

fluorescencia después de cada etapa. Para obtener el valor T_m (constante de equilibrio; proteína sin plegar = proteína plegada) la primera derivada del cambio en la fluorescencia ($\Delta RFU/\Delta^\circ C$) se graficó contra el cambio en la temperatura ($\Delta^\circ C$).

Los resultados se muestran en la Figura 7. Se encontró que el uso del marco humano aumenta la estabilidad de la unión en un formato mAb.

Se condujo un experimento similar para investigar la estabilidad de los dominios de unión equivalentes en un formato de scFv. Para este estudio, se utilizó colorimetría de barrido diferencial. Los experimentos se llevaron a cabo mediante el uso del sistema CAP DSC. Las proteínas en solución amortiguadora de almacenamiento (1 x PBS) se colocaron en la celda de muestra del calorímetro y la celda de referencia se llenó con la solución amortiguadora de almacenamiento sola. Las celdas se estabilizaron dentro del calorímetro durante 1 hora a $25^\circ C$ antes de calentarlas hasta la temperatura final de $100^\circ C$ a una proporción de $200^\circ C$ por hora. La temperatura de desnaturalización, T_m , que corresponde al máximo del pico de transición, se determinó a partir de al menos dos corridas de réplica y no variaron más de $0.25^\circ C$.

Los resultados para una comparación de la unión del scFv se muestran en la Figura 8. La temperatura de fusión del scFv Jovi-1 de ratón fue de $61^\circ C$, considerando que la temperatura de fusión para el scFv (H-AF1, 3aaz) fue de $65^\circ C$.

Ejemplo 4 - Generación de un receptor antigénico quimérico (CAR) con un dominio de unión a antígeno anti-TRBC1 humanizado

Un CAR de segunda generación se diseñó para tener un endodominio 41BB y CD3 zeta y un dominio de unión a antígeno que comprende un scFv JOVI-1 humanizado (H-AF1, 3aaz) como se ilustró de manera esquemática en la Figura 9. Las células T humanas primarias de donadores normales fueron transducidas con vectores retrovirales que expresan el CAR anti-TRBC1 o un CAR EGFRvIII irrelevante como control negativo. La capacidad de las células para eliminar ya sea a células objetivo que expresen TRBC1 o TRBC2 fueron investigadas mediante el uso de citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Figura 10. Las células T que expresaban el CAR TRBC1 humanizado eliminaron a las células objetivo que expresaban TRBC1, pero no a las que expresaban TRBC2.