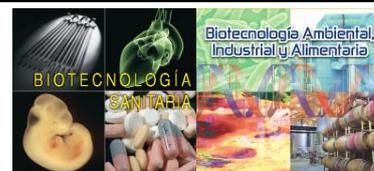


## Charla

## Producción en bacterias de minianticuerpos anti-gluten recombinantes.



Patricia Segovia Menacho(1,\*), Mercedes Sánchez Infante(1), Matilde Revuelta González(2) y Miguel Arévalo Rodríguez(1)

(1)Biomedal S.L., Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

(2)Dpto. Sistemas Físicos, Químicos y Naturales, Universidad Pablo de Olavide

*Palabras clave:* gluten; anticuerpos; RT-PCR; inmunoensayo

### RESUMEN

**Motivación:** La celiaquía afecta a un 1% de la población y se caracteriza por una intolerancia al gluten que obliga a seguir una dieta libre del mismo (1). La detección cuantitativa de gluten en alimentos, necesaria para garantizar su aptitud para el consumo por celíacos, utiliza anticuerpos monoclonales (mAbs). La empresa Biomedal S.L. comercializa kits basados en mAbs que reconocen específicamente los péptidos del gluten tóxicos para los celíacos (2). Nos hemos propuesto identificar las secuencias de estos mAbs responsables de la afinidad a gluten, diseñando a partir de ellas anticuerpos minimizados de cadena sencilla (scFv) para producirlos en bacterias como alternativa a los cultivos de hibridomas (3), posibilitando una reducción en los costes de producción y la construcción de variantes mejoradas. Describimos las estrategias seguidas y los inmunoensayos posteriores (4), realizados para confirmar que los minianticuerpos obtenidos mantienen la especificidad de unión al gluten.

**Métodos:** Utilizando la técnica de RT-PCR y una combinación de cebadores específicos y degenerados, se amplificó el cDNA codificante de las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada de uno de los mAbs y se clonó en un vector para su expresión recombinante como scFv. Se llevaron a cabo ensayos de expresión utilizando una cepa especializada de *Escherichia coli*, identificándose mediante SDS-PAGE, Western blot y ELISA las condiciones de cultivo e inducción (temperatura, concentración del inductor) óptimas para la producción del scFv correctamente plegado y funcional. Finalmente, el scFv anti-gluten se purificó mediante cromatografía de afinidad IMAC.

**Resultados:** Se ha conseguido clonar en un vector bacteriano la secuencia codificante de un scFv recombinante anti-gluten. Tras optimizar las condiciones de expresión, los inmunoensayos han confirmado que el minianticuerpo producido en bacteria reacciona específicamente con el gluten. Finalmente, se ha comprobado que el scFv purificado mediante IMAC es funcional.

**Conclusiones:** La expresión recombinante de un scFv anti-gluten en *E. coli* ha permitido comprobar su funcionalidad como versión minimizada del anticuerpo monoclonal original, posibilitando su producción fermentativa y el futuro desarrollo de nuevas variantes moleculares útiles como herramientas biotecnológicas y de investigación, en el campo de la enfermedad celíaca.

### BIBLIOGRAFIA

1. Schuppan, D., & Zimmer, K. P. (2013). The diagnosis and treatment of celiac disease. *Deutsches Ärzteblatt International*, 110(49), 835
2. Morón, B. et al. (2008a). Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 405-414.
3. Strebe, N. et al. (2010). Cloning of Variable Domains from Mouse Hybridoma by PCR. In *Antibody Engineering* (pp. 3-14). Springer Berlin Heidelberg.
4. Schmiedl, A. et al. (2000). Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *Journal of immunological methods*, 242(1), 101-114.

(Las actividades descritas se han desarrollado en el marco del proyecto Bio-AndaluS, apoyado por el CDTI y por la Agencia IDEA y cofinanciado por el programa FEDER - INNTERCONECTA 2012)