudio de la especificidad antigénica se demostró por ELISA. El B7Y33, al igual que el AcQ B7, interactúa con los AcMs E1 y P3. Este resultado constituye una primera evidencia del carácter polirreactivo del B7Y33. Sin embargo, el B7STK pierde dicho reconocimiento (Fig. 6), lo que apunta a una participación del CDR H2 en esas interacciones.



**Figura 6:** Reactividad del AcQ B7 y sus variantes mutadas. Las placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml de los AcMs E1 y P3 y se incubaron con los sobrenadantes de los transfectomas a 2 µg/ml de AcQs. La reactividad se detectó con un antisuero anti-cadena  $\gamma$  humana conjugado a fosfatasa alcalina. El AcQ C5 se usó como anticuerpo irrelevante.

Otra evidencia de la conectividad idiotípica del B7Y33 es su interacción con los fragmentos  $F(ab')_2$  de dos proteínas de mieloma IgG humano (Fig. 7). Este anticuerpo manifiesta, además, la propiedad de multiespecificidad descrita para el AcM B7 (Macías y cols., 1999), al reconocer disímiles antígenos, sobre todo, el toxoide tetánico y la proteína P64K de *Neisseria meningitidis* (Fig. 7).



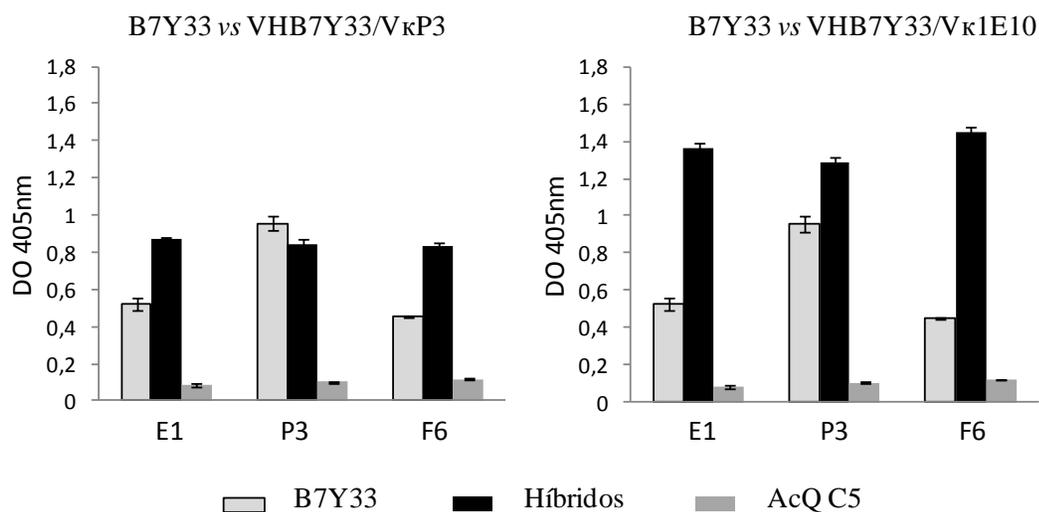
**Figura 7:** Multiespecificidad del AcQ B7Y33. Placas recubiertas con 10 µg/ml de toxoide tetánico (TT), P64K, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr), insulina bovina (Ins. bov.), insulina humana (Ins. hum.), transferrina (Transf.) y albúmina humana (Alb. h.) (izquierda), o los  $F(ab')_2$  de las proteínas de mieloma PM2 y PM5 (derecha), se incubaron con 10 µg/ml de B7Y33. La reactividad se detectó con un antisuero anti-cadena  $\gamma$  humana conjugado a fosfatasa alcalina. El AcQ C5 se usó como anticuerpo irrelevante.

Considerando que el AcQ B7Y33 retiene las propiedades inmunoquímicas descritas para el AcM B7, y se expresa eficientemente, se decidió continuar el estudio con dicha variante mutada, en lugar del AcQ B7, cuyo transfectoma resultó altamente inestable, de manera similar a como se comporta el hibridoma productor del AcM B7 murino (Macías A., comunicación personal).

#### 4.4 *Influencia de las cadenas pesada y ligera del B7Y33 en su polirreactividad idiotípica*

##### 4.4.1 *Reactividad de los AcQs híbridos*

Con el objetivo de profundizar en el estudio de las características de la región variable que explican la conectividad del B7Y33, se construyeron moléculas híbridas quiméricas que combinan su cadena pesada con cadenas ligeras no relacionadas. En este caso se usaron las del AcM P3 y de su anti-idiotipo 1E10. Se obtuvieron transfectomas estables que expresan los AcQs híbridos VHB7Y33/Vκ1E10 y VHB7Y33/VκP3, con productividades de 10 µg/ml en cultivo estacionario.



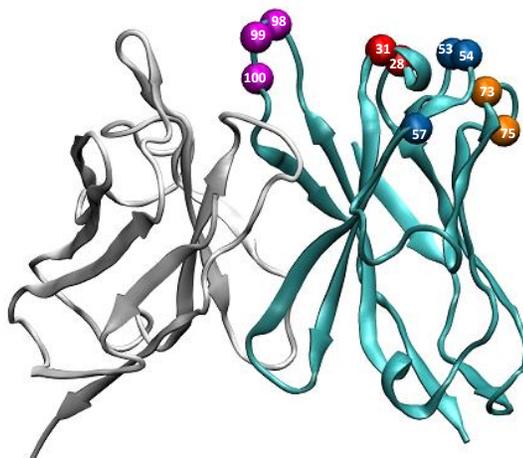
**Figura 8:** Reactividad del B7Y33 y los híbridos VHB7Y33/VκP3 y VHB7Y33/Vκ1E10 con anticuerpos anti-gangliósidos. Las placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml de los AcMs E1, P3 y F6. Los AcQs B7Y33 y sus híbridos se usaron a 10 µg/ml. La unión se detectó con un antisuero anti-cadena γ humana conjugado a fosfatasa alcalina. El AcQ C5 se empleó como control de isotipo. Se muestra un ELISA representativo. La reactividad de los AcQs frente a cada IgM se midió en experimentos independientes, aunque se incluyan en un mismo gráfico.

La comparación de las reactividades de los AcQs frente a los anticuerpos antigangliósidos E1, P3, y F6 (IgM,  $\kappa$ ; específico por el NeuAcGM1), se hizo a partir de una compilación de las réplicas provenientes de al menos tres repeticiones de cada experimento. La no existencia de una distribución normal de los datos (prueba Kolmogorov-Smirnov) u homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett,  $P < 0,05$ ) precisaron el uso del método no paramétrico Kruskal-Wallis y la post-prueba de Dunn para la comparación de las reactividades. En resumen, los híbridos VHB7Y33/V $\kappa$ P3 y VHB7Y33/V $\kappa$ 1E10 mostraron mayor reactividad (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ) que el B7Y33 frente a los AcMs E1 y F6, mientras exhibieron un reconocimiento del AcM P3 que no difiere significativamente del B7Y33 (prueba de Dunn,  $P > 0,05$ ). En la figura 8 se exhibe un ensayo representativo del total de determinaciones realizadas. La reactividad de los AcQs frente a cada IgM se midió en experimentos independientes, aunque se incluyan en un mismo gráfico.

#### 4.4.2 Participación de los CDRs H del B7Y33 en su polirreactividad idiotípica

##### 4.4.2.1 Diseño de mutaciones en la VHB7Y33 basado en análisis bioinformático

En la figura 9 se muestra el modelo del Fv del AcQ B7Y33. Se identificaron diferentes regiones del dominio VH que comprenden los tres CDRs y el llamado CDR H4, del FR3, y que están expuestas al solvente, lo que las convierte en potenciales zonas de interacción del AcQ B7Y33 con otras moléculas.



**Figura 9:** Modelo del Fv del B7Y33. La cinta azul representa el dominio variable de la cadena pesada, mientras la gris clara, el de la cadena ligera. Con esferas del mismo color se destacan los residuos cambiados en una misma variante mutada. En el interior de cada esfera se indica la posición correspondiente del residuo.

Teniendo en cuenta lo anterior, se diseñaron diferentes variantes mutadas (Tabla 6), siguiendo como estrategia realizar sustituciones radicales en las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos escogidos, sin afectar la estructura de los lazos hipervariables. Para ello, se cambiaron residuos por otros que aparecieran en dichas posiciones en las secuencias génicas VH más similares a la VHB7, correspondientes a anticuerpos con estructuras resueltas (recopilados en la base de datos PDB (Protein Data Bank, de acceso en Internet: <http://www.ww.pdb.org>). La selección de los residuos a modificar excluyó aquellos que interactúan con otros residuos vecinos.

**Tabla 6:** Mutaciones propuestas en la VHB7Y33 a partir del análisis bioinformático.

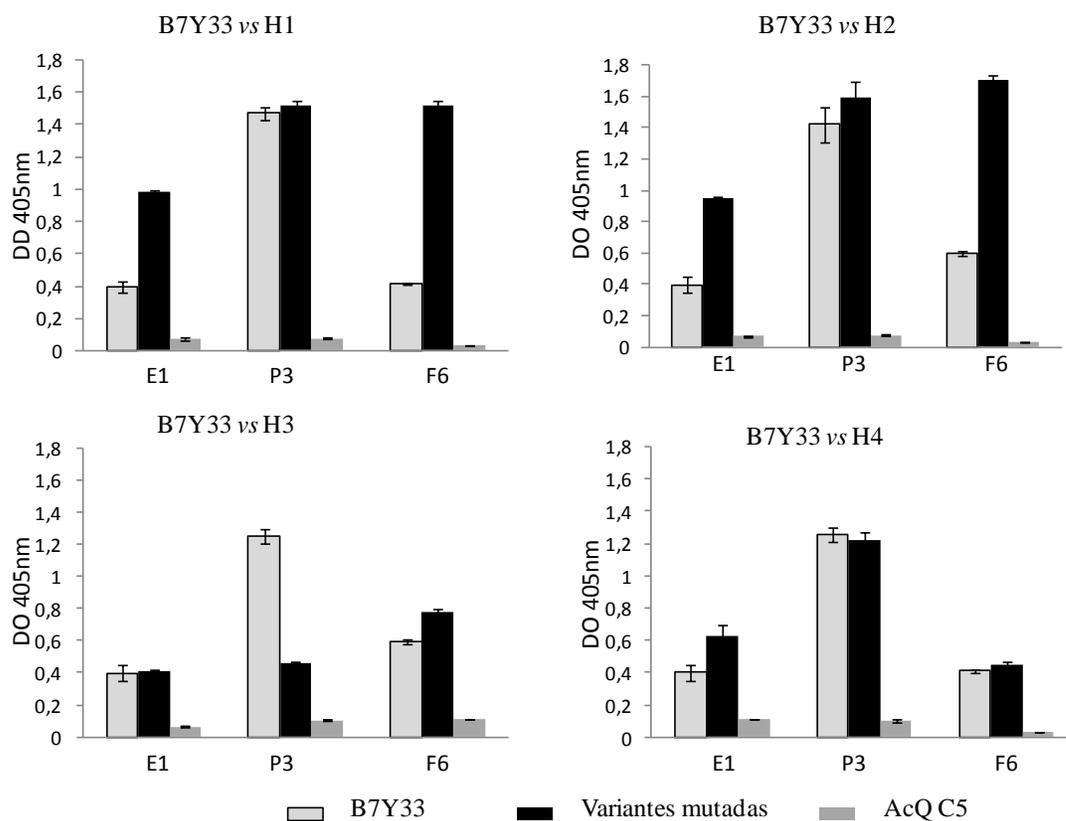
Variantes	Posiciones									
	28	31	53	54	57	73	75	98	99	100
B7Y33	Thr	Glu	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Glu	Ala	Thr
H1	Arg	Arg								
H2			Tyr	Tyr	Thr					
H3								Lys	Ser	Gln
H4						Thr	Gln			

#### 4.4.2.2 Reactividad del B7Y33 y sus variantes mutadas frente a las IgMs anti-gangliósidos

A partir del diseño descrito en el acápite anterior, se construyeron y expresaron las variantes mutadas de la VHB7Y33 con sustituciones en cada uno de los tres CDRs de la cadena pesada, así como en la zona conocida como CDR H4, localizada en el FR H3. Estas mutantes se denominaron H1, H2, H3 y H4, respectivamente (Tabla 6). Se obtuvieron transfectomas que expresan establemente 1  $\mu\text{g/mL}$  de dichos AcQs.

La comparación de las reactividades de los AcQs frente a cada IgM se hizo a partir de una recopilación de las réplicas provenientes de al menos tres repeticiones de cada experimento y se procedió de manera similar al estudio de la reactividad de las moléculas híbridas. Por la inexistencia de distribución normal de los datos (prueba Kolmogorov-Smirnov) u homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett,  $P < 0,05$ ) se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y la post-prueba de Dunn, para la comparación entre los grupos. Las variantes mutadas H1 y H2 aumentaron significativamente el reconocimiento por el B7Y33 de los AcMs E1 y F6 (prueba de

Dunn,  $P < 0,05$ ), mientras no tuvieron impacto en la reactividad contra el AcM P3 (prueba de Dunn,  $P > 0,05$ ). Adicionalmente, las mutaciones de H3 afectaron fuertemente la reactividad contra este anticuerpo (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ), a diferencia de los AcMs E1 y F6, frente a los cuales no se modificó su reconocimiento (prueba de Dunn,  $P > 0,5$ ). Las mutaciones en CDR H4 no variaron la interacción del B7Y33 con ninguna de las IgMs probadas (prueba de Dunn,  $P > 0,05$ ). En la figura 10 se exhibe un ensayo representativo de los experimentos realizados.

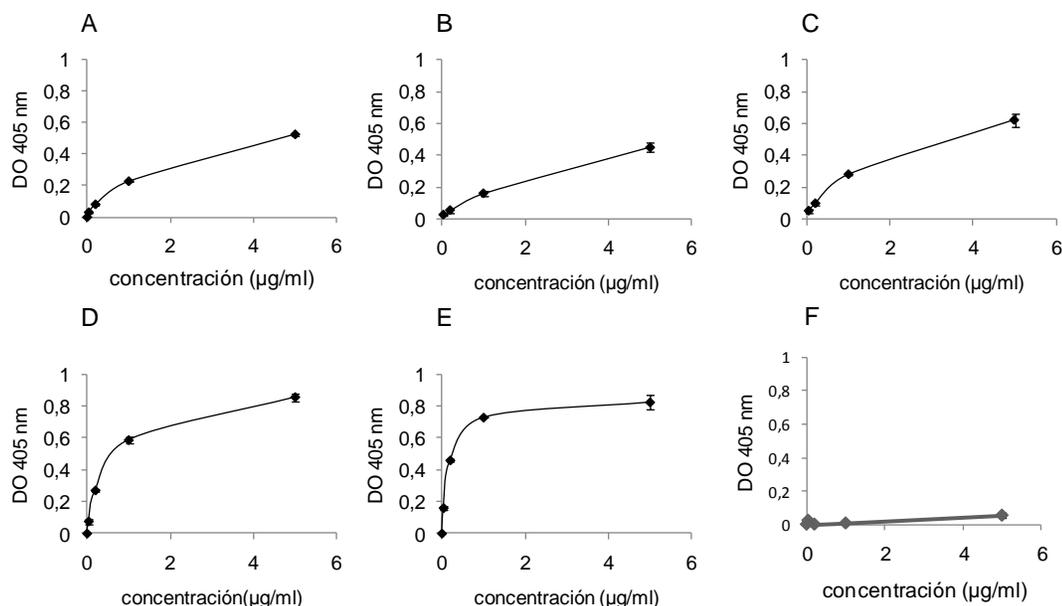


**Figura 10:** Reactividad del B7Y33 y sus variantes mutadas H1 (CDR H1), H2 (CDR H2), H3 (CDR H3), H4 (FR H3) con anticuerpos anti-gangliósidos. Las placas de ELISA se recubrieron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de los AcMs E1, P3 y F6. Los AcQs B7Y33 y las variantes mutadas se usaron a 10  $\mu\text{g/ml}$ . La unión se detectó con un antisuero anti-cadena  $\gamma$  humana conjugado a fosfatasa alcalina. El AcQ C5 se empleó como control de isotipo. Se muestra un ELISA representativo. La reactividad de los AcQs frente a cada IgM se midió en ensayos independientes, aunque se incluyan en un mismo gráfico.

#### 4.4.2.3 Propiedad de autounión del B7Y33 y sus variantes mutadas

Una propiedad inusual del AcM B7 es su capacidad de autounión (Macías A., comunicación personal). Al igual que otras propiedades inmunológicas de este

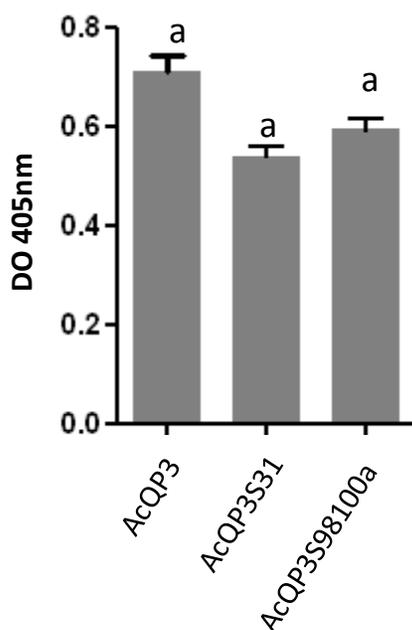
anticuerpo, el B7Y33 mostró la capacidad de reconocimiento homofílico. El resto de las variantes mutadas evaluadas mantuvieron el reconocimiento a sí mismas (Fig. 11).



**Figura 11:** Ensayo de autounión del AcQ B7Y33 y sus mutantes. Placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml de B7Y33 (A), H1 (CDR H1) (B), H2 (CDR H2) (C), H3 (CDR H3) (D) y H4 (FR H3) (E). Diferentes concentraciones de anticuerpos biotinilados se añadieron a placas recubiertas con las mismas moléculas no biotiniladas. La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. El Rituximab se usó como control de isotipo (F).

#### 4.5 Reactividad del B7Y33 frente a variantes mutadas del AcQ P3

Para estudiar las zonas de la VHP3 que son potencialmente reconocidas por el B7Y33, se evaluó la reactividad de este anticuerpo frente al AcQ P3 y dos variantes mutadas que pierden la capacidad de unión al gangliósido (P3S31, CDR H1 y P3S98;100a, CDR H3) (López-Requena y cols., 2007c). La reactividad del B7Y33 frente a estas variantes mutadas no se afectó en ninguno de los casos (prueba de Dunn,  $P > 0,05$ ) (Fig. 12). El AcQ 14F7 biotinilado se usó como control negativo y las densidades ópticas no superaron el valor de 0.2.



**Figura 12:** Reconocimiento de variantes mutadas del AcQ P3 por el AcQ B7Y33. Se recubrieron placas de ELISA con 10 µg/ml de AcQ P3 y sus mutantes P3S31 (CDR H1) y P3S98;100a (CDR H3). Se añadió B7Y33 biotinilado a 20 µg/ml y la reactividad se midió con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ).

#### 4.6 Efecto inmunopotenciador del B7Y33

##### 4.6.1 Respuesta de anticuerpos en ratones BALB/c inoculados con IgMs anti-gangliósidos y B7Y33

El AcM P3, a diferencia de otros AcMs anti-gangliósidos de isotipo IgM generados en el CIM, ha resultado inmunogénico en el modelo singénico (Vázquez y cols., 1998). Para determinar si el B7Y33 puede modificar la inmunogenicidad de estos anticuerpos autólogos, se determinaron en los sueros de ratones BALB/c las respuestas de anticuerpos inducidas por la administración subcutánea de una mezcla de los AcMs P3, E1 y F6 con el AcQ B7Y33, sin adyuvante. Se asumió como respuesta positiva aquel valor de absorbancia superior al doble del correspondiente al suero preinmune. En la tabla 7 se indica la frecuencia de animales respondedores por grupo después de la primera y segunda dosis.

Posterior a la primera dosis, los cinco ratones que recibieron el AcM P3 y el B7Y33 (solo dos en el grupo control) desarrollaron una respuesta de anticuerpos IgG contra la IgM inyectada que, aunque satisface el criterio de positividad establecido, fue muy baja (Anexo I).

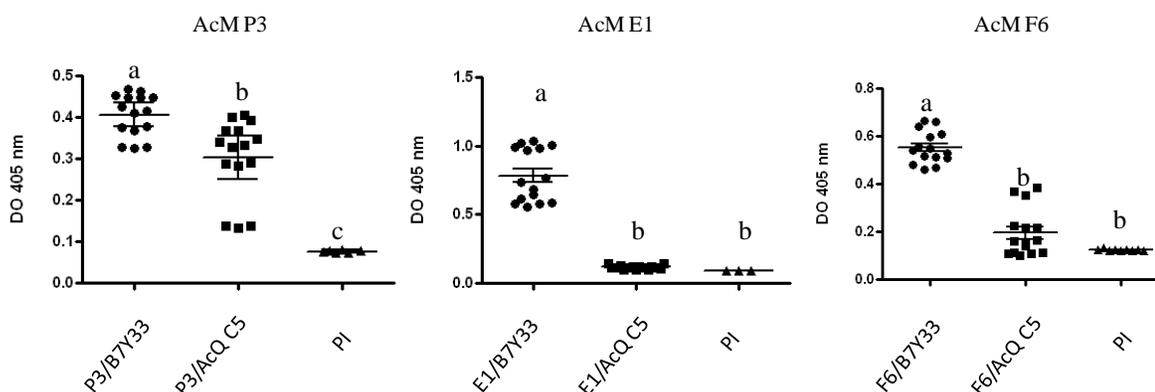
**Tabla 7:** Resumen de la reactividad de los sueros (anticuerpos IgG) de los ratones BALB/c<sup>a</sup> frente a las IgMs usadas en cada caso.

		P3/B7Y33	P3/AcQC5	E1/B7Y33	E1/AcQC5	F6/B7Y33	F6/AcQC5
Frecuencia de respondedores <sup>b</sup>	1ra dosis	5/5	2/5	3/5	0/5	3/5	0/5
	2da dosis	5/5	5/5	5/5	0/5	4/5	2/5

<sup>a</sup> A los ratones BALB/c se les administró por vía subcutánea la mezcla de una IgM (E1, P3 o F6) y los AcQs B7Y33 o C5. Los sueros se tomaron a los 7 días de cada dosis.

<sup>b</sup> Los resultados se presentan como número de ratones con reactividad (al menos el doble de la señal del suero preinmune) frente a las diferentes IgMs usadas en cada caso, sobre el número total de ratones inoculados.

Para la siguiente comparación de las reactividades de los sueros entre los grupos se consideraron todos los valores de absorbancia de cada una de las réplicas, y se aplicó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis y la post-prueba de Dunn. Como se aprecia en la figura 13, después de la segunda dosis, la respuesta de anticuerpos IgG en el grupo que recibió P3/B7Y33 fue estadísticamente superior a la del que se inoculó con P3/AcQ C5 (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ), aunque no se evidenciaron diferencias en el número de animales respondedores (Tabla 7).



**Figura 13:** Respuesta de anticuerpos IgG contra AcMs anti-gangliósidos. Sueros de ratones BALB/c inoculados con los AcMs P3, E1 y F6 mezclados con los AcQs B7Y33 o C5 (tomados 7 días después de la segunda dosis), se enfrentaron a placas recubiertas con 10 µg/ml de los anticuerpos murinos usados en cada administración. La reactividad de los sueros, diluidos 1:50, se determinó con un antisuero específico por el fragmento Fc $\gamma$  de ratón, conjugado a fosfatasa alcalina. Se muestran los valores de absorbancia de cada una de las réplicas de los ratones por grupo. PI: sueros preinmunes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ).

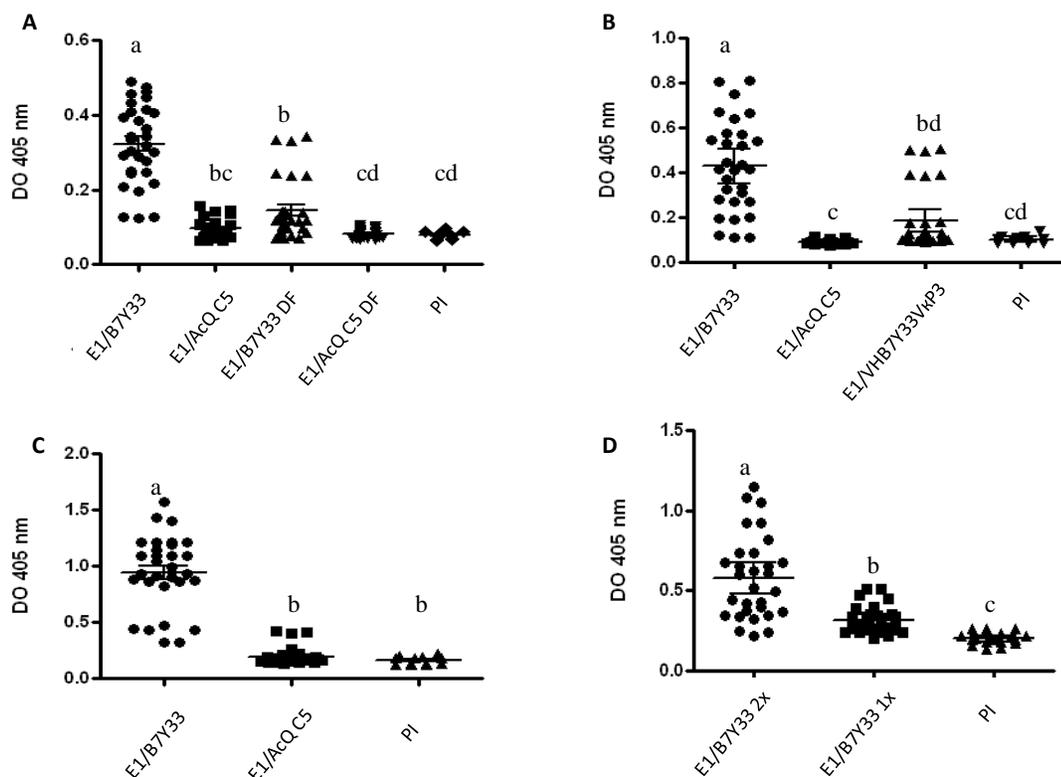
En el caso de las administraciones de los AcMs E1 y F6, la combinación con B7Y33 indujo después de la primera dosis, respuestas IgG de bajo nivel contra los anticuerpos anti-gangliósidos usados en cada caso (Anexo I). En los grupos control

(E1/AcQ C5 o F6/AcQ C5) fue menor la frecuencia de respuestas positivas en dicha extracción (Tabla 7). La segunda dosis, por su parte, generó anticuerpos IgG específicos por el AcM E1 solo en aquellos ratones a los que se les administró la mencionada IgM y, adicionalmente, el B7Y33 (Tabla 7 y Fig. 13). En cuanto a las inoculaciones con el AcM F6, después de la segunda dosis, cuatro de cinco ratones que lo recibieron mezclado con el B7Y33, desarrollaron respuesta IgG específica por dicha IgM, mientras solo lo hicieron dos en el grupo control (Tabla 7). La reactividad general del primer grupo fue significativamente superior a la del segundo (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ) (Fig. 13).

Considerando el efecto del B7Y33 sobre la inmunogenicidad del AcM E1, anticuerpo que dio origen al AcM B7, se decidió profundizar en el estudio de este fenómeno. En los análisis sucesivos, para la comparación entre grupos se hizo un compendio de los resultados de dos experimentos independientes, y se consideraron todos los valores de absorbancia de cada una de las réplicas.

#### *4.6.2 Importancia de la coinyección IgM/AcQ para la función inmunopotenciadora del B7Y33*

Con el objetivo de determinar la relevancia de la coadministración de los anticuerpos E1 y B7Y33 en la generación de una respuesta IgG contra el primero, se evaluaron sueros de ratones que recibieron la IgM y el AcQ mezclados, o por lugares diferentes cada uno, siempre por vía subcutánea. Se muestran en la figura 14A los valores absolutos de absorbancia, según el ELISA realizado, de todas las réplicas.



**Figura 14:** Respuesta de anticuerpos IgG contra el AcM E1 coadministrado con el AcQ B7Y33. Sueros de ratones inoculados con el AcM E1 y el B7Y33 (tomados 7 días después de la segunda administración) se enfrentaron a placas de ELISA recubiertas con 10  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo murino. La reactividad de los sueros, diluidos 1:50, se determinó con un antisuero específico por el fragmento Fc $\gamma$  de ratón conjugado a fosfatasa alcalina. (A) Se administraron dos dosis del AcM E1 y el B7Y33 mezclados, o por diferentes flancos cada uno (DF). (B) Se administraron dos dosis del AcM E1 y los AcQs B7Y33 o el híbrido mezclados. (C) Se administró una primera dosis del AcM E1 y el B7Y33 mezclados, y una segunda de E1 solamente (1x) o dos dosis de AcM E1 y B7Y33 mezclados (2x). (A), (B) y (D) se hicieron en ratones BALB/c, (C) en BALBc/xid. El AcQ C5 se usó como control de isotipo. PI: sueros preinmunes. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ).

El análisis individual de cada muestra reveló que siete de diez animales inoculados con una mezcla de ambos anticuerpos indujo respuesta IgG contra el E1, mientras el grupo que recibió cada anticuerpo por lugares diferentes, solo tuvo tres respondedores (Tabla 8). El grupo que recibió la mezcla desarrolló una respuesta significativamente superior al que se inoculó con los dos anticuerpos en flancos diferentes (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ) (Fig. 14A).

**Tabla 8:** Resumen de la reactividad de los sueros de los ratones BALB/c inoculados con el AcM E1 y los AcQs B7Y33, VHB7Y33/VκP3 o C5.

	Forma de administración <sup>b</sup>	Cepa	Inmunógeno <sup>c</sup>			
			E1/B7Y33	E1/AcQ C5	E1/VHB7Y33/VκP3	E1/B7Y33 1x
Frecuencia de respondedores <sup>a</sup>	Coinyección Flancos diferentes	BALB/c	7/10	0/10	-	-
			3/10	0/10	-	-
	Coinyección	BALB/c	8/10	0/10	2/10	-
	Coinyección	BALB/c-xid	8/10	1/10	-	-
Coinyección	BALB/c	7/10	-	-	2/10	

<sup>a</sup> Los resultados se presentan como número de ratones con reactividad (al menos el doble de la señal del suero preinmune) frente al AcM E1 sobre el número total de ratones.

<sup>b</sup> A los ratones BALB/c o BALB/c-xid se les administró por vía subcutánea el AcM E1 y los AcQs, sin adyuvante. Estos se inocularon juntos (coinyección) o separados (flancos diferentes). Los sueros se tomaron a los 7 días de la segunda dosis.

<sup>c</sup> En todos los casos se aplicaron dos dosis de IgM/AcQ con excepción del grupo E1/B7Y33 1x, a los que se les administró la mezcla de anticuerpos en una primera dosis, mientras en la segunda dosis solo recibieron el AcM E1.

#### 4.6.3 Importancia de la interacción IgM/AcQ para el efecto de inmunopotenciación

Con el objetivo de valorar la suficiencia de la potencial formación del inmunocomplejo E1/B7Y33 para la capacidad inmunopotenciadora evaluada, se analizaron sueros de animales que recibieron la mezcla (vía subcutánea) del AcM E1 con la molécula híbrida VHB7Y33/VκP3, capaz también de unirse a este anticuerpo, incluso más que el B7Y33 (Fig. 8). Como resultado, en el grupo que recibió el híbrido mezclado con el AcM E1, solo dos ratones de diez produjeron anticuerpos IgG específicos por el E1, a diferencia del grupo al que se le administró B7Y33, donde los respondedores fueron mayoría (ocho de diez) (Tabla 8 y Fig. 14B). La diferencia en la reactividad de estos dos grupos fue estadísticamente significativa (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ).

#### 4.6.4 Importancia de las células B-1 para el efecto de inmunopotenciación

Para estimar el papel de determinadas poblaciones en la orquestación de la respuesta

IgG específica por el AcM E1, se procedió de manera similar a la descrita anteriormente, en ratones BALB/c xid, deficientes de células B-1. Tal como se muestra en la figura 14C, la respuesta de anticuerpos IgG específicos por el AcM E1 generada tras la coadministración de esta IgM y el B7Y33 es significativamente superior a la del grupo control (E1/AcQ C5) (prueba de Dunn,  $P < 0,05$ ), donde no hubo ratones respondedores. Por lo tanto, se reprodujo el resultado obtenido en ratones BALB/c normales.

#### 4.6.5 *Determinación de efecto “priming” en la capacidad inmunopotenciadora del B7Y33*

Con el objetivo de definir si el B7Y33 es capaz, con una sola dosis, de condicionar un estado de activación que permita inducir una respuesta IgG específica por el AcM E1 tras inoculaciones posteriores, se evaluaron sueros de ratones que recibieron la mezcla de los dos anticuerpos en cada dosis, y aquellos que solo la recibieron en la primera dosis, mientras que en la segunda únicamente recibieron el AcM E1. Solo dos de estos últimos animales fueron capaces de generar una respuesta IgG específica por el AcM E1, en contraste con los del otro grupo (dos dosis con E1/B7Y33) que respondieron mayoritariamente (Tabla 8).

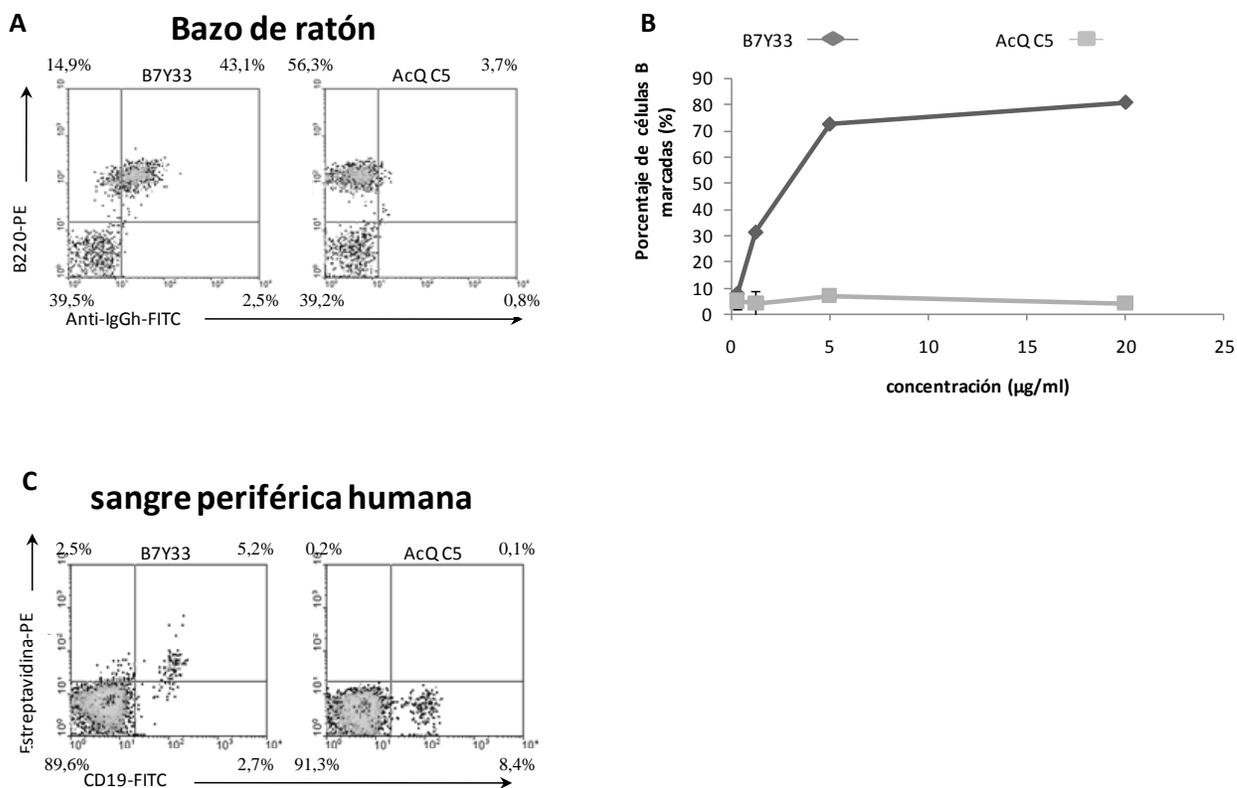
### 4.7 *Reconocimiento de linfocitos B*

#### 4.7.1 *Reconocimiento del RCB por el B7Y33*

Considerando las evidencias previas de la capacidad del B7Y33 de unirse a otros anticuerpos, y su efecto inmunopotenciador, se determinó si puede reconocer inmunoglobulinas no solo en forma soluble, sino además, como RCB. Para ello, se evaluó primeramente su interacción con linfocitos B murinos y humanos por citometría de flujo.

El B7Y33 reconoció un 74% de las células B de bazo, provenientes de un ratón BALB/c no inmunizado. Esta interacción probó ser dependiente de la cantidad de anticuerpo (Fig. 15A y B). Adicionalmente, este anticuerpo se unió a linfocitos B de

sangre periférica de un donante humano sano (Fig. 15C). El AcQ C5 se empleó como control de isotipo.

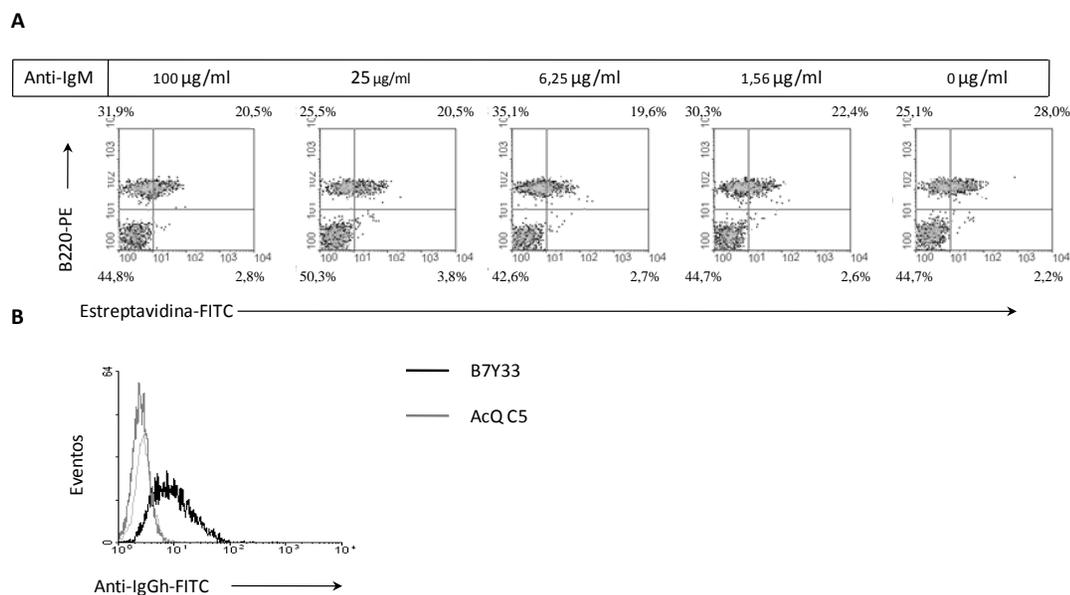


**Figura 15:** Unión del AcQ B7Y33 a los linfocitos B humanos y murinos. (A) y (B) Esplenocitos de ratones BALB/c no inmunizados. (C) Células mononucleares periféricas de donante sano humano. Las células se incubaron con 5 µg/ml de B7Y33 (A), diferentes concentraciones de B7Y33 (B), o 5 µg/ml de B7Y33 biotinilado (C). La unión se midió con un antisuero anti-IgG humana conjugado a FITC (A y B) o estreptavidina conjugado a PE (C). El AcQ C5 se usó como control de isotipo.

A continuación se examinó si el B7Y33 interactuaba directamente con el RCB a través de un ensayo de inhibición. La preincubación de los esplenocitos de ratón BALB/c con cantidades crecientes de un antisuero anti-IgM no afectó la unión del B7Y33 a los linfocitos B (Fig. 16A).

Este resultado no es conclusivo, considerando la posibilidad de un bloqueo incompleto por el antisuero de todos los sitios potenciales de unión sobre el RCB. Por esa razón, se evaluó el reconocimiento del mieloma murino NS0, que no produce inmunoglobulinas, por el B7Y33, y se demostró que reconoce también estas células

(Fig. 16B). Esto apunta a la existencia de otra molécula diana del B7Y33, sobre los linfocitos B, diferente al RCB.



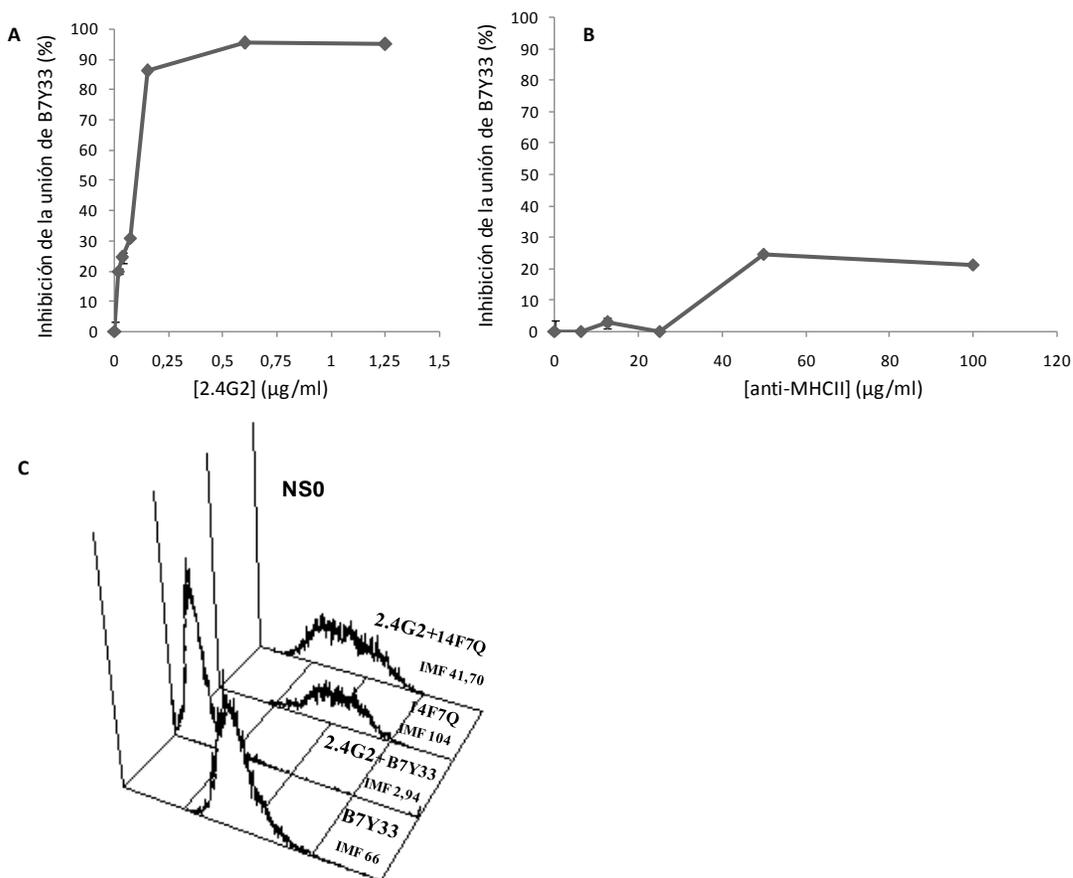
**Figura 16:** El AcQ B7Y33 reconoce un antígeno diferente del RCB en los linfocitos B. (A) Ensayo de inhibición de la unión del B7Y33 a linfocitos B usando un antisuero específico por IgM de ratón. Esplenocitos de ratón BALB/c se incubaron primero con diferentes concentraciones del antisuero inhibitor, y después con 2,5 µg/ml de B7Y33 (concentración no saturante). La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a FITC. (B) Unión de B7Y33 al mieloma no secretor de inmunoglobulinas NS0. Las células se incubaron con 10 µg/ml del anticuerpo. La unión se detectó con un antisuero anti-IgG humana conjugado a FITC. El resultado es representativo de dos experimentos.

#### 4.7.2 Reconocimiento del FcγRII por el B7Y33

Seguidamente, se exploró la posible interacción del B7Y33 con otra molécula expresada en todos los linfocitos B, el FcγRIIb. Este se conserva en ratones y humanos (Brooks y cols., 1989; Nimmerjahn y Ravetch, 2008), pertenece a una familia de receptores involucrada en la interacción entre las inmunoglobulinas y las células, y es el único miembro de la familia expresado en los linfocitos B (Amigorena y cols., 1989; Nimmerjahn y Ravetch, 2008).

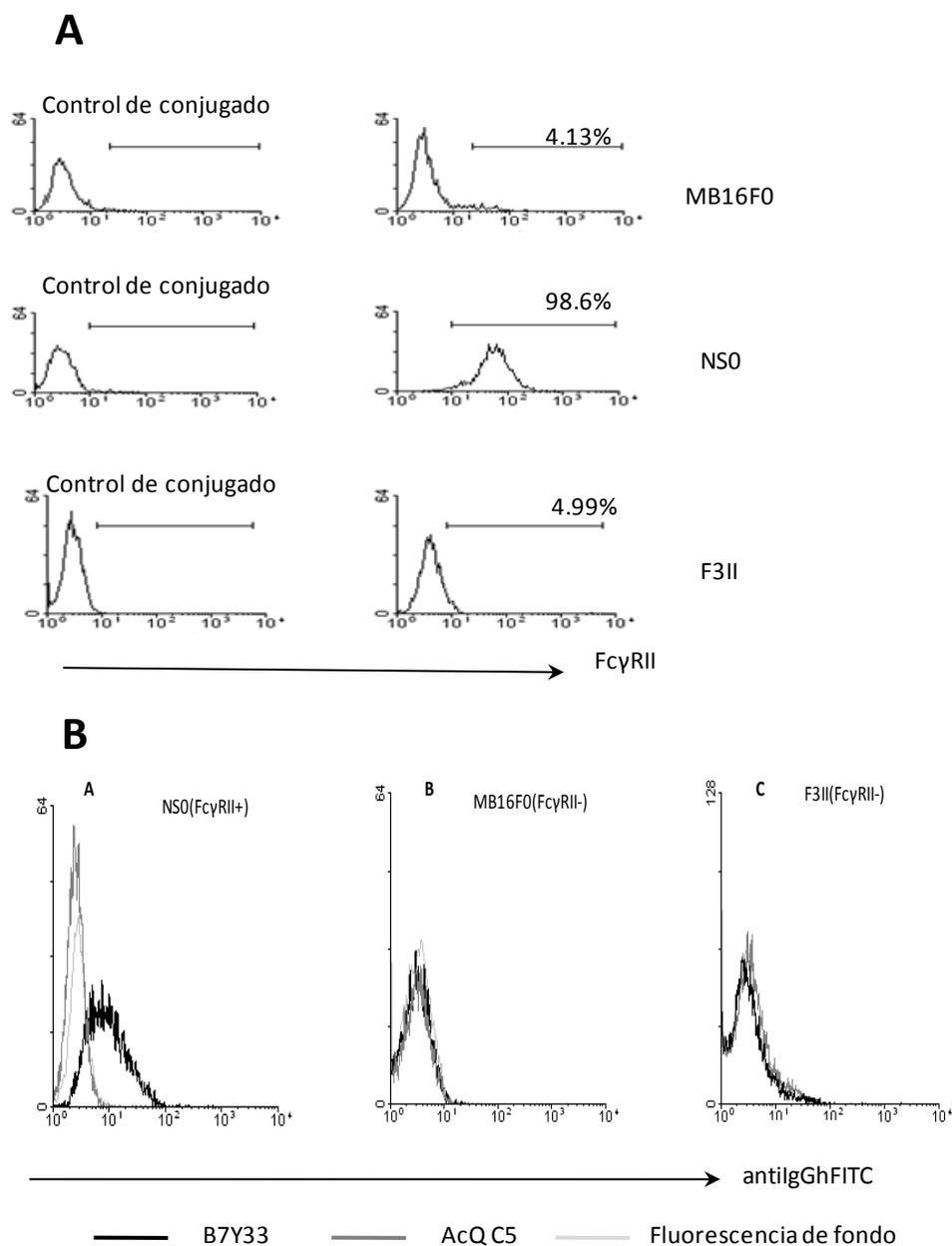
Como se observa en la figura 17, la preincubación de esplenocitos de ratones BALB/c con el anticuerpo 2.4G2, específico por los receptores FcγRII/III, provocó una reducción considerable de la unión del B7Y33 a los linfocitos B y a la línea celular NS0 (FcγRIIb+; Gillet y Stevenson, 2007). Este efecto no se observó con un

anticuerpo específico por MHC-II (Fig. 17B) ni sobre la unión del AcQ 14F7, específico por el gangliósido NeuGcGM3, a las células NS0 (Fig. 17C).



**Figura 17:** Ensayo de inhibición de la unión del AcQ B7Y33 a células B por un anticuerpo anti-Fc $\gamma$ RII. Esplenocitos de ratón BALB/c se preincubaron con diferentes concentraciones del anticuerpo 2.4G2 (específico por Fc $\gamma$ RII/III) (A) o un anticuerpo anti-MHC-II (control negativo) (B). Células de mieloma murino NS0 se preincubaron con 2.4G2 a 2 µg/ml (C). Posteriormente se añadió B7Y33 biotinilado a 2,5 µg/ml. La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a PE. En (C) el AcQ biotinilado anti-NeuGcGM3 14F7 se usó como control negativo. IMF: intensidad media de fluorescencia.

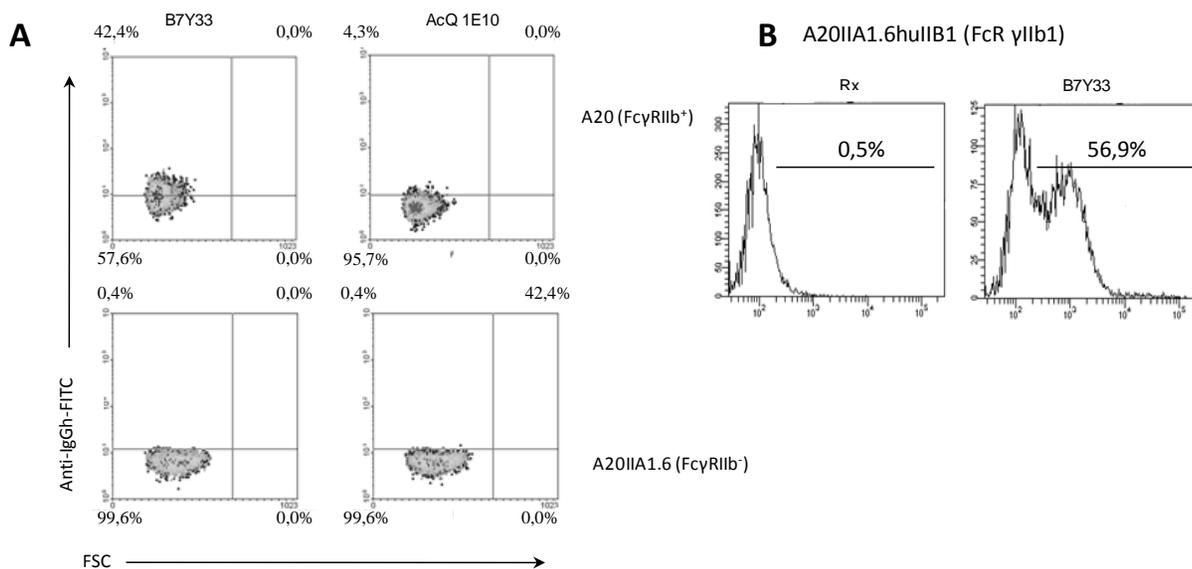
Otra forma de estimar la importancia del Fc $\gamma$ RII como blanco del B7Y33 fue la evaluación de su interacción con células de ratón, de linaje no linfoide, que no expresan el Fc $\gamma$ RII, como el F3II y el melanoma MB16F0 (Fig. 18A). Para ninguna de ellas se verificó la unión del anticuerpo (Fig. 18B).



**Figura 18:** Evaluación del reconocimiento de líneas celulares que no expresan el FcγRII por el B7Y33. (A) Expresión del FcγRII en diferentes líneas celulares murinas. Las células (NS0, F3II y MB16F0) se incubaron con 2 µg/ml de 2.4G2, y posteriormente con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de rata biotinilado. La expresión se detectó con estreptavidina conjugada a FITC. Se indica el porcentaje de células positivas en cada caso. (B) Reconocimiento de las células NS0, F3II y MB16F0 por el AcQ B7Y33. Las células se incubaron con 10 µg/ml de B7Y33 y la unión se reveló con un antisuero anti-IgG humana conjugado a FITC.

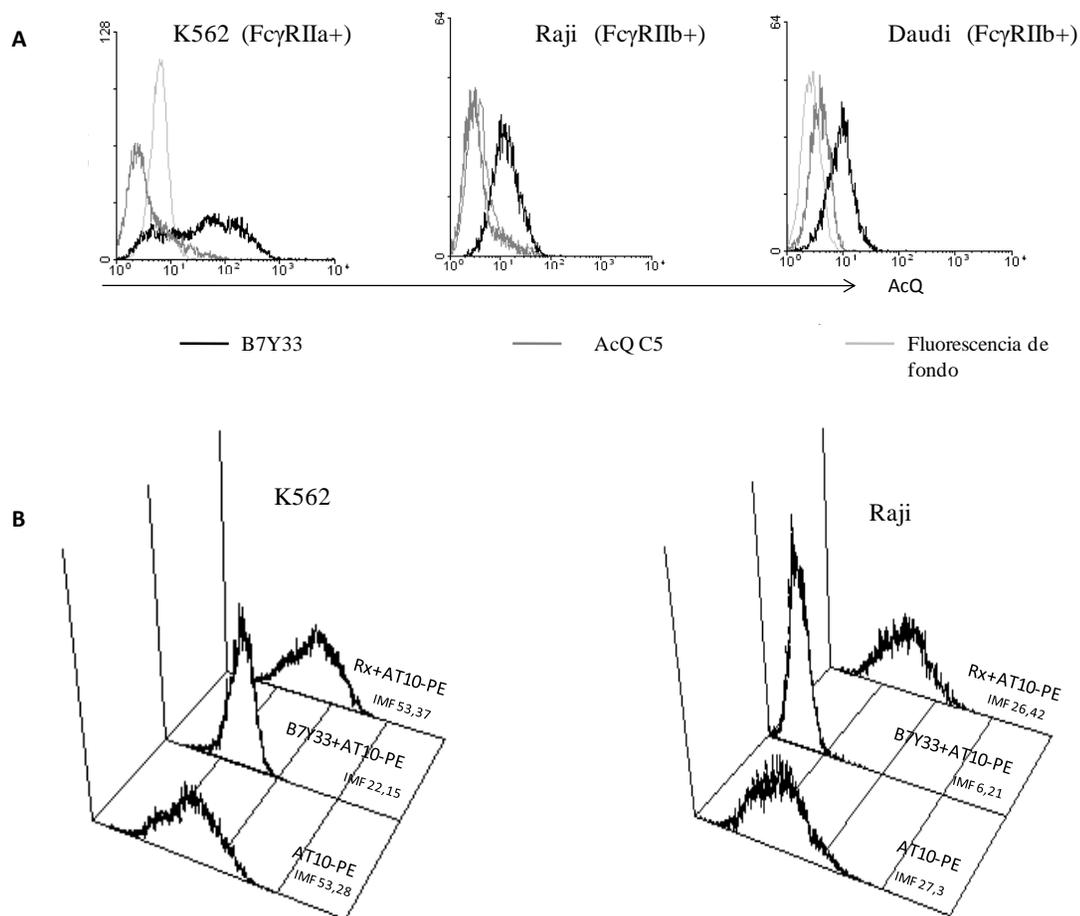
Con el mismo objetivo, se realizó otro experimento que demostró el reconocimiento por el B7Y33 del linfoma B murino A20 (FcγRIIb+), no así de uno de sus mutantes

naturales, el A20IIA1.6, que no expresa este receptor (Jones y cols., 1986a) (Fig. 19A). Adicionalmente, se comprobó la unión del B7Y33 a un transfectoma de esta línea celular que expresa el FcγRIIb1 humano (Siberil y cols., 2006) (Fig. 19B).



**Figura 19:** El AcQ B7Y33 reconoce el FcγRIIb. (A) Células de linfoma B murino A20 (FcγRIIb<sup>+</sup>) y A20IIA1.6 (FcγRIIb<sup>-</sup>), se incubaron con el AcQ B7Y33 (0,6 μg/ml). La unión se reveló con un antisuero anti-IgG humano conjugado a FITC. El AcQ 1E10 se usó como control de isotipo. (B) Las células A20IIA1.6 huIIb1 (FcγRIIb1 humano<sup>+</sup>) se incubaron con B7Y33 biotinilado a 10 μg/ml y se detectó su unión con estreptavidina conjugada a PE. El Rituximab (Rx) se usó como control de isotipo.

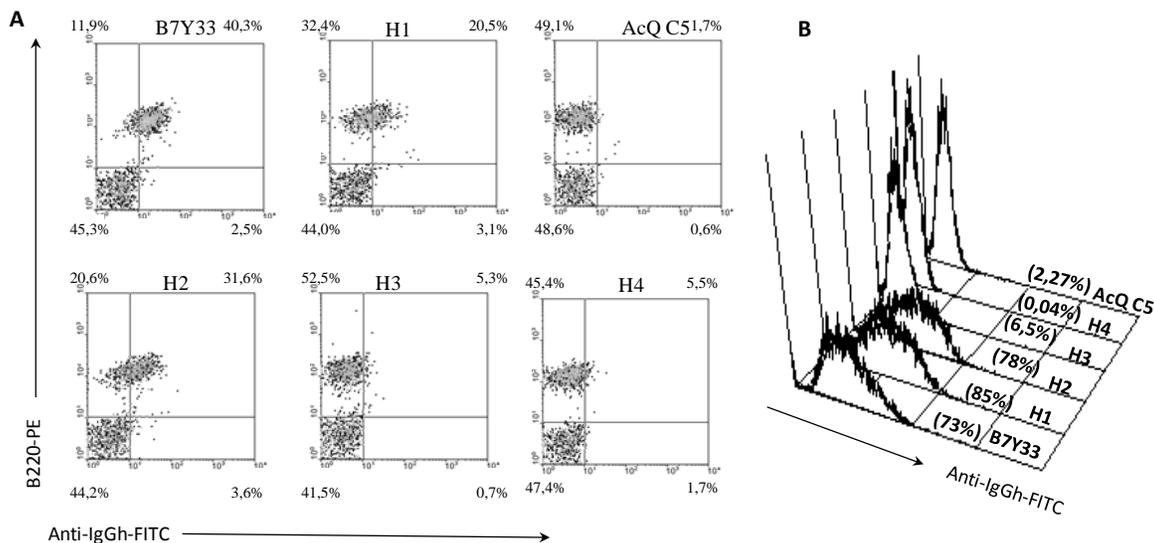
Posteriormente, se extendió el estudio a células humanas, y se comprobó la unión del B7Y33 a las líneas celulares Raji y Daudi, que expresan la isoforma B del FcγRII, y la eritroleucemia K562, que expresa la isoforma A (Fig. 20A). En consonancia con la evidencia anterior resulta la inhibición de la unión de un anticuerpo comercial anti-FcγRII humano a las células K562 y Raji por el B7Y33 (Fig. 20B). El Rituximab se empleó como control de isotipo.



**Figura 20:** El AcQ B7Y33 reconoce diferentes isoformas del Fc $\gamma$ RII humano. (A) Reconocimiento de Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIb. Las células se incubaron con el AcQ B7Y33 biotinilado (K562, Fc $\gamma$ RIIa+) o no conjugado (Raji y Daudi, Fc $\gamma$ RIIb+). La unión se detectó con un antisuero anti-IgG humana conjugado a FITC (Raji y Daudi) o estreptavidina conjugada a FITC (K562). (B) Inhibición de la unión del anticuerpo comercial AT10-PE (específico por el Fc $\gamma$ RII humano) a células B por el AcQ B7Y33. Células K562 (panel izquierdo) y Raji (panel derecho) se preincubaron con 15  $\mu$ g/ml (K562) o 5  $\mu$ g/ml (Raji) de B7Y33. Después se marcaron con el anticuerpo AT10-PE. El Rituximab se usó como control de isotipo. IMF: intensidad media de fluorescencia.

#### 4.7.3 Participación de las regiones variable y constante del B7Y33 en su interacción con los linfocitos B

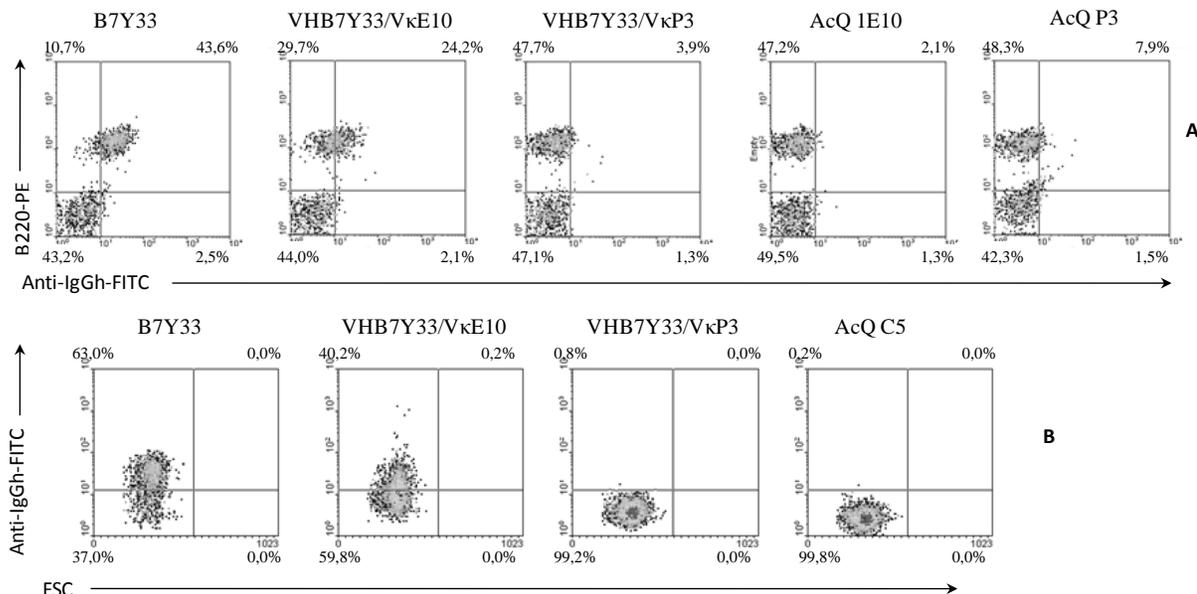
A través de dos aproximaciones diferentes se determinó la contribución de la región variable del B7Y33 a su interacción con las células B. El estudio con las variantes mutadas de la región Fv demostró que H1 y H2 se unen a linfocitos B de bazo y células NS0, mientras que en las variantes H3 y H4 sí se afecta drásticamente la interacción (Fig. 21).



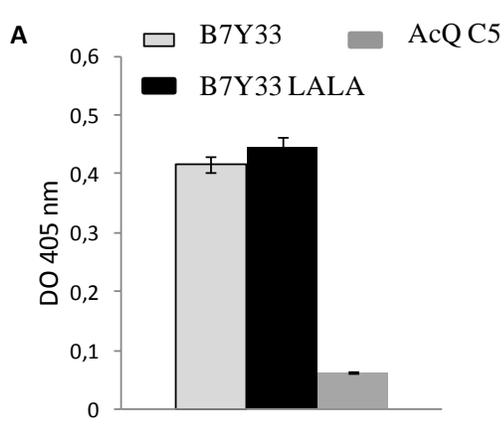
**Figura 21:** Reconocimiento de células B por las variantes mutadas del AcQ B7Y33. Esplenocitos de ratón BALB/c (A) o células de mieloma murino NS0 (B) se incubaron con 20 µg/ml de B7Y33 y las variantes mutadas H1 (CDR H1), H2 (CDR H2), H3 (CDR H3) y H4 (FR H3). Posteriormente, se marcaron con un antisero anti-IgG humano acoplado a FITC. El AcQ C5 se usó como control de isotipo. Para las células NS0 se indica entre paréntesis el porcentaje de células marcadas con los AcQs. El AcQ C5 se utilizó como control de isotipo.

Por otro lado, el análisis de la unión de las moléculas híbridas evidenció que la variante VHB7Y33/VκE10 mantuvo el reconocimiento de los linfocitos B y las NS0, aunque en menor medida que el B7Y33 (Fig. 22), a diferencia del VHB7Y33/VκP3, que lo perdió completamente.

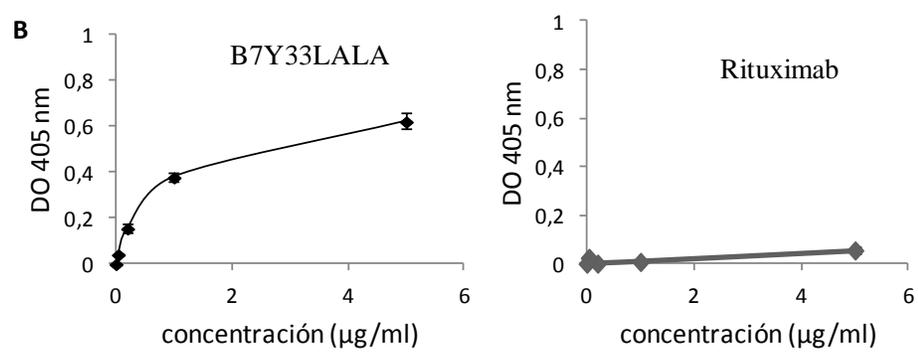
Para demostrar el papel del Fc del B7Y33 en el reconocimiento de células de linaje B, se construyó y expresó una variante de la región constante con afectación en la unión a los FcγRs. La variante seleccionada contiene un doble cambio de leucina por alanina en las posiciones 234 y 235, conocido por abrogar la interacción con los FcγRs (Sarmay y cols., 1992; Xu y cols., 2000; Hinojosa y cols., 2010). Se obtuvo un transfectoma que expresa establemente 1 µg/mL de dicho AcQ mutado, denominado B7Y33LALA. El anticuerpo retuvo el reconocimiento del AcM E1 (Fig. 23A), así como las propiedades de autounión (Fig. 23B), pero no mostró reconocimiento de linfocitos B murinos (Fig. 24 A) ni de células de mieloma murino NS0 (Fig. 24 B).

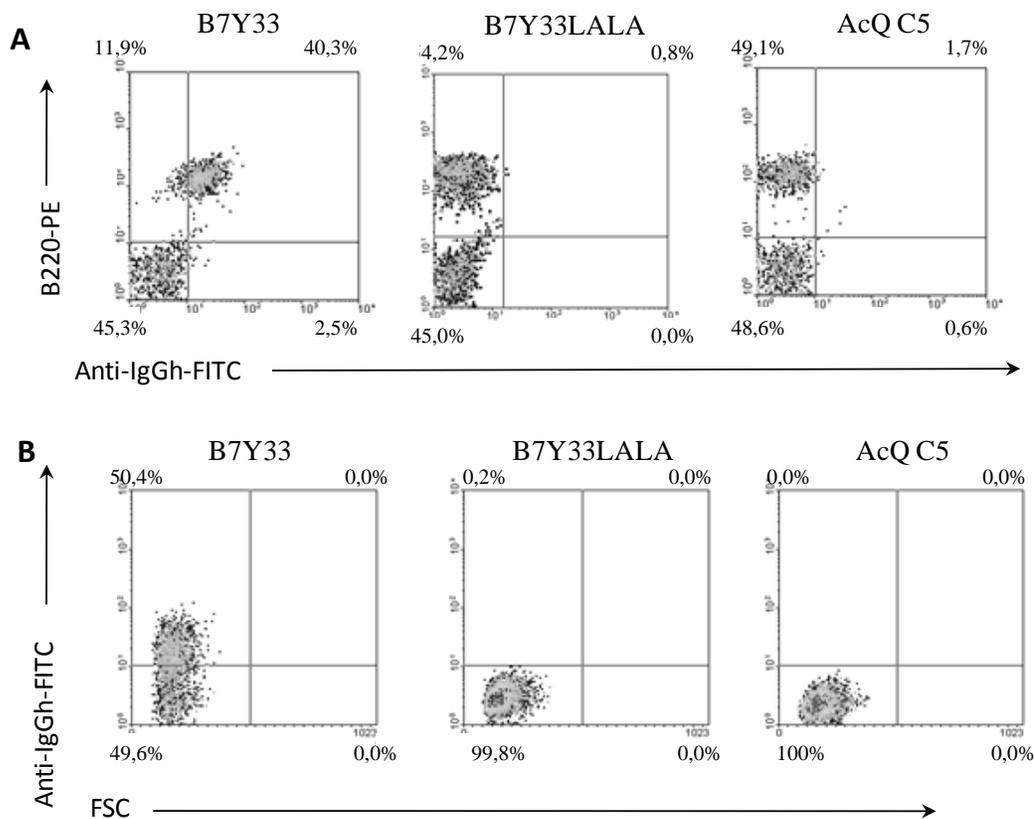


**Figura 22:** Reconocimiento de células B por los AcQs híbridos VHB7Y33/Vκs no relacionadas. Esplenocitos de ratón BALB/c (A) y células de mieloma murino NS0 (B) se incubaron con 20 µg/ml de B7Y33, VHB7Y33/VκP3, VHB7Y33/VκE10. Los AcQs P3, 1E10 y C5 se emplearon como controles de isotipo. La reactividad se determinó con un antisuero anti-IgG humana conjugado a FITC.



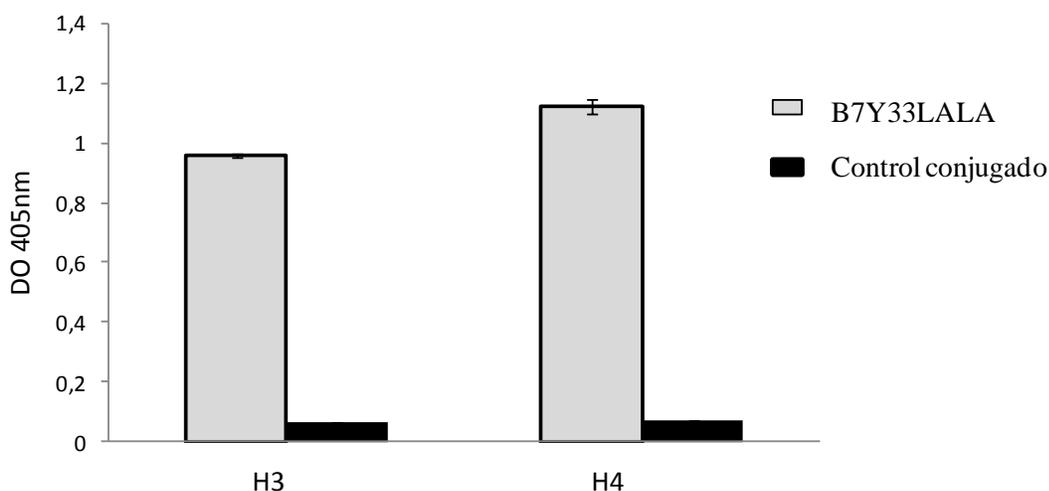
**Figura 23:** Reactividad con el AcM E1 y autounión de la variante mutada B7Y33LALA. (A) Las placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml del AcM E1. Los AcQs B7Y33 y B7Y33LALA se usaron a 10 µg/ml. La unión se detectó con un antisuero anti-cadena γ humana conjugado a fosfatasa alcalina. El AcQ C5 se empleó como control de isotipo. (B) Placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml de B7Y33LALA. Diferentes concentraciones de anticuerpos biotinilados se añadieron a placas recubiertas con las mismas moléculas no biotiniladas. La reactividad se midió con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina. El Rituximab se usó como control de isotipo.



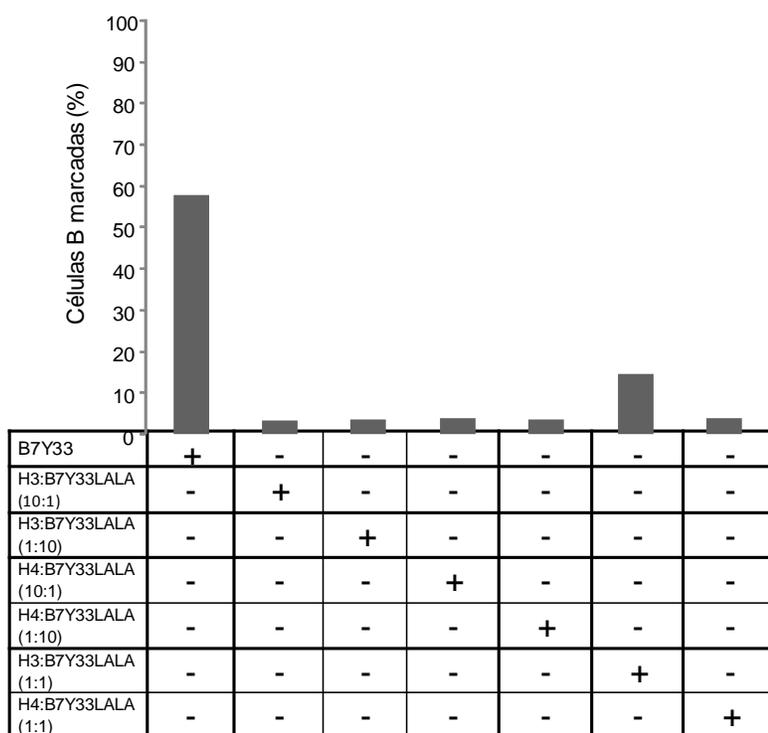


**Figura 24:** Reconocimiento de células B por la variante mutada B7Y33LALA. Esplenocitos de ratón BALB/c (A) o células de mieloma murino NS0 (B) se incubaron con 20 µg/ml de B7Y33 y la variante mutada B7Y33LALA (CH2). Posteriormente, se marcaron con un antisuero anti-IgG humana acoplado a FITC. El AcQ C5 se usó como control de isotipo.

A continuación, se trabajó en la demostración de una de las posibles formas de interacción del B7Y33 con las células B. Esta se basa en contactos directos de ambas regiones, Fv y Fc, del B7Y33 con el FcγRIIb, y la estabilización de estas interacciones por las uniones homofílicas y heterofílicas mostradas por este anticuerpo y sus variantes mutadas H3 y H4 (Fig. 27-II). De dicho modelo de interacción se podría esperar una “complementariedad molecular” de las variantes mutadas H3/H4 y el B7Y33LALA, para la unión a estas células: la ausencia de reconocimiento por las mutantes H3/H4 a través del idiotipo, y la interacción afectada del B7Y33 a través del Fc, podrían ser compensadas por la interacción con el FcγRIIb del idiotipo del B7Y33LALA y el Fc de H3/H4, respectivamente. Se demostró previamente el reconocimiento de las variantes H3/H4 por B7Y33LALA (Fig.25). Sin embargo, no se detectó la unión de ninguno de los anticuerpos a las células B cuando se mezcló el AcQ B7Y33LALA y las variantes mutadas H3 o H4 (Fig. 26).



**Figura 25:** Ensayo de interacción entre el AcQ B7Y33LALA y las variantes mutadas H3 y H4. Placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/ml de las variantes mutadas H3 (CDR H3) y H4 (FR H3). Después de una incubación con el anticuerpo B7Y33LALA biotinilado (2,5 µg/ml), se midió la reactividad con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina.



**Figura 26:** Las mutaciones del AcQ B7Y33 H3 (CDR H3) y H4 (FR H3) no se complementan con la mutación Ala/Ala (CH2) para la unión a las células B. Las variantes mutadas H3 o H4 se mezclaron con la B7Y33LALA a diferentes relaciones (1: 2,5 µg/mL; 10: 25 µg/mL). Las mezclas se añadieron a esplenocitos de ratón BALB/c. La reactividad se midió con un antisero anti-IgG humana conjugado a FITC.

#### 4.7.4 Reconocimiento de linfocitos de pacientes con desórdenes proliferativos de las células B por el B7Y33

A partir de muestras de médula ósea o sangre periférica, se evaluó el reconocimiento de linfocitos de pacientes con desórdenes proliferativos de las células B. De seis pacientes analizados, cinco padecían de leucemia linfocítica crónica B y sus linfocitos fueron reconocidos por el B7Y33. Asimismo, el anticuerpo se unió a las células B de un paciente con leucemia linfoblástica aguda de estirpe B (Tabla 9). A diferencia de los pacientes con leucemia linfocítica crónica B, los linfocitos del paciente con leucemia linfoblástica aguda no expresaban la molécula CD20, resultado que se obtuvo al ensayar su reconocimiento por el Rituximab.

**Tabla 9:** Reconocimiento de células B de pacientes con desórdenes linfoproliferativos por el AcQ B7Y33.

Paciente	Diagnóstico	Tipo de muestra	CD19+B7Y33+ (%) <sup>a</sup>	CD19CD20+ (%) <sup>a</sup>
1	LLC-B	CMP	74.8	99
2	LLC-B	CMP	97.0	98.5
3	LLC-B	CMP	87	99.1
4	LLC-B	CMP	64.7	64.5
5	LLC-B	CMP	56.9	98
6	LLA	MO	52.3	NR

LLC-B: leucemia linfocítica crónica B; LLA: leucemia linfoblástica aguda B; CMP: células mononucleares periféricas; MO: médula ósea; NR: no reconocimiento.

<sup>a</sup> Las células se incubaron con 2,5 µg/ml de B7Y33 o Rituximab biotinilados. La unión se reveló con estreptavidina conjugada a PE, mediante la técnica de citometría de flujo. La población de linfocitos B se identificó con un anticuerpo anti-CD19 conjugado a FITC y el Rituximab se utilizó como un control positivo en el experimento. Los porcentajes de células CD19+B7Y33+ y CD20+B7Y33+ están referidos al total de linfocitos B.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 *La necesidad de un modelo recombinante para el estudio de las propiedades inmunoquímicas del AcM anti-idiotipo B7*

El estudio de las propiedades biológicas del AcM B7 requería de cantidades de anticuerpo no disponibles, debido a la inestabilidad del hibridoma secretor (Macías A., comunicación personal). Por lo tanto, se decidió construir una versión quimérica de la molécula (regiones constantes humanas  $\gamma 1$ ,  $\kappa$ ), teniendo en cuenta, además, que esta sería muy útil para su posterior uso terapéutico, que se deduce de su comportamiento similar a las IVIg, *in vitro*, descrito por Macías y cols. (1999).

Los intentos de obtener un transfectoma con niveles de productividad adecuados no fueron efectivos. Esta dificultad no se presentó para la expresión de las variantes mutadas de la cadena pesada, de las que se obtuvieron cepas secretoras estables con niveles de expresión que clasifican dentro del rango promedio de este parámetro (1-30  $\mu\text{g/ml}$ ), descrito para el sistema de expresión empleado (Yoo y cols., 2002). Una de ellas es la variante mutada B7Y33, donde un residuo de Thr en la posición H33 se sustituyó por Tyr. Su reconocimiento de otras IgMs, resultó similar al del AcQ B7, así como la interacción con proteínas de mieloma humano y disímiles ligandos de naturaleza no inmunoglobulínica, lo que confirma que esta variante mutada retiene la polirreactividad idiotípica y la multiespecificidad demostradas por el AcQ B7. Por tal motivo, se continuó el estudio de las bases moleculares de la reactividad de esta variante como un modelo del AcM murino B7, considerando que mantenía sus principales propiedades inmunoquímicas.

### 5.2 *AcMs B7 y 34B7: ¿anticuerpos naturales?*

Los anticuerpos naturales, cuya existencia es independiente aparentemente de la estimulación antigénica foránea, se caracterizan por el reconocimiento multiespecífico de una variedad de autoantígenos. Constituyen una fracción importante de las inmunoglobulinas del suero, de tal manera que llegan a representar los anticuerpos autorreactivos hasta el 66% de las IgG séricas de un individuo (Avrameas y Ternynck, 1993). Se sabe que estos son capaces de reconocerse entre sí, lo que constituye la base de la red idiotípica que se observa, sobre todo, en el

repertorio neonatal (Holmberg y cols., 1984b; Vakil y Kearney, 1986). Es conocido el importante papel que desempeñan en la respuesta primaria a patógenos virales y bacterianos (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000) y su función protectora contra endotoxemia (Reid y cols., 1997).

Los AcMs B7 y 34B7 comparten algunas propiedades con los anticuerpos naturales, como el reconocimiento de otras inmunoglobulinas y la multiespecificidad, dada por la interacción con moléculas de diferente naturaleza (Macías y cols., 1999). Incluso, la interacción preferencial del B7Y33 con antígenos de procedencia bacteriana como el toxoide tetánico y la proteína P64K (procedente de *Neisseria meningitidis*), sugiere una aplicación terapéutica potencial de este anticuerpo similar a la reseñada anteriormente para los anticuerpos naturales. De estas semejanzas inmunoquímicas se podría especular entonces que estos anticuerpos anti-idiotipo pertenecen al repertorio natural de inmunoglobulinas.

Poco se conoce sobre la relación entre la estructura y función de los anticuerpos naturales. No se han detectado diferencias fundamentales en la composición aminoacídica que distinga a anticuerpos mono y polirreactivos. Algunos estudios han sugerido que un CDR H3 más largo caracteriza a los anticuerpos naturales polirreactivos, en comparación con los primeros (Co y cols., 1993; Martin y cols., 1994), lo cual no ha sido demostrado consistentemente. Sin embargo, determinadas restricciones genéticas sí tipifican los anticuerpos naturales. Una de ellas son sus genes  $V_H$  y  $V_L$ , que aparecen generalmente en sus formas no mutadas o muy próximas a la línea germinal (Carlsson y cols., 1991). Algunos autores alegan un uso favorecido de genes pertenecientes a familias  $V_H$  proximales a los segmentos D, sobre todo las 7183 y Q52 (Holmberg, 1987), sin preferencia particular por determinado grupo del repertorio  $V_L$ . Otros han adoptado por consenso que los anticuerpos polirreactivos pueden ser codificados por todas las familias  $V_H$  (Striebich y cols., 1990; Chen y cols., 1991). Sin embargo, pese a las coincidencias en su perfil de reactividad, los AcMs B7 y 34B7 no satisfacen los mismos requerimientos genéticos de los anticuerpos naturales, descritos por Holmberg, 1987. El análisis inmunogenético de sus regiones variables evidenció que estos anticuerpos parecen ser el resultado de un proceso de maduración de la afinidad conducida por el antígeno, y

la mayoría de las mutaciones se concentran en los segmentos  $V_H$  y  $V_L$ . Adicionalmente, no son codificados por genes de las familias  $V_H$  7183 o Q52, y sí por la familia  $V_H$  J558.

Los anticuerpos monorreactivos se caracterizan por la presencia de muchas mutaciones somáticas, a diferencia de los anticuerpos naturales polirreactivos (Notkins, 2004). La demostración del carácter mutado de dos anticuerpos multiespecíficos como los AcMs B7 y 34B7 podría ser un ejemplo de cómo el proceso de HMS puede crear o modificar un patrón de reconocimiento de esta naturaleza. Sin embargo, al desconocer las características de la reactividad de los anticuerpos de línea germinal que les dieron origen a estos anti-idiotipos, no es posible aseverar que su multiespecificidad es una resultante directa del proceso de HMS. Solo se puede destacar que la existencia de anticuerpos como estos, mutados y polirreactivos, contrasta con el aumento de la rigidez del sitio de unión y una restricción de la especificidad antigénica que suelen asumirse como consecuencias del proceso de maduración de la afinidad y la acumulación gradual de mutaciones somáticas (Manivel y cols., 2000; Jimenez y cols., 2003; Jimenez y cols., 2004). En la literatura se describe un anticuerpo, el SPE7, que reconoce al DNP (2,4-dinitrofenil) y varios derivados, y cuyo patrón de unión multiespecífica parece haber surgido en el proceso de maduración de la afinidad. Considerando que su precursor potencial es otro anticuerpo también multiespecífico, se plantea que, tratándose de una unión promiscua, la maduración podría alterar más el patrón que el número de ligandos que se unan potencialmente, debido a la modificación del paisaje estereoquímico del sitio de unión (James y Tawfik, 2003a). En el caso de los AcMs B7 y 34B7, se seleccionaron en la práctica como anti-idiotipos del AcM E1. Sin embargo, producto de la HMS pudiera modificarse el reconocimiento por otro antígeno.

En el caso del AcM B7, durante el proceso de maduración de la afinidad, el cambio de Tyr por Asn en la posición 50 de la región VL crea un sitio potencial de *N*-glicosilación. La pérdida o ganancia de sitios de adición de carbohidratos puede ocurrir durante la HMS (Dunn-Walters y cols., 2001). Este tipo de modificación post-traduccional puede sin dudas influir en el patrón de reactividad. En algunos anticuerpos poliespecíficos y anti-carbohidratos, la presencia de glucanos en la región

variable mejora la afinidad de unión, mientras en otras posiciones puede disminuirla (Leibiger y cols., 1999). Otros estudios que refuerzan la importancia de la glicosilación de esta región en la reactividad, son los realizados por Fernández y cols. (1997), quienes demuestran una dependencia mucho mayor del contenido de carbohidratos en la región variable para la capacidad de unión en los anticuerpos polirreactivos que en los monoespecíficos. De esta manera, se puede sugerir un aporte de la glicosilación de la región variable del AcM B7 a su multiespecificidad, por demostrar experimentalmente.

Del análisis filogenético de la familia V<sub>H</sub>J558 (Fig.5) no se pudo demostrar que la polirreactividad idiotípica exhibida por los AcMs B7 y 34B7, estuviese restringida a un subgrupo particular de esta familia. O sea, los genes más similares a los segmentos génicos V<sub>H</sub>B7 y V<sub>H</sub>34B7 no predisponen a una reactividad multiespecífica con otras inmunoglobulinas. Aparentemente, las mutaciones somáticas que dan origen a los AcMs B7 y 34B7 no solo pueden ser la causa de su mutiespecificidad, sino también, de su elevada capacidad de reconocimiento de otras inmunoglobulinas con diferentes especificidades. Los cambios en el proceso de maduración de la afinidad pueden haber creado sitios potenciales de unión, al margen del proceso de selección que ocurre en el órgano linfóide secundario debido al incremento de la afinidad por el antígeno.

Resulta notable que el número total de mutaciones de reemplazo en los FRs es superior al de los CDRs, en los genes V<sub>H</sub> de los AcMs B7 y 34B7, sobre todo en FR1 y FR3, hallazgo que se contrapone a la concentración de cambios en los CDRs durante el proceso de maduración de la afinidad conducida por el antígeno (Wagner y cols., 1995). Estos cambios pudieran crear sitios de interacción no clásicos, en los que no se puede excluir la participación de residuos de los CDRs. Tales sitios podrían constituir la superficie de contacto con regiones no paratópicas de otros anticuerpos, explicando así el carácter  $\alpha$  de estos anti-idiotipos. No obstante, la base estructural de este fenómeno es aún poco comprendida, debido al reducido número de complejos idiotipo/anti-idiotipo en que ha sido resuelta la estructura tridimensional por difracción de rayos X, según los datos publicados en la base Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

### 5.3 *La cadena pesada del AcM B7 en la interacción con otras inmunoglobulinas*

Se conoce que la cadena pesada de los anticuerpos es determinante en su especificidad. Incluso, se ha descrito la existencia de dominios VH que en ausencia de regiones VL exhiben *per se* capacidad de unión (Noel y cols., 1996), o que manifiestan dicha propiedad cuando se expresan como homodímeros ((Noel y cols., 1996; Jin y cols., 2003; Sepulveda y cols., 2003). El estudio previo del papel de las cadenas pesadas en la especificidad de algunos anticuerpos anti-gangliósidos y anti-idiotipos, ha demostrado que estas regulan la unión a sus ligandos (Krengel y cols., 2004; Rojas y cols., 2004; López-Requena y cols., 2007b).

Los resultados del presente trabajo son consistentes con tales hallazgos, donde la reactividad con otros anticuerpos exhibida por las moléculas híbridas (VHB7Y33/Vκ1E10 o VκP3) indica, en primer lugar, que el dominio VH del B7Y33 es decisivo en su patrón de reactividad. De hecho, aporta dicha propiedad al combinarse con la VL de anticuerpos de los que no se ha informado una interacción múltiple con diferentes inmunoglobulinas, aun de especificidades muy relacionadas. No obstante, no se puede descartar la influencia de la VLB7, si se considera el incremento del reconocimiento de los AcMs E1 y F6, al comparar los anticuerpos híbridos y el B7Y33. Aunque los residuos de la cadena pesada sean decisivos, la combinación de ambas cadenas aporta un reajuste de la interacción.

La caracterización de la reactividad de las variantes mutadas H1, H2, H3 y H4 frente a las IgMs anti-gangliósidos, reveló para las dos primeras, un patrón de reconocimiento diferente a la del CDR H3. Los cambios en los CDRs H1 y H2 modificaron de manera similar el reconocimiento a los AcMs E1 y F6, sin ningún impacto en la reactividad frente al AcM P3. Por el contrario, las mutaciones en el CDR H3 influyeron en la reactividad con este anticuerpo, sin trascendencia alguna para la interacción con las otras IgMs estudiadas. Estas observaciones sugieren la existencia de más de un sitio de unión sobre la VHB7Y33 que explicaría su amplia polirreactividad idiotípica. Existirían, al menos, dos sitios de unión: uno que comprende los residuos mutados en los CDRs H1 y H2 (variantes H1 y H2), y otro que contenga los modificados en el CDR H3 (variante H3); no se excluye la posibilidad de más de dos sitios. La reducción dramática de la reactividad de la

mutante B7STK frente a los AcMs E1 y P3, es otra evidencia que refuerza la participación del CDR H2 en las interacciones del B7Y33 con otras inmunoglobulinas. Aunque los cambios implícitos en la variante mutada H2 no modificaron el reconocimiento del B7Y33 por el AcM P3, no se puede descartar la participación de otros residuos del CDR H2 en la unión al AcM P3, como sugiere la pérdida del reconocimiento de este anticuerpo por la variante B7STK, con cambios en las posiciones 56-58, correspondientes al CDR H2. Son varios los ejemplos que ilustran cómo el CDR H2 se involucra en sitios no clásicos de unión anticuerpo-anticuerpo. Entre estos se incluyen los llamados autocuerpos, quienes se unen a sí mismos, y cuyo sitio de homofilia comprende dicho CDR (Kaveri y cols., 1991; Kaminski y cols., 1999). Se debe destacar el hecho de que la variante mutada B7Y33 conservó las propiedades de unión del anticuerpo original a pesar de la gran diferencia en tamaño de la cadena lateral de la Tyr en comparación con la Thr, y de la posición central que ocupa el residuo H33 en el CDR H1 y en el sitio de unión en general. El hecho de que la mutación en esa posición no haya influido en el reconocimiento de otros anticuerpos, no contradice la posible contribución del CDR H1 a esta propiedad. De hecho, los experimentos de unión con las variantes mutadas muestran que, al menos, una de las sustituciones aminoacídicas realizadas en el CDR H1 y su vecindad (Glu 31 y Thr 28) afecta la reactividad del B7Y33. Aunque del lazo H4 (región expuesta del FR H3) se ha sugerido su contribución a la interacción entre regiones variables de inmunoglobulinas, a través de los llamados sitios no convencionales de unión (Kohler y Paul, 1998), no parece en nuestro caso estar involucrado en las propiedades de reconocimiento del anticuerpo recombinante B7Y33.

Teniendo en cuenta que los segmentos génicos  $V_H$  de los AcMs anti-gangliósidos E1 y F6 pertenecen a la misma familia Q52 (López-Requena y cols., 2007a) y son casi idénticos (solo un cambio conservativo en FR1), el perfil de reactividad de las variantes mutadas H1 y H2 podría indicar el reconocimiento por el B7Y33 de una región que no incluye el CDR H3 de estas IgMs, y, además, la posible existencia de un idiotopo compartido entre ambos anticuerpos, lo que contribuiría al fenómeno de la polirreactividad idiotípica. Por otra parte, el reconocimiento de mutantes del AcQ

P3 que han perdido la capacidad de unión a su antígeno (gangliósidos *N*-glicosilados) y/o a sus anti-idiotipos (López-Requena y cols., 2007c) (Fig. 12), demuestra que el B7Y33 no interactúa con el anticuerpo P3 a través de su sitio clásico de unión al antígeno nominal (paratopo) o a sus anti-idiotipos.

El gen V<sub>H</sub>P3 también pertenece a la familia Q52, pero muestra algunas diferencias en los CDRs H1 y H2 con respecto a los AcMs E1 y F6 (López-Requena y cols., 2007b). En conjunto, estos resultados ratifican el carácter  $\alpha$  del B7Y33, al reconocer regiones no paratópicas en diferentes anticuerpos. El trabajo de Potter y cols. (1998) caracteriza la zona reconocida por el anticuerpo anti-idiotipo D12, el cual se une específicamente a un sitio localizado en la cara externa de la cadena pesada de anticuerpos codificados por la familia V<sub>H</sub>3. Este incluye el FR H1, CDR H2 y FR H3, tres subregiones requeridas igualmente para la unión de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, superantígeno B (Potter y cols., 1998). Tal hallazgo indica que algunos anti-idiotipos interactúan con los anticuerpos de una manera similar a los superantígenos, como pudiera ser el caso del B7Y33.

#### 5.4 Efecto inmunopotenciador del B7Y33

El reconocimiento de diversas IgMs por el B7Y33 permite potencialmente la formación de inmunocomplejos en una mezcla de ambos tipos de anticuerpos *in vivo*. Se conoce que los inmunocomplejos son potentes activadores de las células dendríticas y capaces de inducir respuestas inmunes más eficientemente que los antígenos solos (Regnault y cols., 1999; Dhodapkar y cols., 2002). Esto resulta fundamentalmente de la internalización dependiente de Fc $\gamma$ Rs en células presentadoras, y el posterior procesamiento y presentación de antígenos (Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Nos propusimos, por tanto, evaluar si el AcQ B7Y33 tenía la capacidad de modificar la inmunogenicidad de anticuerpos reconocidos por él, cuando eran coadministrados en ausencia de adyuvantes.

Los experimentos realizados en ratones BALB/c evidenciaron que la coinoculación por vía subcutánea de B7Y33 e IgMs propias no inmunogénicas, indujo la producción de anticuerpos IgG específicos por estas. La pérdida de este tipo de respuesta contra el AcM E1, al inocularlo separadamente del B7Y33 en el mismo modelo, refuerza la

importancia potencial de los inmunocomplejos en el efecto inmunopotenciador de este último. Contradictoriamente, el híbrido VHB7Y33/VκP3, capaz también de unirse al AcM E1, no reprodujo este resultado cuando fue administrado junto al anticuerpo anti-gangliósido en las mismas condiciones. Esta evidencia indica que la formación de inmunocomplejos pudiera ser necesaria, pero no suficiente para la ocurrencia de este fenómeno. Hay que resaltar que el híbrido VHB7Y33/VκP3 no es capaz de reconocer los linfocitos B, lo que sugiere que estas células pudieran estar involucradas en el fenómeno. El resultado obtenido con esta variante híbrida permite descartar cualquier contribución de la región humana de los AcQs en el efecto observado en ratones.

De la amplia polirreactividad idiotípica del B7Y33, demostrada con inmunoglobulinas solubles, se podría inferir una interacción con el RCB expresado en los linfocitos B. Congruente con esta hipótesis es el reconocimiento extensivo por el B7Y33 de esta subpoblación linfocitaria en humanos y en ratones. Entonces, se podría especular que el AcQ en cuestión, dirige el inmunocomplejo a una población policlonal de células B, y los sucesivos eventos de señalización clásicos a través del RCB conducirían a un reclutamiento y activación multiplicados de células T CD4+ auxiliaadoras, que justificarían una respuesta inmune incrementada. Contrario a esta suposición, los experimentos de inhibición con el antisuero policlonal anti-IgM, y la demostración del reconocimiento de células de mieloma que no expresan inmunoglobulina de superficie, indican que otro antígeno diferente del RCB, es el crítico en la interacción del B7Y33 con los linfocitos B. Esto no excluye una interacción de baja afinidad con este receptor. No obstante, esta población celular pudiera ser importante en el efecto de inmunopotenciación observado, lo que está respaldado por la imposibilidad de reproducirlo del híbrido VHB7Y33/VκP3, variante que no es capaz de reconocer las células B. Los experimentos en animales BALB/c-*xid* permitieron descartar un papel protagónico de las células B-1 en el fenómeno descrito, a pesar de la capacidad presentadora de este tipo de células (Vigna y cols., 2002; Lopes y Mariano, 2009).

Los experimentos de inhibición mostrados indican que el FcγRIIb, el cual se conserva en humanos y ratones (Brooks y cols., 1989), es el blanco principal del B7Y33 sobre

los linfocitos B de ambas especies. Aunque este receptor pertenece a una familia de moléculas cuya función principal se asocia a la unión de los anticuerpos a través de su Fc, en particular el dominio CH2, los datos presentados sugieren un tipo particular de interacción. Solo así se puede explicar la elevada avidéz por los linfocitos B mediada por el Fc $\gamma$ RIIb, considerando que este el único Fc $\gamma$ R que se expresa en estas células, y que tiene baja afinidad por las IgG monoméricas (Amigorena y cols., 1989; Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Dicha cualidad es única del B7Y33, como lo demostraron los ensayos que incluyeron anticuerpos con igual isotipo (IgG1 humano).

Aunque los hallazgos de potenciación de la inmunogenicidad de inmunoglobulinas autólogas de tipo IgM presentados en este trabajo proponen a las células B como críticas, no se sabe exactamente a qué nivel ocurre su participación en el fenómeno, ni si se involucran otras poblaciones celulares. Hay que tener en cuenta que el Fc $\gamma$ RIIb está ampliamente distribuido en el sistema hematopoyético. La interacción del complejo B7Y33/IgM con el Fc $\gamma$ RIIb de las células dendríticas podría favorecer su captura y presentación por la vía no degradativa mediada por dicho receptor en estas células (Bergtold y cols., 2005), lo cual permitiría su recirculación a la superficie celular, con la consiguiente interacción con el RCB y activación de las células B. Se ha observado que la retención y el reciclaje mediado por el Fc $\gamma$ RIIb puede promover el desarrollo de la respuesta inmune humoral de antígenos dependientes de células T, ya sea por la vía de activación directa mediada por el RCB, o por permitir la transferencia o entrega del antígeno a la célula B (Batista y cols., 2001), con la ulterior presentación B-T. La inducción de anticuerpos resultante del mecanismo explicado anteriormente, le permite a los organismos expuestos a un antígeno la amplificación del componente celular B específico por antígenos microbianos o autoantígenos (Bergtold y cols., 2005).

Por otro lado, se plantea que la presencia del Fc $\gamma$ RIIb en las células dendríticas, que es predominante respecto a otros Fc $\gamma$ Rs en condiciones no inflamatorias, impide la maduración de estas, inducida por los inmunocomplejos, lo cual se convierte en un mecanismo para el mantenimiento de la tolerancia periférica (Kalergis y Ravetch, 2002). De lo anterior se podría deducir que un exceso de B7Y33 con capacidad

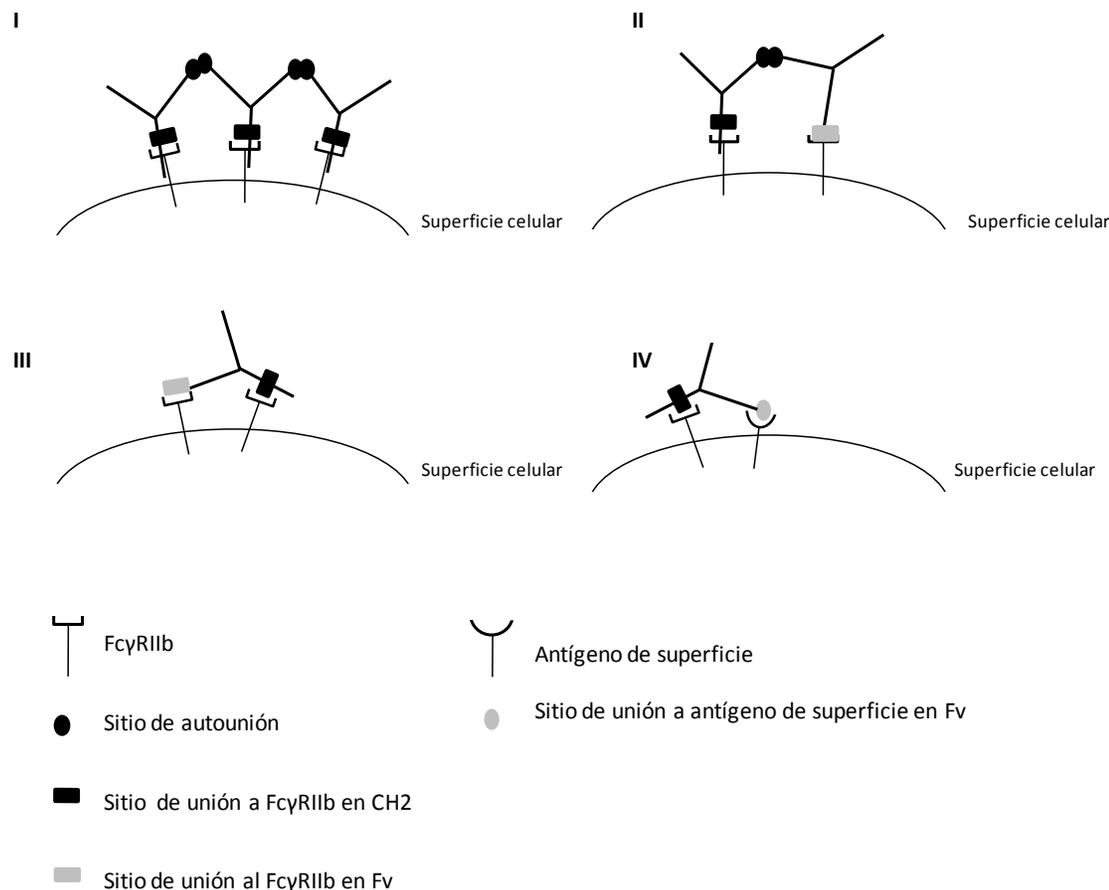
bloqueadora del Fc $\gamma$ RIIb, permitiría la activación de las células dendríticas con el inmunocomplejo B7Y33/IgM, y favorecería la respuesta contra esta última. Como el híbrido VHB7Y33/V $\kappa$ P3 no interactúa probablemente con el Fc $\gamma$ RIIb, al no reconocer los linfocitos B, el inmunocomplejo del híbrido con la IgM no puede bloquear el receptor inhibitorio y exhibir la capacidad inmunopotenciadora.

Los resultados presentados no son suficientes para dilucidar el mecanismo a través del cual el B7Y33 ejerce un efecto de potenciación de la respuesta contra anticuerpos no inmunogénicos en el modelo singénico. Independientemente del papel determinante que pudiesen desempeñar los linfocitos B u otras poblaciones celulares, no se pueden descartar otros factores que podrían influir positivamente en este fenómeno. Uno de ellos es la glicosilación de la región variable del B7Y33. Los estudios de Wright (1991) mostraron que la adición de carbohidratos al residuo 50 de la cadena ligera, como podría ocurrir en el B7Y33, aumenta el tiempo de vida media en sangre de la inmunoglobulina, lo que en este caso daría más oportunidad a la acción del anticuerpo. Asimismo, se ha demostrado que el tipo de glicosilación en la cadena ligera puede definir la inmunogenicidad del anticuerpo (Wright y cols., 1991); se trataría de una inmunogenicidad intrínseca aumentada del B7Y33 que traería consigo una estimulación de la respuesta inmune. Esta puede ser una explicación adicional a la ausencia de efecto inmunopotenciador del híbrido VHB7Y33/V $\kappa$ P3, en el cual no hay sitio de *N*-glicosilación en la cadena ligera.

### **5.5 Interacción B7Y33-célula B**

La construcción de variantes mutadas de la VH y el Fc del B7Y33 permitió esclarecer la contribución de estas dos regiones a su unión a las células B. Los resultados obtenidos evidencian la relevancia del idiotipo, el cual no tiene participación en las interacciones convencionales Fc-Fc $\gamma$ Rs.

Del análisis de las evidencias acumuladas, se propusieron y evaluaron cuatro posibles modelos de interacción del B7Y33 con las células B (Fig. 27). Estos tuvieron en cuenta que el Fc $\gamma$ RIIb murino es capaz de unir IgG humanas (Zhu y cols., 2002; Shi y cols., 2006).



**Figura 27:** Representación esquemática de los modelos de unión del B7Y33 a las células de linaje B. (I) B7Y33 se une al FcγRIIb a través de su región Fc. La unión B7Y33-FcγRIIb se estabiliza con las interacciones homofílicas entre las regiones Fv. (II) Dos moléculas de B7Y33 unidas a dos moléculas de FcγRIIb: una a través de su región Fc y la otra a través de la región variable, interactúan entre sí por sus regiones Fv. (III) Una misma molécula de B7Y33 se une a una molécula de FcγRIIb a través de su región Fc y a otra, a través de su región variable. (IV) El B7Y33 se une al FcγRIIb a través de su región Fc, y a otro antígeno de superficie desconocido a través de su región variable.

La autounión es una de las propiedades que caracterizan a algunos de los llamados superanticuerpos (Kohler y Paul, 1998; Kohler, 2000). Esta propiedad consiste en interacciones entre dos moléculas idénticas de anticuerpos a través de un sitio de unión no convencional y constituye un mecanismo para amplificar la unión de un anticuerpo a un antígeno sobre la superficie celular. Un ejemplo representativo lo es el anticuerpo R24, específico por el GD3, que porta en su VH un idiotopo homofílico, necesario para la unión con alta avidéz al gangliósido contenido en la membrana plasmática de células de melanoma (Yan y cols., 1996). Siguiendo este concepto, se propuso un primer modelo basado en la unión del B7Y33 al FcγRIIb a través de su

Fc, y la estabilización del complejo por interacciones homofílicas entre las Fv (Fig. 27-I). Este modelo se rechaza debido a que las variantes mutadas de VHB7Y33 que no se unen a linfocitos B (H3 y H4) exhiben reconocimiento autofílico. El segundo modelo sugiere que una autounión a través de la región Fv estabiliza las interacciones directas con el Fc $\gamma$ RIIb tanto por el Fc como por el Fv (Fig.27-II). De dicho modelo de interacción se podría esperar una "complementariedad molecular" de las variantes mutadas H3/H4 y el B7Y33LALA, para la unión a estas células: la ausencia de reconocimiento por las mutantes H3/H4 a través del idiotipo, y la interacción afectada del B7Y33LALA a través del Fc, podría ser compensada por la interacción con el Fc $\gamma$ RIIb del idiotipo del B7Y33LALA y el Fc de H3/H4, respectivamente. Como se demostró anteriormente, este tipo de interacción no ocurre.

Considerando la naturaleza poliespecífica del AcM B7 (Macías y cols., 1999), una molécula de anticuerpo podría, en principio, unirse simultáneamente a dos moléculas de Fc $\gamma$ RIIb través de dos sitios diferentes: uno en la región Fv, y otro en la región Fc (Fig.27-III). Un modelo alternativo consistiría en la unión del anticuerpo a un antígeno de superficie diferente al Fc $\gamma$ RIIb, mientras su Fc está comprometido con este receptor (Fig.27-IV). Este modelo es consistente con un informe en la literatura en el cual se describe un anticuerpo que requirió de la estabilización por la interacción con el Fc $\gamma$ RIIb para la unión óptima a su antígeno (CD22) en la superficie de las células B (Walker y Smith, 2008). Una situación similar se describió para otro anticuerpo específico por el CD72 (Yamashita y cols., 2006; Walker y Smith, 2008). Sin embargo, nuestros datos actuales no permiten descartar la tercera posibilidad. Se requieren más experimentos para determinar cuál modelo de interacción es el correcto.

### **5.6 *Potencial terapéutico del B7Y33 a partir de la interacción con el Fc $\gamma$ RIIb***

El Fc $\gamma$ RIIb desempeña un importante papel en la homeostasia de las células B y la regulación de la respuesta inmune (Rahman y cols., 2007; Xiang y cols., 2007; Smith y Clatworthy, 2010). Se sobreexpresa en linfomas de origen B como el folicular y el linfocítico pequeño (Callanan y cols., 2000; Camilleri-Broet y cols., 2004; Rankin y cols., 2006). Estos hallazgos convierten al Fc $\gamma$ RIIb en una diana interesante para el

tratamiento de desórdenes proliferativos de las células B. El reconocimiento de linfocitos de pacientes con leucemia linfocítica crónica B sugiere la exploración del uso del B7Y33 en la terapia de tales enfermedades. Esta podría incluir el anticuerpo acoplado a isótopos radiactivos, en el caso de linfoma. De comprobarse una capacidad de provocar el entrecruzamiento exclusivo del receptor podría basarse su uso en la inducción de apoptosis de linfocitos B y células plasmáticas, con lo cual pudiera utilizarse en la terapia no solo de leucemias y linfomas B, sino también de enfermedades autoinmunes basadas en la existencia de anticuerpos autorreactivos. El Rituximab (anti-CD20) se ha usado con resultados clínicos satisfactorios en el tratamiento de linfomas no-Hodgkin y también en el tratamiento de artritis reumatoide, trombocitopenia idiopática pura, anemia hemolítica y otras enfermedades relacionadas con el sistema inmune (Barcellini y Zanella, 2011; Hernandez-Cruz y cols., 2011). Sin embargo, no es útil en pacientes que no expresan o expresan bajos niveles de CD20 en sus células B malignas. Se ha visto que durante la terapia con este anticuerpo algunos individuos devienen refractarios al tratamiento (Davis y cols., 2000). Por lo tanto, el B7Y33 podría constituir una alternativa al tratamiento con el Rituximab. Los ensayos citofluorimétricos mostraron el reconocimiento por el AcQ B7Y33 de células de un paciente con leucemia linfoblástica aguda B, que no expresaban el CD20. Esto descubre un nicho terapéutico para el B7Y33 si se tiene se cuenta que las leucemias linfocíticas agudas B surgen, en muchos casos, a partir de la malignización de células en estadio pre-B temprano, donde el marcador CD20 no se expresa aún (Lassaletta Atienza, 2004).

Si su capacidad solo se limitara a una función bloqueadora del receptor, podría usarse como adyuvante para favorecer la potencialidad terapéutica de otros anticuerpos.

El estudio de las bases moleculares de la polirreactividad idiotípica del B7Y33 con otras inmunoglobulinas sugiere la existencia de un sitio de unión en este anticuerpo que involucra los CDRs H1 y H2, y otro en que participa el CDR H3. Para la reactividad con otros anticuerpos no se demostró la contribución del FR H3, específicamente, el llamado lazo H4. El requerimiento de los CDRs H3 y H4 para el reconocimiento de los linfocitos B, y en última instancia del Fc $\gamma$ RIIb, permite deducir que esas dos propiedades no están relacionadas. No queda claro si el sitio de unión al

Fc $\gamma$ RIIb es un fenómeno totalmente fortuito, o si de alguna manera está relacionado con la actividad biológica del anticuerpo murino anti-idiotipo de tipo  $\alpha$ , que coselecciona *in vivo* esta capacidad de reconocimiento.

El anticuerpo E1, usado para generar el AcM B7, es una IgM de línea germinal (López-Requena y cols., 2007a), como es frecuente entre los anticuerpos anti-gangliósidos del repertorio natural (López-Requena y cols., 2007a; López-Requena y cols., 2007b; Vollmers y Brandlein, 2007). Como se demostró en este trabajo, el B7Y33 interactúa con el AcM E1 y otros antígenos a través de más de un sitio de unión en la región variable. Igualmente, se une a los linfocitos B de una manera no clásica, que involucra tanto la región Fv como la región Fc. Es probable que, usando como antígeno un anticuerpo con las características del AcM E1, se puedan generar anticuerpos anti-idiotipo que incluyan especificidades y otras propiedades del repertorio neonatal, cuyas potencialidades terapéuticas están aún por explorar.

## 6. CONCLUSIONES

1. La multiespecificidad del AcQ B7Y33 involucra distintos sitios de unión, donde los responsables de la polirreactividad idiotípica difieren de aquellos que determinan la unión a los linfocitos B.
2. En la unión del AcQ B7Y33 a las células B participan las regiones variables (Fv) y constante (Fc) de este anticuerpo, y el receptor Fc $\gamma$ RIIb en la superficie de las células B.
3. El B7Y33 ejerce una función reguladora a través de la potenciación *in vivo* de la inmunogenicidad de IgMs autólogas, la cual es dependiente de la formación de inmunocomplejos entre el B7Y33 y dichos anticuerpos.



## **7. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar la constante de afinidad del B7Y33 por los diferentes anticuerpos y el Fc $\gamma$ RIIb.
2. Determinar si la región Fv del B7Y33 reconoce directamente el Fc $\gamma$ RIIb, mediante la construcción de anticuerpos sin dominio CH2 y la expresión recombinante del dominio extracelular del Fc $\gamma$ RIIb.
3. Ampliar la evaluación del reconocimiento de células B de pacientes con desórdenes linfoproliferativos B por el B7Y33, y estudiar el efecto biológico de su unión a estas células.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adib-Conquy M, Avrameas S y Ternynck T (1993) Monoclonal IgG and IgM autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies. *Mol Immunol.* **30** (2): 119-127.
- Alfonso M, Vazquez AM, Carr A, Haerslev T, Fernandez LE, Lanio ME, Alvarez C, Zeuthen J y Perez R (1995) T cell-independent B cell response to self-monosialogangliosides: primary response monoclonal antibodies. *Hybridoma.* **14** (3): 209-216.
- Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladedá V, Vidal MC y Bal De Kier Joffe E (1996) Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* **62** (4): 288-297.
- Alt FW y Baltimore D (1982) Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **79** (13): 4118-4122.
- Allen JM y Seed B (1989) Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science.* **243** (4889): 378-381.
- Amigorena S, Bonnerot C, Choquet D, Fridman WH y Teillaud JL (1989) Fc gamma RII expression in resting and activated B lymphocytes. *Eur J Immunol.* **19** (8): 1379-1385.
- Amigorena S, Salamero J, Davoust J, Fridman WH y Bonnerot C (1992) Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature.* **358** (6384): 337-341.
- Andersson K, Wråmmert J y Leanderson T (1998) Affinity selection and repertoire shift: paradoxes as a consequence of somatic mutation? *Immunol Rev.* **162**: 173-182.
- Araujo PM, Holmberg D, Martinez AC y Coutinho A (1987) Idiotypic multireactivity of 'natural' antibodies. 'Natural' anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. *Scand J Immunol.* **25** (5): 497-505.
- Arevalo JH, Hassig CA, Stura EA, Sims MJ, Taussig MJ y Wilson IA (1994) Structural analysis of antibody specificity. Detailed comparison of five Fab'-steroid complexes. *J Mol Biol.* **241** (5): 663-690.
- Armitage JO y Weisenburger DD (1998) New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol.* **16** (8): 2780-2795.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM y Dwek RA (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* **25**: 21-50.
- Avrameas S (1991) Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today.* **12** (5): 154-159.
- Avrameas S y Ternynck T (1993) The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. *Mol Immunol.* **30** (12): 1133-1142.
- Bangs LA, Sanz IE y Teale JM (1991) Comparison of D, JH, and junctional diversity in the fetal, adult, and aged B cell repertoires. *J Immunol.* **146** (6): 1996-2004.
- Barbas CF, 3rd, Heine A, Zhong G, Hoffmann T, Gramatikova S, Bjornestedt R, List B, Anderson J, Stura EA, Wilson IA y Lerner RA (1997) Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science.* **278** (5346): 2085-2092.
- Barcellini W y Zanella A (2011) Rituximab therapy for autoimmune haematological diseases. *Eur J Intern Med.* **22** (3): 220-229.
- Barrington RA, Pozdnyakova O, Zafari MR, Benjamin CD y Carroll MC (2002) B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and Fc gamma RIIB receptors. *J Exp Med.* **196** (9): 1189-1199.
- Batista FD, Iber D y Neuberger MS (2001) B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature.* **411** (6836): 489-494.
- Bayer EA y Wilchek M (1980) The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal.* **26**: 1-45.

- Belostocki K, Pricop L, Redecha PB, Aydin A, Leff L, Harrison MJ y Salmon JE (2008) Infliximab treatment shifts the balance between stimulatory and inhibitory Fcγ receptor type II isoforms on neutrophils in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58** (2): 384-388.
- Bergtold A, Desai DD, Gavhane A y Clynes R (2005) Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity.* **23** (5): 503-514.
- Betakova T, Vareckova E, Kostolansky F, Mucha V y Daniels RS (1998) Monoclonal anti-idiotypic antibodies mimicking the immunodominant epitope of influenza virus haemagglutinin elicit biologically significant immune responses. *J Gen Virol.* **79** ( Pt 3): 461-470.
- Bhat TN, Bentley GA, Boulot G, Greene MI, Tello D, Dall'Acqua W, Souchon H, Schwarz FP, Mariuzza RA y Poljak RJ (1994) Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91** (3): 1089-1093.
- Blanco I, Kawatsu R, Harrison K, Leichner P, Augustine S, Baranowska-Kortylewicz J, Tempero M y Colcher D (1997) Antiidiotypic response against murine monoclonal antibodies reactive with tumor-associated antigen TAG-72. *J Clin Immunol.* **17** (1): 96-106.
- Bona CA (1992) Idiotype, internal image. En: Roitt IM, Delves PJ. (Eds), *Encyclopedia of Immunology* Vol 2. Academic Press, London. 726-728.
- Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV y Young JW (2005) Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest.* **115** (10): 2914-2923.
- Brauweiler AM y Cambier JC (2004) Autonomous SHIP-dependent FcγR signaling in pre-B cells leads to inhibition of cell migration and induction of cell death. *Immunol Lett.* **92** (1-2): 75-81.
- Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD y Ravetch JV (1989) Structure and expression of human IgG FcR2(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med.* **170** (4): 1369-1385.
- Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW y Ravetch JV (2003) Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity.* **18** (4): 573-581.
- Callanan MB, Le Baccon P, Mossuz P, Duley S, Bastard C, Hamoudi R, Dyer MJ, Klobeck G, Rimokh R, Sotto JJ y Leroux D (2000) The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** (1): 309-314.
- Camilleri-Broet S, Cassard L, Broet P, Delmer A, Le Touneau A, Diebold J, Fridman WH, Molina TJ y Sautes-Fridman C (2004) FcγRIIB is differentially expressed during B cell maturation and in B-cell lymphomas. *Br J Haematol.* **124** (1): 55-62.
- Carlsson L, Andersson A y Holmberg D (1991) Germ-line origin of functional idiotypic interactions: identification of two idiotypically connected, natural antibodies that are encoded by germ-line gene elements. *Eur J Immunol.* **21** (9): 2285-2288.
- Carr A, Mullet A, Mazorra Z, Vazquez AM, Alfonso M, Mesa C, Rengifo E, Perez R y Fernandez LE (2000) A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma.* **19** (3): 241-247.
- Carter NA y Harnett MM (2004) Dissection of the signalling mechanisms underlying FcγRIIB-mediated apoptosis of mature B-cells. *Biochem Soc Trans.* **32** (Pt 6): 973-975.
- Casali P y Notkins AL (1989) CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today.* **10** (11): 364-368.
- Cassard L, Cohen-Solal JF, Galinha A, Sastre-Garau X, Mathiot C, Galon J, Dorval T, Bernheim A, Fridman WH y Sautes-Fridman C (2002) Modulation of tumor growth by inhibitory Fc(γ) receptor expressed by human melanoma cells. *J Clin Invest.* **110** (10): 1549-1557.
- Cassard L, Cohen-Solal J, Camilleri-Broet S, Fournier E, Fridman WH y Sautes-Fridman C (2006) Fcγ receptors and cancer. *Springer Semin Immunopathol.* **28** (4): 321-328.
- Clark M (2000) Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunol Today.* **21** (8): 397-402.
- Co MS, Scheinberg DA, Avdalovic NM, McGraw K, Vasquez M, Caron PC y Queen C (1993) Genetically engineered deglycosylation of the variable domain increases the affinity of an anti-CD33 monoclonal antibody. *Mol Immunol.* **30** (15): 1361-1367.

- Coloma MJ, Hastings A, Wims LA y Morrison SL (1992) Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J Immunol Methods*. **152** (1): 89-104.
- Chang S y Mohan C (2005) Identification of novel VH1/J558 immunoglobulin germline genes of C57BL/6 (Igh b) allotype. *Mol Immunol*. **42** (11): 1293-1301.
- Chen CK, DeNardin A, Dyer DW, Genco RJ y Neiders ME (1991) Human immunoglobulin G antibody response to iron-repressible and other membrane proteins of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. *Infect Immun*. **59** (7): 2427-2433.
- Chen W, Palanisamy N, Schmidt H, Teruya-Feldstein J, Jhanwar SC, Zelenetz AD, Houldsworth J y Chaganti RS (2001) Deregulation of FCGR2B expression by 1q21 rearrangements in follicular lymphomas. *Oncogene*. **20** (52): 7686-7693.
- Chothia C y Lesk AM (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*. **5** (4): 823-826.
- Chothia C, Lesk AM, Levitt M, Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE y Poljak RJ (1986) The predicted structure of immunoglobulin D1.3 and its comparison with the crystal structure. *Science*. **233** (4765): 755-758.
- Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D y Tulip WR. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*. **342** (6252): 877-883.
- Davies DR, Padlan EA y Sheriff S (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem*. **59**: 439-473.
- Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA, McLaughlin P, Czuczman MS, Link BK, Maloney DG, Weaver RL, Rosenberg J y Levy R (2000) Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol*. **18** (17): 3135-3143.
- Deisenhofer J (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*. **20** (9): 2361-2370.
- Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B y Dhodapkar MV (2002) Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med*. **195** (1): 125-133.
- Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S, Steinman RM, Ravetch JV y Dhodapkar MV (2005) Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102** (8): 2910-2915.
- Dhodapkar KM y Dhodapkar MV (2005) Recruiting dendritic cells to improve antibody therapy of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102** (18): 6243-6244.
- Dietrich G, Kaveri SV y Kazatchkine MD (1992) A V region-connected autoreactive subfraction of normal human serum immunoglobulin G. *Eur J Immunol*. **22** (7): 1701-1706.
- Dunn-Walters D, Thiede C, Alpen B y Spencer J (2001) Somatic hypermutation and B-cell lymphoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **356** (1405): 73-82.
- El Shikh ME, El Sayed R, Szakal AK y Tew JG (2006) Follicular dendritic cell (FDC)-FcγRIIB engagement via immune complexes induces the activated FDC phenotype associated with secondary follicle development. *Eur J Immunol*. **36** (10): 2715-2724.
- Esposito-Farese ME, Sautes C, de la Salle H, Latour S, Bieber T, de la Salle C, Ohlmann P, Fridman WH, Cazenave JP y Teillaud JL (1995) Membrane and soluble Fc γ RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. *J Immunol*. **155** (4): 1725-1736.
- Fernandez-Marrero Y, Roque-Navarro L, Hernandez T, Dorvignit D, Molina-Perez M, Gonzalez A, Sosa K, Lopez-Requena A, Perez R y Mateo de Acosta C (2011) A cytotoxic humanized anti-ganglioside antibody produced in a murine cell line defective of N-glycosylated-glycoconjugates. *Immunobiology*. *In press*.
- Fernandez C, Alarcon-Riquelme ME y Sverremark E (1997) Polyreactive binding of antibodies generated by polyclonal B cell activation. II. Crossreactive and monospecific antibodies can be generated from an identical Ig rearrangement by differential glycosylation. *Scand J Immunol*. **45** (3): 240-247.

- Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brunker P y Umana P (2006) The carbohydrate at Fc $\gamma$ RIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem.* **281** (8): 5032-5036.
- Fields BA, Goldbaum FA, Ysern X, Poljak RJ y Mariuzza RA (1995) Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotope. *Nature.* **374** (6524): 739-742.
- Footo J y Winter G (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol.* **224** (2): 487-499.
- Footo J (2003) Immunology. Isomeric antibodies. *Science.* **299** (5611): 1327-1328.
- Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ y Schatz DG (2000) The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol.* **18**: 495-527.
- Fukuyama H, Nimmerjahn F y Ravetch JV (2005) The inhibitory Fc $\gamma$  receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G+ anti-DNA plasma cells. *Nat Immunol.* **6** (1): 99-106.
- Garcia KC, Ronco PM, Verroust PJ, Brunger AT y Amzel LM (1992) Three-dimensional structure of an angiotensin II-Fab complex at 3 Å: hormone recognition by an anti-idiotypic antibody. *Science.* **257** (5069): 502-507.
- Geller RL, Bach FH, Turman MA, Casali P y Platt JL (1993) Evidence that polyreactive antibodies are deposited in rejected discordant xenografts. *Transplantation.* **55** (1): 168-172.
- Gillet L y Stevenson PG (2007) Evidence for a multiprotein gamma-2 herpesvirus entry complex. *J Virol.* **81** (23): 13082-13091.
- Givol D, Zakut R, Efron K, Rechavi G, Ram D y Cohen JB (1981) Diversity of germ-line immunoglobulin VH genes. *Nature.* **292** (5822): 426-430.
- Green LL (1999) Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods.* **231** (1-2): 11-23.
- Guex N y Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **18** (15): 2714-2723.
- Haines BB, Angeles CV, Parmelee AP, McLean PA y Brodeur PH (2001) Germline diversity of the expressed BALB/c VhJ558 gene family. *Mol Immunol.* **38** (1): 9-18.
- Hardy RR, Carmack CE, Li YS y Hayakawa K (1994) Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunol Rev.* **137**: 91-118.
- Harris LJ, Larson SB, Hasel KW y McPherson A (1997) Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry.* **36** (7): 1581-1597.
- Hawley RG, Shulman MJ, Murialdo H, Gibson DM y Hozumi N (1982) Mutant immunoglobulin genes have repetitive DNA elements inserted into their intervening sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **79** (23): 7425-7429.
- Hawley RG, Shulman MJ y Hozumi N (1984) Transposition of two different intracisternal A particle elements into an immunoglobulin kappa-chain gene. *Mol Cell Biol.* **4** (12): 2565-2572.
- Hayakawa K, Hardy RR y Herzenberg LA (1986) Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur J Immunol.* **16** (4): 450-456.
- Helling F, Shang A, Calves M, Zhang S, Ren S, Yu RK, Oettgen HF y Livingston PO (1994) GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res.* **54** (1): 197-203.
- Helling F, Zhang S, Shang A, Adluri S, Calves M, Koganty R, Longenecker BM, Yao TJ, Oettgen HF y Livingston PO (1995) GM2-KLH conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS-21. *Cancer Res.* **55** (13): 2783-2788.
- Hernandez-Cruz B, Garcia-Arias M, Ariza Ariza R y Martin Mola E (2011) [Rituximab in rheumatoid arthritis: a systematic review of efficacy and safety]. *Reumatol Clin.* **7** (5): 314-322.
- Hernandez AM, Rodriguez M, Lopez-Requena A, Beausoleil I, Perez R y Vazquez AM (2005) Generation of anti-Neu-glycolyl-ganglioside antibodies by immunization with an anti-idiotypic monoclonal antibody: A self versus non-self-matter. *Immunobiology.* **210** (1): 11-21.
- Hinojosa LE, Hernandez T, de Acosta CM, Montero E, Perez R y Lopez-Requena A (2010) Construction of a recombinant non-mitogenic anti-human CD3 antibody. *Hybridoma (Larchmt).* **29** (2): 115-124.

- Holmberg D, Forsgren S, Forni L, Ivars F y Coutinho A (1984a) Idiotypic determinants of natural IgM antibodies that resemble self Ia antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**(10): 3175-3179.
- Holmberg D, Forsgren S, Ivars F y Coutinho A (1984b) Reactions among IgM antibodies derived from normal, neonatal mice. *Eur J Immunol.* **14** (5): 435-441.
- Holmberg D (1987) High connectivity, natural antibodies preferentially use 7183 and QUPC 52 VH families. *Eur J Immunol.* **17** (3): 399-403.
- Hunziker W y Fumey C (1994) A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J.* **13** (13): 2963-2969.
- Inman J y (1978) The antibody combining region: Speculation on the hypothesis of general multispecificity. Theoretical immunology (H. Bell et al., eds.). *Marcel Dekker, Inc., New York.* 243-278.
- Iwahashi M, Milenic DE, Padlan EA, Bei R, Schlom J y Kashmiri SV (1999) CDR substitutions of a humanized monoclonal antibody (CC49): contributions of individual CDRs to antigen binding and immunogenicity. *Mol Immunol.* **36** (15-16): 1079-1091.
- James LC y Tawfik DS (2003a) Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci.* **28** (7): 361-368.
- James LC, Roversi P y Tawfik DS (2003) Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science.* **299** (5611): 1362-1367.
- James LC y Tawfik DS (2003b) The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness. *Protein Sci.* **12** (10): 2183-2193.
- Janeway CA, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2005). En: *Immunobiology 6th ed.* G. Science, ISBN 0815341016: pp.
- Jerne NK (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris).* **125C** (1-2): 373-389.
- Jerne NK (1984) Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev.* **79**: 5-24.
- Jimenez R, Salazar G, Baldrige KK y Romesberg FE (2003) Flexibility and molecular recognition in the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (1): 92-97.
- Jimenez R, Salazar G, Yin J, Joo T y Romesberg FE (2004) Protein dynamics and the immunological evolution of molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101** (11): 3803-3808.
- Jin H, Sepulveda J y Burrone OR (2003) Selection and characterisation of binders based on homodimerisation of immunoglobulin V(H) domains. *FEBS Lett.* **554** (3): 323-329.
- Johnston CM, Wood AL, Bolland DJ y Corcoran AE (2006) Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J Immunol.* **176** (7): 4221-4234.
- Jones B, Tite JP y Janeway CA, Jr. (1986a) Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen-triggered cytotoxicity of L3T4-positive, I-A-restricted T cell clones. *J Immunol.* **136** (1): 348-356.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS y Winter G (1986b) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* **321**(6069): 522-525.
- Joshi T, Ganesan LP, Cao X y Tridandapani S (2006) Molecular analysis of expression and function of hFcγRIIb1 and b2 isoforms in myeloid cells. *Mol Immunol.* **43** (7): 839-850.
- Kabat E, Wu T, Perry H, Gottesmann K y Foeller C (1991) Sequences of proteins of immunological interest. *Department of Health and Human Service, U.S. Government Printing Office.*
- Kalergis AM y Ravetch JV (2002) Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J Exp Med.* **195** (12): 1653-1659.
- Kaminski MJ, MacKenzie CR, Mooibroek MJ, Dahms TE, Hiramata T, Houghton AN, Chapman PB y Evans SV (1999) The role of homophilic binding in anti-tumor antibody R24 recognition of molecular surfaces. Demonstration of an intermolecular beta-sheet interaction between vh domains. *J Biol Chem.* **274** (9): 5597-5604.
- Kammann M, Laufs J, Schell J y Gronenborn B (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res.* **17** (13): 5404.
- Kang CY y Kohler H (1986) A novel chimeric antibody with circular network characteristics: antibody. *Ann N Y Acad Sci.* **475**: 114-122.

- Kang CY, Brunck TK, Kieber-Emmons T, Blalock JE y Kohler H (1988) Inhibition of self-binding antibodies (autobodies) by a VH-derived peptide. *Science*. **240** (4855): 1034-1036.
- Kannagi R, Yin J, Miyazaki K y Izawa M (2008) Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta*. **1780** (3): 525-531.
- Kantor AB (1996) V-gene usage and N-region insertions in B-1a, B-1b and conventional B cells. *Semin Immunol*. **8** (1): 29-35.
- Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA y Hillson JL (1997) An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol*. **158**(3): 1175-1186.
- Kasaian MT, Ikematsu H y Casali P (1991) CD5+ B lymphocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*. **197** (3): 226-241.
- Kasaian MT, Ikematsu H y Casali P (1992) Identification and analysis of a novel human surface CD5-B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol*. **148** (9): 2690-2702.
- Kato I, Takai T y Kudo A (2002) The pre-B cell receptor signaling for apoptosis is negatively regulated by Fc gamma RIIB. *J Immunol*. **168** (2): 629-634.
- Kato K, Sautes-Fridman C, Yamada W, Kobayashi K, Uchiyama S, Kim H, Enokizono J, Galinha A, Kobayashi Y, Fridman WH, Arata Y y Shimada I (2000) Structural basis of the interaction between IgG and Fc gamma receptors. *J Mol Biol*. **295** (2): 213-224.
- Kaveri SV, Halpern R, Kang CY y Kohler H (1991) Antibodies of different specificities are self-binding: implication for antibody diversity. *Mol Immunol*. **28** (7): 773-778.
- Kazatchkine MD y Kaveri SV (2001) Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med*. **345** (10): 747-755.
- Keitel T, Kramer A, Wessner H, Scholz C, Schneider-Mergener J y Hohne W (1997) Crystallographic analysis of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody cross-reactivity and polyspecificity. *Cell*. **91** (6): 811-820.
- Kettleborough CA, Saldanha J, Heath VJ, Morrison CJ y Bendig MM (1991) Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng*. **4** (7): 773-783.
- Kipps TJ (1997) Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. **4** (4): 268-276.
- Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H y Clifford P (1968) Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res*. **28** (7): 1300-1310.
- Koeffler HP, Billing R, Lusic AJ, Sparkes R y Golde DW (1980) An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood*. **56** (2): 265-273.
- Kofler R, Geley S, Kofler H y Helmborg A (1992) Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses. *Immunol Rev*. **128**: 5-21.
- Kohler H y Paul S (1998) Superantibody activities: new players in innate and adaptive immune responses. *Immunol Today*. **19** (5): 221-227.
- Kohler H (2000) Superantibodies: synergy of innate and acquired immunity. *Appl Biochem Biotechnol*. **83** (1-3): 1-9; discussion 10-12, 145-153.
- Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W y Schneider-Mergener J (1997) Molecular basis for the binding promiscuity of an anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody. *Cell*. **91** (6): 799-809.
- Krause I y Shoenfeld Y (2005) Intravenous immunoglobulin treatment for fibrosis, atherosclerosis, and malignant conditions. *Methods Mol Med*. **109**: 403-408.
- Krengel U, Olsson LL, Martinez C, Talavera A, Rojas G, Mier E, Angstrom J y Moreno E (2004) Structure and molecular interactions of a unique antitumor antibody specific for N-glycolyl GM3. *J Biol Chem*. **279** (7): 5597-5603.
- Kretzschmar T y von Ruden T (2002) Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol*. **13** (6): 598-602.
- Kroese FG, Ammerlaan WA y Deenen GJ (1992) Location and function of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci*. **651**: 44-58.
- Kuby J (1998) Organization and expression of immunoglobulin genes: Generation of antibody diversity. En: Kuby J, Immunology (3rd edition). W. H. Freeman and Co., New York, pp. 178-184.

- Lafaille JJ, DeCloux A, Bonneville M, Takagaki Y y Tonegawa S (1989) Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell*. **59** (5): 859-870.
- Lalor PA y Morahan G (1990) The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. *Eur J Immunol*. **20** (3): 485-492.
- Lamoyi E y Nisonoff A (1983) Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *J Immunol Methods*. **56** (2): 235-243.
- Lassaletta Atienza A (2004) Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integral* **VIII**(5): 435-442.
- Lawler AM, Kearney JF, Kuehl M y Gearhart PJ (1989) Early rearrangements of genes encoding murine immunoglobulin kappa chains, unlike genes encoding heavy chains, use variable gene segments dispersed throughout the locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86** (17): 6744-6747.
- Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ y Dahiyat BI (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103** (11): 4005-4010.
- Leibiger H, Wustner D, Stigler RD y Marx U (1999) Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J*. **338** ( Pt 2): 529-538.
- Levitt M y Perutz MF (1988) Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors. *J Mol Biol*. **201** (4): 751-754.
- Lindner AB, Eshhar Z y Tawfik DS (1999) Conformational changes affect binding and catalysis by ester-hydrolysing antibodies. *J Mol Biol*. **285** (1): 421-430.
- Liu W, Won Sohn H, Tolar P, Meckel T y Pierce SK (2010) Antigen-induced oligomerization of the B cell receptor is an early target of Fc gamma RIIB inhibition. *J Immunol*. **184** (4): 1977-1989.
- Livingston PO y Ragupathi G (1997) Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 2. Previous experience and future plans. *Cancer Immunol Immunother*. **45** (1): 10-19.
- LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, Haynes A, Rogers K, Harvey EB, Sun L, Ghraryeb J y Khazaeli MB (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86** (11): 4220-4224.
- Lopes JD y Mariano M (2009) B-1 cell: the precursor of a novel mononuclear phagocyte with immuno-regulatory properties. *An Acad Bras Cienc*. **81** (3): 489-496.
- López-Requena A, Mateo de Acosta C, Perez A, Valle A, Lombardero J, Sosa K, Perez R y Vazquez AM (2003) Chimeric anti-N-glycolyl-ganglioside and its anti-idiotypic MAbs: immunodominance of their variable regions. *Hybrid Hybridomics*. **22**(4): 235-243.
- López-Requena A, Mateo De Acosta C, Vazquez AM y Perez R (2007a) Immunogenicity of autologous immunoglobulins: principles and practices. *Mol Immunol*. **44** (11): 3076-3082.
- López-Requena A, Rodríguez M, de Acosta CM, Moreno E, Puchades Y, Gonzalez M, Talavera A, Valle A, Hernandez T, Vazquez AM y Perez R (2007b) Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies II. Light versus heavy chain: An idiotype-anti-idiotype case study. *Mol Immunol*. **44** (5): 1015-1028.
- López-Requena A, De Acosta CM, Moreno E, Gonzalez M, Puchades Y, Talavera A, Vispo NS, Vazquez AM y Perez R (2007c) Gangliosides, Ab1 and Ab2 antibodies I. Towards a molecular dissection of an idiotype-anti-idiotype system. *Mol Immunol*. **44** (4): 423-433.
- Louzir H, Ternynck T, Gorgi Y, Ayed K y Avrameas S (1988) Enzyme immunoassay analysis of antibody specificities present in the circulating immune complexes of selected pathological sera. *J Immunol Methods*. **114** (1-2): 145-153.
- MacCallum RM, Martin AC y Thornton JM (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*. **262** (5): 732-745.
- Macías A, Arce S, Leon J, Mustelier G, Bombino G, Domarco A, Perez R y Lage A (1999) Novel cross-reactive anti-idiotype antibodies with properties close to the human intravenous immunoglobulin (IVIg). *Hybridoma*. **18** (3): 263-272.
- Mak TW y Simard JLL, Eds. (1998). Handbook of Immune Response Genes. Chapter: B-Lymphocyte Genes. New York, Plenum Press.
- Malykh YN, Schauer R y Shaw L (2001) N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie*. **83** (7): 623-634.

- Manivel V, Sahoo NC, Salunke DM y Rao KV (2000) Maturation of an antibody response is governed by modulations in flexibility of the antigen-combining site. *Immunity*. **13** (5): 611-620.
- Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, Perez R y Ando S (1996) Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res*. **56** (22): 5165-5171.
- Martin SE y Martin WJ (1975) Naturally occurring cytotoxic tumour reactive antibodies directed against type C viral envelope antigens. *Nature*. **256** (5517): 498-499.
- Martin T, Crouzier R, Weber JC, Kipps TJ y Pasquali JL (1994) Structure-function studies on a polyreactive (natural) autoantibody. Polyreactivity is dependent on somatically generated sequences in the third complementarity-determining region of the antibody heavy chain. *J Immunol*. **152** (12): 5988-5996.
- Mateo C, Moreno E, Amour K, Lombardero J, Harris W y Perez R (1997) Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology*. **3** (1): 71-81.
- Mateo C, Lombardero J, Moreno E, Morales A, Bombino G, Coloma J, Wims L, Morrison SL y Perez R (2000) Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma*. **19** (6): 463-471.
- Matsumiya S, Yamaguchi Y, Saito J, Nagano M, Sasakawa H, Otaki S, Satoh M, Shitara K y Kato K (2007) Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. *J Mol Biol*. **368** (3): 767-779.
- Matter K, Yamamoto EM y Mellman I (1994) Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol*. **126** (4): 991-1004.
- Metzger H (1992) Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol*. **149**(5): 1477-1487.
- Mian IS, Bradwell AR y Olson AJ (1991) Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol*. **217** (1): 133-151.
- Miettinen HM, Rose JK y Mellman I (1989) Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity. *Cell*. **58** (2): 317-327.
- Miettinen HM, Matter K, Hunziker W, Rose JK y Mellman I (1992) Fc receptor endocytosis is controlled by a cytoplasmic domain determinant that actively prevents coated pit localization. *J Cell Biol*. **116** (4): 875-888.
- Mimura Y, Church S, Ghirlando R, Ashton PR, Dong S, Goodall M, Lund J y Jefferis R (2000) The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol Immunol*. **37** (12-13): 697-706.
- Mimura Y, Sondermann P, Ghirlando R, Lund J, Young SP, Goodall M y Jefferis R (2001) Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem*. **276** (49): 45539-45547.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA y Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81** (21): 6851-6855.
- Morrison SL (1985) Transfectomas provide novel chimeric antibodies. *Science*. **229** (4719): 1202-1207.
- Morrison SL (2005). Handbook of carbohydrate engineering, Chapter 20. C. Press.
- Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC y Ravetch JV (1994) A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature*. **369** (6478): 340.
- Negi VS, Elluru S, Siberil S, Graff-Dubois S, Mouthon L, Kazatchkine MD, Lacroix-Desmazes S, Bayry J y Kaveri SV (2007) Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. *J Clin Immunol*. **27** (3): 233-245.
- Nimmerjahn F y Ravetch JV (2006) Fc gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity*. **24** (1): 19-28.
- Nimmerjahn F y Ravetch JV (2007) Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol*. **19** (2): 239-245.
- Nimmerjahn F y Ravetch JV (2008) Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. **8** (1): 34-47.

- Noel D, Bernardi T, Navarro-Teulon I, Marin M, Martinetto JP, Ducancel F, Mani JC, Pau B, Piechaczyk M y Biard-Piechaczyk M (1996) Analysis of the individual contributions of immunoglobulin heavy and light chains to the binding of antigen using cell transfection and plasmon resonance analysis. *J Immunol Methods*. **193** (2): 177-187.
- Nose M y Wigzell H (1983) Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80** (21): 6632-6636.
- Notkins AL (2004) Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol*. **25** (4): 174-179.
- Ochsenbein AF y Zinkernagel RM (2000) Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today*. **21** (12): 624-630.
- Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, Wakitani M, Uchida K, Kakita S, Tsumoto K, Kumagai I y Shitara K (2004) Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J Mol Biol*. **336** (5): 1239-1249.
- Oldstone MB (1998) Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J*. **12** (13): 1255-1265.
- Ono M, Bolland S, Tempst P y Ravetch JV (1996) Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(γ)RIIB. *Nature*. **383** (6597): 263-266.
- Ono M, Okada H, Bolland S, Yanagi S, Kurosaki T y Ravetch JV (1997) Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell*. **90** (2): 293-301.
- Oudin J y Michel M (1963) [A new allotype form of rabbit serum gamma-globulins, apparently associated with antibody function and specificity]. *C R Hebd Seances Acad Sci*. **257**: 805-808.
- Ounanian A, Guilbert B, Renversez JC, Seigneurin JM y Avrameas S (1990) Antibodies to viral antigens, xenoantigens, and autoantigens in Alzheimer's disease. *J Clin Lab Anal*. **4** (5): 367-375.
- Padlan EA, Silverton EW, Sheriff S, Cohen GH, Smith-Gill SJ y Davies DR (1989) Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86** (15): 5938-5942.
- Padlan EA (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*. **31** (3): 169-217.
- Parker BR (1997) Leukemia and lymphoma in childhood. *Radiol Clin North Am*. **35** (6): 1495-1516.
- Paul S (1998) Mechanism and functional role of antibody catalysis. *Appl Biochem Biotechnol*. **75** (1): 13-24.
- Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T y Ravetch JV (1999) SHIP recruitment attenuates Fc γRIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity*. **10** (6): 753-760.
- Perelson AS y Oster GF (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol*. **81** (4): 645-670.
- Perez LG, Costa MR, Todd CA, Haynes BF y Montefiori DC (2009) Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. *J Virol*. **83** (15): 7397-7410.
- Phillips NE y Parker DC (1984) Cross-linking of B lymphocyte Fc γ receptors and membrane immunoglobulin inhibits anti-immunoglobulin-induced blastogenesis. *J Immunol*. **132** (2): 627-632.
- Poljak RJ, Amzel LM, Avey HP, Chen BL, Phizackerley RP y Saul F (1973) Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **70** (12): 3305-3310.
- Portuondo H (1996) Estudio inmunoquímico de un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico. *Tesis de Grado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana*.
- Poskitt DC, Jean-Francois MJ, Turnbull S, Macdonald L y Yasmeen D (1991) Internal image (Ab2 beta) anti-idiotypic vaccines. Theoretical and practical aspects. *Vaccine*. **9** (11): 792-796.
- Potter KN, Li Y, Mageed RA, Jefferis R y Capra JD (1998) Anti-idiotypic antibody D12 and superantigen SPA both interact with human VH3-encoded antibodies on the external face of the heavy chain involving FR1, CDR2 and FR3. *Mol Immunol*. **35** (18): 1179-1187.
- Pulvertaft JV (1964) Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet*. **1** (7327): 238-240.
- Qin D, Wu J, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T y Tew JG (2000) Fc γ receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J Immunol*. **164** (12): 6268-6275.

- Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C y Sun PD (2001) The structure of a human type III Fc $\gamma$  receptor in complex with Fc. *J Biol Chem.* **276** (19): 16469-16477.
- Radaev S y Sun P (2002) Recognition of immunoglobulins by Fc $\gamma$  receptors. *Mol Immunol.* **38** (14): 1073-1083.
- Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T y Hiepe F (2006) Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* **6** (10): 741-750.
- Rahman ZS, Niu H, Perry D, Wakeland E, Manser T y Morel L (2007) Expression of the autoimmune Fc $\gamma$ 2b NZW allele fails to be upregulated in germinal center B cells and is associated with increased IgG production. *Genes Immun.* **8** (7): 604-612.
- Rajagopalan K, Pavlinkova G, Levy S, Pokkuluri PR, Schiffer M, Haley BE y Kohler H (1996) Novel unconventional binding site in the variable region of immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93** (12): 6019-6024.
- Rankin CT, Veri MC, Gorlatov S, Tuaille N, Burke S, Huang L, Inzunza HD, Li H, Thomas S, Johnson S, Stavenhagen J, Koenig S y Bonvini E (2006) CD32B, the human inhibitory Fc $\gamma$  receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood.* **108** (7): 2384-2391.
- Ravetch JV y Lanier LL (2000) Immune inhibitory receptors. *Science.* **290** (5489): 84-89.
- Ravetch JV (2003) *Fundamental Immunology* (ed. Paul, W. E.) (Lippincott-Raven, Philadelphia, 2003). 685-700
- Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P y Amigorena S (1999) Fc $\gamma$  receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* **189** (2): 371-380.
- Reid RR, Prodeus AP, Khan W, Hsu T, Rosen FS y Carroll MC (1997) Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. *J Immunol.* **159** (2): 970-975.
- Retter I, Althaus HH, Munch R y Muller W (2005) VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res.* **33** (Database issue): D671-674.
- Richards FF, Konigsberg WH, Rosenstein RW y Varga JM (1975) On the specificity of antibodies. *Science.* **187** (4172): 130-137.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H y Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.* **332** (6162): 323-327.
- Ritter MA (2000) Polyclonal and monoclonal antibodies. *Methods Mol Med.* **40**: 23-34.
- Rojas G, Talavera A, Munoz Y, Rengifo E, Krengel U, Angstrom J, Gavilondo J y Moreno E (2004) Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside. *J Immunol Methods.* **293** (1-2): 71-83.
- Roque-Navarro L, Mateo C, Lombardero J, Mustelier G, Fernandez A, Sosa K, Morrison SL y Perez R (2003) Humanization of predicted T-cell epitopes reduces the immunogenicity of chimeric antibodies: new evidence supporting a simple method. *Hybrid Hybridomics.* **22** (4): 245-257.
- Roque-Navarro L, Chakraborty K, de Leon J, Rodriguez S, Toledo C, Carr A, de Acosta CM, Hueber AO y Perez R (2008) Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol Cancer Ther.* **7** (7): 2033-2041.
- Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W y Tonegawa S (1980) Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature.* **286** (5774): 676-683.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sarmay G, Lund J, Rozsnyay Z, Gergely J y Jefferis R (1992) Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc  $\gamma$  receptor. *Mol Immunol.* **29** (5): 633-639.
- Sasso EH, Silverman GJ y Mannik M (1989) Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. *J Immunol.* **142** (8): 2778-2783.

- Schillbach JF, Near RI, Bruccoleri RE, Haber E, Jeffrey PD, Novotny J, Sheriff S y Margolies MN (1993) Modulation of antibody affinity by a non-contact residue. *Protein Sci.* **2** (2): 206-214.
- Seidl KJ, Wilshire JA, MacKenzie JD, Kantor AB y Herzenberg LA (1999) Predominant VH genes expressed in innate antibodies are associated with distinctive antigen-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96** (5): 2262-2267.
- Sepulveda J, Jin H, Sblattero D, Bradbury A y Burrone OR (2003) Binders based on dimerised immunoglobulin VH domains. *J Mol Biol.* **333** (2): 355-365.
- Shi J, McIntosh RS y Pleass RJ (2006) Antibody- and Fc-receptor-based therapeutics for malaria. *Clin Sci (Lond).* **110** (1): 11-19.
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA y Presta LG (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* **276** (9): 6591-6604.
- Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A, Wolfowicz CB, Rothstein TL y Weigert MG (1987) The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature.* **328** (6133): 805-811.
- Shoenfeld Y (2004) The idiotypic network in autoimmunity: antibodies that bind antibodies that bind antibodies. *Nat Med.* **10** (1): 17-18.
- Siberil S, Dutertre CA, Boix C, Bonnin E, Menez R, Stura E, Jorieux S, Fridman WH y Teillaud JL (2006) Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett.* **106** (2): 111-118.
- Sidman CL y Unanue ER (1976) Control of B-lymphocyte function. I. Inactivation of mitogenesis by interactions with surface immunoglobulin and Fc-receptor molecules. *J Exp Med.* **144** (4): 882-896.
- Sigounas G, Harindranath N, Donadel G y Notkins AL (1994) Half-life of polyreactive antibodies. *J Clin Immunol.* **14** (2): 134-140.
- Smith KG y Clatworthy MR (2010) Fc gamma RIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol.* **10** (5): 328-343.
- Sohn HW, Pierce SK y Tzeng SJ (2008) Live cell imaging reveals that the inhibitory Fc gamma RIIB destabilizes B cell receptor membrane-lipid interactions and blocks immune synapse formation. *J Immunol.* **180** (2): 793-799.
- Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V y Jacob U (2000) The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gamma RIII complex. *Nature.* **406** (6793): 267-273.
- Stout RD y Herzenberg LA (1975) The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. I. Detection of a subpopulation of murine T lymphocytes bearing the Fc receptor. *J Exp Med.* **142** (3): 611-621.
- Striebich CC, Miceli RM, Schulze DH, Kelsoe G y Cerny J (1990) Antigen-binding repertoire and Ig H chain gene usage among B cell hybridomas from normal and autoimmune mice. *J Immunol.* **144** (5): 1857-1865.
- Takai T (2002) Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* **2**(8): 580-592.
- Tanaka T y Nei M (1989) Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. *Mol Biol Evol.* **6** (5): 447-459.
- Tchernychev B, Rabinkov A, Mirelman D y Wilchek M (1995) Natural antibodies to dietary proteins: the existence of natural antibodies to alliinase (Alliin lyase) and mannose-specific lectin from garlic (*Allium sativum*) in human serum. *Immunol Lett.* **47** (1-2): 53-57.
- Tchernychev B y Wilchek M (1996) Natural human antibodies to dietary lectins. *FEBS Lett.* **397** (2-3): 139-142.
- Tempest PR, Bremner P, Lambert M, Taylor G, Furze JM, Carr FJ y Harris WJ (1991) Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo. *Biotechnology (N Y).* **9** (3): 266-271.
- Ternynck T y Avrameas S (1986) Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol Rev.* **94**: 99-112.
- Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, Sato K, Oshimura M y Ishida I (2000) Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** (2): 722-727.

- Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer EL y Winter G (1996) The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J Mol Biol.* **256** (5): 813-817.
- Tonegawa S, Sakano H, Make R, Traunecker A, Heinrich G, Roeder W y Kurosawa Y (1981) Somatic reorganization of immunoglobulin genes during lymphocyte differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **45 Pt 2**: 839-858.
- Torres M y Casadevall A (2008) The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. *Trends Immunol.* **29** (2): 91-97.
- Tramontano A, Chothia C y Lesk AM (1990) Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol.* **215** (1): 175-182.
- Trinh CH, Hemmington SD, Verhoeyen ME y Phillips SE (1997) Antibody fragment Fv4155 bound to two closely related steroid hormones: the structural basis of fine specificity. *Structure.* **5** (7): 937-948.
- Tulip WR, Varghese JN, Webster RG, Laver WG y Colman PM (1992) Crystal structures of two mutant neuraminidase-antibody complexes with amino acid substitutions in the interface. *J Mol Biol.* **227** (1): 149-159.
- Tzeng SJ, Bolland S, Inabe K, Kurosaki T y Pierce SK (2005) The B cell inhibitory Fc receptor triggers apoptosis by a novel c-Abl family kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* **280** (42): 35247-35254.
- Vakil M y Kearney JF (1986) Functional characterization of monoclonal auto-anti-idiotypic antibodies isolated from the early B cell repertoire of BALB/c mice. *Eur J Immunol.* **16** (9): 1151-1158.
- Varela FJ y Coutinho A (1991) Second generation immune networks. *Immunol Today.* **12** (5): 159-166.
- Vázquez AM, Alfonso M, Lanne B, Karlsson KA, Carr A, Barroso O, Fernandez LE, Rengifo E, Lanio ME y Alvarez C (1995) Generation of a murine monoclonal antibody specific for N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids. *Hybridoma.* **14** (6): 551-556.
- Vázquez AM, Perez A, Hernandez AM, Macias A, Alfonso M, Bombino G y Perez R (1998) Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody. *Hybridoma.* **17** (6): 527-534.
- Vázquez AM, Tormo B. R. , Alfonso M. , Velandia A. , Fernández L. E. , y Giscombe R. AY, Jeddi Tehrani M., Cedenño M. , Toledo A. L. , y cols. (1995) Characterization of ior C5 colorectal tumor associated antigen. *Inmunología.* (14): 130-132.
- Verma A, Ngundi MM, Meade BD, De Pascalis R, Elkins KL y Burns DL (2009) Analysis of the Fc gamma receptor-dependent component of neutralization measured by anthrax toxin neutralization assays. *Clin Vaccine Immunol.* **16** (10): 1405-1412.
- Vigna AF, Godoy LC, Rogerio de Almeida S, Mariano M y Lopes JD (2002) Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. *Immunol Lett.* **83** (1): 61-66.
- Vollmers HP y Brandlein S (2007) Natural antibodies and cancer. *J Autoimmun.* **29** (4): 295-302.
- Voulot C, Aubert C, Rouge F, Douss T y Santini R (1985) [Metastatic melanoma B16 of the C57Bl/6J mouse. Biological findings]. *C R Seances Soc Biol Fil.* **179** (4): 445-451.
- Wagner SD, Milstein C y Neuberger MS (1995) Codon bias targets mutation. *Nature.* **376** (6543): 732.
- Walker JA y Smith KG (2008) Dependence of surface monoclonal antibody binding on dynamic changes in Fc gammaRIIb expression. *Immunology.* **124** (3): 412-418.
- Wedemayer GJ, Patten PA, Wang LH, Schultz PG y Stevens RC (1997) Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science.* **276** (5319): 1665-1669.
- Werwitzke S, Trick D, Sondermann P, Kamino K, Schlegelberger B, Kniesch K, Tiede A, Jacob U, Schmidt RE y Witte T (2008) Treatment of lupus-prone NZB/NZW F1 mice with recombinant soluble Fc gamma receptor II (CD32). *Ann Rheum Dis.* **67** (2): 154-161.
- Whitelegg NR y Rees AR (2000) WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng.* **13** (12): 819-824.
- Winkler M, Franssen JD, Collignon C, Leo O, Mariame B, van de Walle P, de Groot D y Urbain J (1979) Idiotypic regulation of the immune system. Common idiotypic specificities between

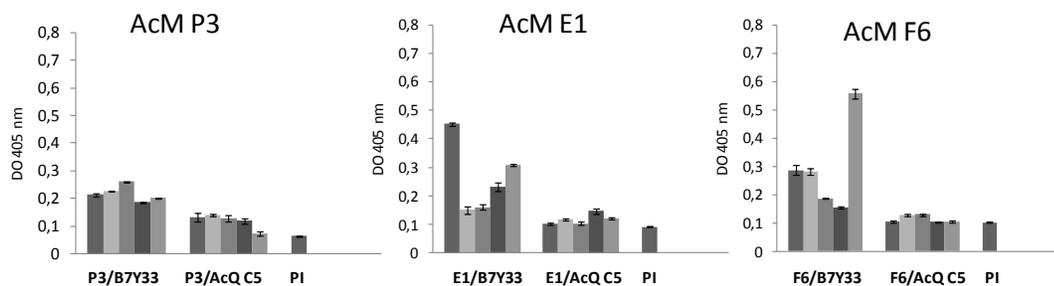
- idiotypes and antibodies raised against anti-idiotypic antibodies in rabbits. *J Exp Med.* **150** (1): 184-195.
- Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC y von Stebut E (2006) Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med.* **203** (1): 177-188.
- Wright A, Tao MH, Kabat EA y Morrison SL (1991) Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J.* **10** (10): 2717-2723.
- Wright A, Shin SU y Morrison SL (1992) Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Crit Rev Immunol.* **12** (3-4): 125-168.
- Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM y Smith KG (2007) FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol.* **8** (4): 419-429.
- Xu D, Alegre ML, Varga SS, Rothermel AL, Collins AM, Pulito VL, Hanna LS, Dolan KP, Parren PW, Bluestone JA, Jolliffe LK y Zivin RA (2000) In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell Immunol.* **200** (1): 16-26.
- Yamashita Y, Phee H, Tudor KS, Rossi MI, Parnes JR, Coggeshall KM y Kincade PW (2006) A unique CD72 epitope suggests a potential interaction with Fc γ RII/CD32 on B lineage lymphocytes. *Hybridoma (Larchmt).* **25** (3): 107-114.
- Yan X, Evans SV, Kaminski MJ, Gillies SD, Reisfeld RA, Houghton AN y Chapman PB (1996) Characterization of an Ig VH idiotope that results in specific homophilic binding and increased avidity for antigen. *J Immunol.* **157** (4): 1582-1588.
- Yoo EM, Chintalacharuvu KR, Penichet ML y Morrison SL (2002) Myeloma expression systems. *J Immunol Methods.* **261** (1-2): 1-20.
- Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, Brooks AG, Fridman WH, Sautes-Fridman C y Sun PD (2000) Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc γ RIII. *Immunity.* **13**(3): 387-395.
- Zhao Y, Lou D, Burke J y Kohler H (2002) Enhanced anti-B-cell tumor effects with anti-CD20 superantibody. *J Immunother.* **25** (1): 57-62.
- Zhao Y, Russ M, Morgan C, Muller S y Kohler H (2005) Therapeutic applications of superantibodies. *Drug Discov Today.* **10** (18): 1231-1236.
- Zheng Z, Venkatapathy S, Rao G y Harrington CA (2002) Expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia suggests deficient CD1-mediated immunity, polarized cytokine response, altered adhesion and increased intracellular protein transport and processing of leukemic cells. *Leukemia.* **16** (12): 2429-2437.
- Zhou Q, Shankara S, Roy A, Qiu H, Estes S, McVie-Wylie A, Culm-Merdek K, Park A, Pan C y Edmunds T (2008) Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. *Biotechnol Bioeng.* **99** (3): 652-665.
- Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, Johnson P, Hamblin TJ y Stevenson FK (2002) Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood.* **99** (7): 2562-2568.
- Zusman T, Lisansky E, Arons E, Anavi R, Bonnerot C, Sautes C, Fridman WH, Witz IP y Ran M (1996) Contribution of the intracellular domain of murine Fc-γ receptor type IIB1 to its tumor-enhancing potential. *Int J Cancer.* **68** (2): 219-227.



---

## 9. ANEXOS

### Anexo I.



**Figura I.** Respuesta de IgG contra AcMs anti-gangliósidos. Sueros de ratones BALB/c inoculados con los AcMs P3, E1 y F6 mezclados con los AcQs B7Y33 o C5 (tomados 7 días después de la primera dosis), se enfrentaron a placas recubiertas con 10 µg/ml de los anticuerpos murinos usados en cada administración. La reactividad de los sueros, diluidos 1:50, se determinó con un antisuero específico por el fragmento Fc $\gamma$  de ratón, conjugado a fosfatasa alcalina. Se muestran los promedios de los valores de absorbancia de cada uno de los ratones y un suero preinmune representativo.

---

## AUTOBIBLIOGRAFÍA

### Publicaciones del autor relacionadas con el tema de la tesis:

**Hernández T**, López-Requena A, De Acosta CM, Mustelier G, Roque-Navarro L, Pérez R. B7 and 34B7 monoclonal antibodies: a theoretical approach to the molecular basis of immunoglobulin cross-reactive antibodies. *Hybridoma (Larchmt)*. 2007; 26: 66.

**Hernández T**, De Acosta CM, López-Requena A, Moreno E, Alonso R., Fernández-Marrero Y, Pérez R. Non-classical binding of a polyreactive  $\alpha$  type anti-idiotypic antibody to B cells. *Molecular Immunology*. 2010; 48: 98.

---

***Presentaciones en eventos científicos relacionadas con el tema de la tesis:***

VI Congreso Latinoamericano de Inmunología y III Congreso Cubano de Inmunología. Diciembre 2002, Habana, Cuba.

XI Conferencia Internacional de Anticuerpos Humanos e Hibridomas. Octubre 2004, Dublín, Irlanda.

Taller Internacional: “Inmunoterapia para el Nuevo Siglo” (IT-2004). Diciembre 2004, Habana, Cuba.

V Congreso Nacional de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. Mayo 2005, Habana, Cuba.

Congreso: Enfermedades Inmunes, de la teoría a la terapia, Rusia, 2005.

Taller Internacional: “Inmunoterapia para el Nuevo Siglo” (IT-2006). Diciembre 2006, Habana, Cuba.

V Congreso de la Sociedad Cubana de Inmunología. Febrero, 2006, Santiago de Cuba, Cuba.

XI Conferencia Internacional de Anticuerpos Humanos e Hibridomas. Mayo 2006, Montego Bay, Jamaica.

VI Congreso de la Sociedad Cubana de Inmunología, Camaguey, Cuba, 2008.

Taller Internacional: “Inmunoterapia para el Nuevo Siglo” (IT-2008). Diciembre 2006, Habana, Cuba.

VII Congreso Intrenacional de Química e Ingeniería Química, Cuba, 2009

XVII Conferencia Internacional de Anticuerpos Humanos e Hibridomas (Porto, 2010).

---

***Otras publicaciones del autor:***

- Herrera A, Galban E, **Hernández T**, Sandez B, Duarte C. A family of Compact Plasmid Vectors for DNA Immunization in Humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000; 279: 548.
- Sánchez B, Suárez E, Garrido G, **Hernández T**, Pérez R, Ulrich A Fernández LE. Active anti-metastatic immunotherapy in Lewis Lung Carcinoma with self EGFR extra cellular domain protein in VSSP adjuvant. *International Journal of Cancer*. 2006; 119:2190.
- López-Requena A, Rodríguez M, de Acosta CM, Moreno E, Puchades Y, González M, Talavera A, Valle A, **Hernández T**, Vázquez AM, Pérez R. Gangliosides, AB1 and AB2 antibodies. II. Light versus heavy chain: an idiotype- antiidiotype case study. *Molecular Immunology*. 2007; 44:1015.
- Hinojosa LE, **Hernández T**, de Acosta CM, Montero E, Pérez R, López-Requena A. Construction of a recombinant non-mitogenic anti-human CD3 antibody. *Hybridoma (Larchmt)*. 2010; 29:115.
- Fernández-Marrero Y., **Hernández T.**, Roque-Navarro L., Talavera A., Moreno E., Griñan T., Vazquez AM, Mateo de Acosta C., Pérez R., Lopez-Requena A. Switching on cytotoxicity by a single mutation at the heavy chain variable region of an anti-ganglioside antibody. *Molecular Immunology*. 2011; 48:1059.
- Fernández-Marrero Y., Roque-Navarro L., **Hernández T.**, Dorvignit D., Molina-Pérez M., González A., Sosa K., López-Requena A., Pérez R., Mateo de Acosta C. A cytotoxic humanized anti-ganglioside antibody produced in a murine cell line defective of *N*-glycolylated-glycoconjugates. *Immunobiology*. 2011. En impresión.