

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

HUMANIZACIÓN DE ANTICUERPOS DE DOMINIO ÚNICO (VHH) DE LLAMA  
(*Lama glama*) Y SU ACOPLAMIENTO A LA PROTEÍNA FLOURESCENTE  
mWASABI.

TESIS

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

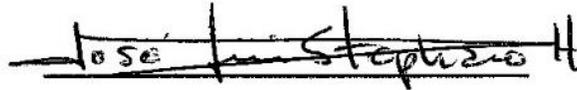
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

FERNADO ANASTACIO LEGGS LÓPEZ

APROBADO POR

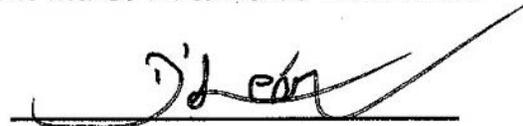
Dr. José Luis Stephano Hornedo



Dra. Amelia Portillo López



Dr. Marco Antonio de León Nava



**Universidad Autónoma de Baja California**

**Facultad de Ciencias Marinas**



**TESIS**

**Humanización de anticuerpos de dominio único (VHH) de llama (*Lama glama*)  
y su acoplamiento a la proteína fluorescente mWasabi**

**Director: Dr. José Luis Stephano Hornedo**

**Presenta: Fernando A. Leggs López**

## DEDICATORIA

Dedicada a 'Kuzco'. La llama inmunizada con la vacuna de influenza A/H1N1/2009 pandémica. Gracias a ella y a sus anticuerpos de sólo cadena pesada iniciaron este proyecto.



## **AGRADECIMIENTOS**

**¡A usted!**

**Gracias, totales!!!!**

## ÍNDICE.

I.	RESUMEN .....	10
II.	INTRODUCCIÓN .....	11
III.	ANTECEDENTES. ....	13
IV.	OBJETIVOS. ....	23
	Objetivo general.....	23
	Objetivos particulares .....	23
V.	HIPÓTESIS.....	24
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	Diseño y síntesis de los VHH 2-C10, 1-D8 y 1-C7.....	25
	Clonación de 2-C10H_pComb3x, 1-D8H_pComb3x y 1-C7H_pComb3x.....	26
	Expresión y purificación de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H .....	28
	Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H a la Vacuna de influenza trivalente por el método de ELISA .....	30
	Prueba de reconocimiento del VHH 2-C10H a la Vacuna de influenza trivalente por Western blot33	
	Expresión y purificación el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína fluorescente mWasabi .....	38
	Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10 acoplado a la proteína fluorescente mWasabi por el método de ELISA.....	40
VII.	RESULTADOS .....	44
	Diseño y síntesis de los VHHs 2-C10, 1-D8 y 1-C7 .....	44
	Clonación de 2-C10H_pComb3x, 1-D8H_pComb3x y 1-C7H_pComb3x.....	49
	Expresión y purificación de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H .....	50
	Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H a la Vacuna de influenza trivalente por el método de ELISA .....	51
	Diseño y síntesis del gen 2-C10mWasabi .....	56
VIII.	DISCUSIÓN.....	67
IX.	CONCLUSIONES. ....	71
X.	REFERENCIAS.....	71

## LISTA DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1</b>	Comparación entre la proteína verde fluorescente mWasabi con la proteína verde fluorescente EGFP (Allele Biotech®).	<b>22</b>
<b>Tabla 2</b>	Diseño del ensayo de ELISA de los VHH humanizados. A: controles negativos, B: Controles positivos, C: Diluciones del anticuerpo 2-C10H, D: Control positivo, E: Diluciones del anticuerpo 1-D8H, F: Control positivo, G: Diluciones de anticuerpo 1-C7H y H: controles negativos.	<b>33</b>
<b>Tabla 3</b>	Diseño del ensayo de ELISA del VHH fluorescente 2-C10mWasabi. A1 a A5: controles positivo, B1 a B5: prueba de reconocimiento del VHH 2-C10mWasabi, C1 a C7: control negativo, D1 a D7: Control negativo, A6, A7, B6, y B7: Control negativo.	<b>43</b>
<b>Tabla 4</b>	Cantidad de anticuerpos humanizados expresados en 250 mL de medio SB.	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

## Página

<b>Figura 1</b>	Comparación de un anticuerpo convencional con un anticuerpo de camélido HCAb el cual sólo presenta cadenas pesadas y un único dominio variable denominado VHH (Hamers-Casterman et al. 1993).	<b>13</b>
<b>Figura 2</b>	Imagen hecha en el Laboratorio Dra. Meredith Gould la cual muestra una prueba de ELISA en la que se utilizaron distintos VHH. En la región izquierda se observan los antígenos utilizados y en la parte superior los diferentes VHH utilizados.	<b>19</b>
<b>Figura 3</b>	Ensayo de micro neutralización del virus H1N1 A/Texas/48/2009 pdm utilizando el procedimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Realizado en Advanced Medical Research Institute of Canada.	<b>20</b>
<b>Figura 4</b>	Ensayo de micro neutralización del virus H1N1 A/California/07/2009 pdm utilizando el procedimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Realizado en Advanced Medical Research Institute of Canada.	<b>20</b>
<b>Figura 5</b>	Mapa del plásmido pUC57 (GeneScript®) en el cual se clonaron los tres genes sintetizados 2-C10H, 1-D8H y 1-C7.	<b>26</b>
<b>Figura 6</b>	Mapa del plásmido pComb3x (Clontech®) donde se observa el promotor LacZ, los dos sitios de corte Sfi1 (NE Biolabs) y la etiqueta His6.	<b>28</b>
<b>Figura 7</b>	Proceso de purificación por Cromatografía de afinidad metálica de las clonas 2-C10H, 1-D8H y 1-C7.	<b>30</b>
<b>Figura 8</b>	Elución de la Cromatografía de afinidad metálica las clonas 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H.	<b>30</b>
<b>Figura 9</b>	Esquema de la clona 1-D8H sintetizada con el linker (GGG) <sub>5</sub> y los sitios de corte Nhe1 y BamH1 para ser clonado en el vector de expresión pNCS-mWasabi.	<b>35</b>
<b>Figura 10</b>	Mapa del plásmido pNCS-mWasabi (Allelebiotech®) donde se observa el promotor CMV (flecha blanca) y el gen AcGFP (flecha verde).	<b>36</b>
<b>Figura 11</b>	Esquema del proceso del acoplamiento del VHH 2-C10 a la proteína verde fluorescente mWasabi.	<b>38</b>
<b>Figura 12</b>	Pellet de las células XL1 Blue, las cuales expresaron el VHH 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi.	<b>40</b>
<b>Figura 13</b>	Cromatografía de afinidad metálica del anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi.	<b>40</b>
<b>Figura 14</b>	Eluciones de la Cromatografía de afinidad metálica del anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi. Las eluciones se hicieron del tubo 1 al tubo 7.	<b>41</b>
<b>Figura 15</b>	Alineación de los FRs de las tres clonas de VHH (2-C10, 1-D8, y 1-C7), tres clonas de VHHs humanizados (2-C10H, 1-D8H, y 1-C7H) y un VH de humano subtipo 3 (Characteristics of human antibody).	<b>46</b>
<b>Figura 16</b>	Diseño de la Estructura tridimensional del VHH 2-C10LI utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0. En color verde se observa las cuatro regiones FR y en color amarillo se observan los tres CDRs	<b>47</b>
<b>Figura 17</b>	Diseño de la estructura tridimensional del VHH 2-C10H utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0. Verde: cuatro regiones FR, amarillo: tres CDRs y en color rojo se observan las nueve sustituciones hechas.	<b>48</b>
<b>Figura 18</b>	Comparación de los anticuerpo 2-C10 Y 2-C10H utilizando el programa PyMOL. Las distintas cargas son identificadas en colores (Azul: parches	<b>49</b>

	positivo, rojo: parches negativos y blanco: parches neutros) y las flechas amarillas indican las diferencias entre los anticuerpos.	
<b>Figura 19</b>	Gel de agarosa al 1% se observa, el producto de la digestión de los constructos liberando un fragmento de 400pb, en el carril 1 y 2 el constructo pComb3x+2-C10H, en el carril 3 y 4 el constructo pComb3x+1-D8H, en el carril 5 y 6 el constructo pComb3x+1-C7H, en el carril 7 el estándar GeneRuler™100bpPlus #SM0321, en el carril 8 pComb3xss sin digerir.	<b>50</b>
<b>Figura 20</b>	Geles de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. a) En el carril 1 de las tres imágenes, el estándar PageRuler™ # 26616, en el carril 2, 3 y 4 el anticuerpo 2-C10H con un peso molecular de 17 kDa. b) En el carril 2, 3 y 4 el anticuerpo 1-D8H con un peso molecular de 17kDa. a) En el carril 2, 3, 4 y 5 el anticuerpo 1-C7H con un peso molecular de 17kDa.	<b>51</b>
<b>Figura 21</b>	Prueba de ELISA que compara los 3 anticuerpos humanizados (2-C10H, 1-D8H y 1-C7H) con los 3 anticuerpos de llama no humanizados (2-C10, 1-D8 Y 1-C7). A: controles negativos sin antígeno, B: diluciones del anticuerpo 2-C10LI, C: diluciones del anticuerpo 2-C10H, D: diluciones del anticuerpo 1-D8H, E: diluciones del anticuerpo 1-D8H, F: diluciones del anticuerpo 1-C7H, G: diluciones de anticuerpo 1-C7H y H: controles negativos sin Ac1.	<b>52</b>
<b>Figura 22</b>	Comparación de los VHH 2-C10 y 2-C10H. En el eje Y se encuentra los niveles de absorbancia y en el eje X las diferentes concentraciones de Ac1 empleadas.	<b>53</b>
<b>Figura 23</b>	Comparación de los VHH 1-D8 y 1-D8H. En el eje Y se encuentra los niveles de absorbancia y en el eje X las diferentes concentraciones de Ac1 empleadas.	<b>53</b>
<b>Figura 24</b>	Comparación de los VHH 1-C7 y 1-C7H. En el eje Y se encuentra los niveles de absorbancia y en el eje X las diferentes concentraciones de Ac1 empleadas.	<b>54</b>
<b>Figura 25</b>	Western-blot utilizando los anticuerpos 2-C10LI y 2-C10H. a) reconocimiento del anticuerpo 2-C10LI a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa. b) reconocimiento del anticuerpo 2-C10H a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa.	<b>56</b>
<b>Figura 26</b>	Comparación del anticuerpo 2-C10LI con el anticuerpo 2-C10H utilizando el área de la gráfica del programa ImageJ.	<b>57</b>
<b>Figura 27</b>	En la parte superior se observa un esquema de la construcción del VHH fluorescente 2-C10mWasabi, el cual presenta un linker (GGG)x5 y los sitios de corte Nhe1, BamH1, Sfi1, EcoR1. En la parte inferior se observa un gel de agarosa al 1%. Carril 1: pNSC-VHH-mWasabi digeridos con Sfi1 (NE Biolabs) y EcoR1, carril 2: pComb3x-2-C10 digerido con Sfi1, carril 3: estándar GeneRuler™100bpPlus #SM0321, carril 4: pNSC-VHH-mWasabi sin digerir, carril 5: pComb3x-2-C10.	<b>59</b>
<b>Figura 28</b>	Estructura tridimensional del VHH 2-C10 utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0. Verde: regiones FR, amarillo: CDRs, azul: extremo N-terminal donde se encuentra la etiqueta His6 y morado: extremo C-terminal.	<b>61</b>

<b>Figura 29</b>	Fotografía de clonas positivas en una caja de Petri con Agar LB + carbencilina.	<b>62</b>
<b>Figura 30</b>	a) Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, en el carril 1 el estándar preteñido prestained Protein Marker #P7706, en el carril 2 el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi y en carril 3 la proteína verde fluorescente mWasabi. b) Gel de poliacrilamida al 10% excitado con luz UV, en el carril 1 el estándar preteñido Prestained Protein Marker #P7706, en el carril 2 el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi y en carril 3 la proteína verde fluorescente mWasabi.	<b>63</b>
<b>Figura 31</b>	Prueba de ELISA utilizando el anticuerpo 2-C10mWasabi. AC1 a A5: controles positivo, B1 a B5: prueba de reconocimiento del VHH 2-C10mWasabi, C1 a C7: control negativo, D1 a D7: control negativo, A6, A7, B6, y B7: control negativo.	<b>64</b>
<b>Figura 32</b>	Comparación del VHH 2-C10 y el VHH fluorescente 2-C10mWasabi. Los valores de Abs de los posos de ELISA se promediaron para cada columna.	<b>65</b>
<b>Figura 33</b>	Western-blot utilizando los anticuerpos 2-C10LI y 2-C10mWasabi. a) Reconocimiento del anticuerpo 2-C10LI a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa. b) Reconocimiento del anticuerpo 2-C10mWasabi a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa.	<b>66</b>
<b>Figura 34</b>	Comparación del anticuerpo 2-C10LI con el anticuerpo 2-C10mWasabi.	<b>67</b>

## I. RESUMEN

El desarrollo de anticuerpos recombinantes es una muy importante herramienta en la medicina, tanto para el diagnóstico de enfermedades como para su tratamiento. Comúnmente los anticuerpos están constituidos por dos cadenas pesadas y dos ligeras. Estas cadenas son quienes reconocen al antígeno que es generalmente plano o cóncavo. Sin embargo, existe otro tipo de anticuerpos presentes en la familia *Camelidae* y *lamnidae*, estos anticuerpos sólo presentan una cadena. Lo anterior favorece un mejor reconocimiento antígeno-anticuerpo dentro de las cavidades del antígeno. En este trabajo se obtuvieron tres anticuerpos humanizados (2-C10H, 1-D8H Y 1-C7H) a partir de tres anticuerpos de llama (2-C10LI, 1-D8LI Y 1-C7LI) que neutralizaron el virus AH1N1/2009 pandémico subtipo A/Texas/48/2009pdm y A/California/07/2009pdm. En el caso del anticuerpo humanizado 2-C10H no disminuyó su capacidad de reconocimiento cuantificado por ELISA y Western blot. El acoplamiento de la proteína verde fluorescente mWasabi al VHH 2-C10LI mantuvo su especificidad a HA pero hubo una disminución del reconocimiento al antígeno, cuantificado por ELISA y Western blot, lo que nos indica que es necesario diseñar una nueva estrategia de unión.

## II. INTRODUCCIÓN

El virus AH1N1/2009 pandémico nombre dado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), causó la pandemia de gripe A (H1N1) de 2009-2010 o también conocida como gripe porcina (OMS, 2016). La letra A corresponde al género del virus (Influenzavirus A) y las letras H y N (Hemaglutinina y Neuraminidasa) corresponden a las proteínas externas del virus.

El virus AH1N1/2009 pandémico es una variante de la cepa H1N1 con genes de una cepa aviar, dos cepas porcinas y una cepa humana (OMS, 2016). El contagio se dio entre especies, de cerdo a humano y después entre humano y humano. El 11 de julio de 2009 la OMS le dio la clasificación 6 de alerta (la clasificación más alta) lo que quiere decir la aparición del virus en distintos países de regiones diferentes. El 10 de agosto del 2010 anunció el fin de la pandemia, cuya duración fue de 14 meses y ocasionando más de 18,449 víctimas (OMS, 2016), en México en el año 2016 la Secretaria de salubridad reportó 4121 casos de los cuales murieron 149 personas.

Los cambios por mutación o recombinación en el virus de la influenza A han causado cepas virulentas a lo largo de la historia. La gripe española, considerada la pandemia más agresiva de la historia, mató en un año entre 50 a 100 millones de personas (Godínez, 2011). La influenza AH1N1/1918 o gripe española comparte gran similitud con la influenza AH1N1/2009, al grado que la vacuna contra el virus AH1N1/2009 proporciona protección contra la el virus AH1N1/1918, lo que nos indica que comparten gran similitud de epítomos (Medina et al., 2010). Por esta

razón es necesario el desarrollo no sólo de vacunas contra cepas pandémicas AH1N1 sino también tratamientos y métodos rápido de detección.

Los nano anticuerpos son derivados de la familia camelidae, poseen una pequeña estructura en relación con los anticuerpos humanos, lo que les confiere la facilidad de reconocer epítomos más pequeños y escondidos que los anticuerpos convencionales (Wesolowski et al., 2009). Los anticuerpos de camélidos presentan sólo un tipo de cadena en su estructura llamado HCAb. Para formar un nano anticuerpo solo se amplifica la región variable de la cadena pesada (VHH) (Wesolowski et al., 2009).

Debido a las propiedades de los VHH como termoestabilidad, fácilmente soluble, fácil expresión en organismos unicelulares, fácil manipulación genética y su reconocimiento de epítomos en cavidades de antígenos; son candidatos para la detección de infecciones y futuro candidatos como anticuerpos terapéuticos en infecciones (Wesolowski et al., 2009). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue generar anticuerpos VHH contra virus AH1N1/2009 pandémico para su posible utilización terapéutica y de diagnóstico.

### III. ANTECEDENTES.

Una de las principales defensas de los vertebrados hacia los patógenos es la respuesta inmune humoral adaptativa, que esta mediada por dos tipos de linfocitos, entre los que destacan los linfocitos B (LB), como productores de anticuerpos. Esta respuesta se basa en la capacidad del reconocimiento múltiple específico de antígenos contra casi cualquier patógeno. Este reconocimiento específico es gracias a los anticuerpos que son desarrollados en gran diversidad, la cual es generada por el corte y pegue de segmentos de los genes (hipermutación somática) de inmunoglobulinas (Ig) durante el desarrollo de LB, produciendo dos cadenas variables de cadena pesadas (VH) y dos regiones V de cadena ligera (VL) (Abul K. Abbas, 2003). Los genes de las cadenas H y L se han distribuido en varios taxones de animales, a excepción de algunos entre los que destacan *Elasmobranquios* y *camélidos* que sólo presentan la cadena H en el anticuerpo completo (Flajnik et al., 2011).

Raymond y colaboradores de la Universidad Libre de Bruselas en 1989, investigaban la inmunodefensa de los dromedarios contra los parásitos. De esa forma se descubrió la presencia de anticuerpos con solamente un par de cadenas pesadas (HCAb)(Hamers-Casterman et al., 1993). La región de unión al antígeno de los HCAb de camélido se compone de un único dominio variable denominado VHH (figura 1.) (Hamers-Casterman et al., 1993).

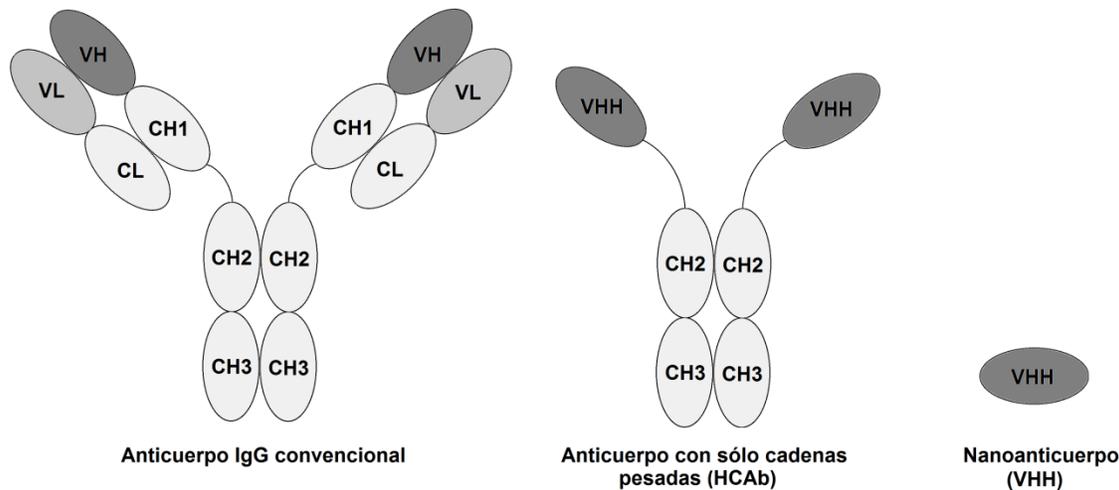


Figura 1. Comparación de un anticuerpo convencional con un anticuerpo de camélido HCAb el cual sólo presenta cadenas pesadas y un único dominio variable denominado VHH (Hamers-Casterman et al. 1993).

El por qué evolucionaron este tipo de anticuerpos de cadena sencilla en la naturaleza aún no es completamente comprendido, se cree que fue por presión evolutiva, dado por algún patógeno y/o estrés fisiológico (alta salinidad, altas temperaturas, alta concentración de urea, etc.) en el organismo (Flajnik et al., 2011). Esta presión evolutiva ocasionó 3 eventos. 1) que el primer dominio constante (CH1) de la cadena H cuya función es anclar la cadena L, desapareciera. 2) el desarrollo de una gran variabilidad en los CDRs capaces de reconocer antígenos sin necesidad de la región VL. 3) la solubilidad del fragmento VHH en ausencia del dominio VL (Flajnik et al., 2011).

Los análisis de secuencias de los VHH (Hamers-Casterman et al., 1993) y trabajos de cristalización (Harmsen, 2007) demuestran gran similitud con los VH convencionales, los VHH contienen cuatro regiones de marco (FR) que son las que flanquean las tres regiones hipervariables (CDRs), las cuales son la base para la

unión al antígeno. Estos FRs de VHH presentan una alta homología de secuencias mayores al 80% con los FRs de VH de humano y la estructura 3D de los VH de humano son superpuestas a los fragmentos VHH (Harmsen, 2007). Aunque la similitud de un VHH y un VH sea alta, no significa que un VH separado de la cadena VL tenga las mismas propiedades de un VHH. En trabajos en los que se ha aislado la región VH de anticuerpos convencionales, se ha demostrado que pueden tener retención específica al antígeno pero su afinidad y solubilidad es reducida (Ward ES1, 1989). Lo anterior nos indica la necesidad que tienen los anticuerpos convencionales de presentar un fragmento VL para reconocer plenamente a los antígenos. Estos dos fragmentos de anticuerpos pueden ser producidos en microorganismos unidos por polipéptidos aunque su producción tiende a ser dificultosa debido a la asociación de dominios (Ward et al. 1989).

Los rasgos que diferencian los VHH de los VH son principalmente en cuatro posiciones del FR2 (42, 49, 50 y 52) en los que en VH de humano son aminoácidos hidrofóbicos y en VHH hidrofílicos (Hamers-Casterman et al., 1993) y un mayor tamaño en el CDR3 (VH10, VHH18) y variabilidad (Harmsen, 2007).

Existen varias ventajas en el dominio único de los VHH, uno de ellos es conservar la diversidad funcional completa al formar una biblioteca, ya que sólo presenta una cadena. En el caso de la formación de una biblioteca con fragmentos scfv (VL y VH unidos por un linker), la generación de éste tipo de librería presentaría una baja diversidad de anticuerpos con función completa, debido a la reorganización incorrecta de los fragmentos VH y VL durante la formación de la biblioteca (Harmsen, 2007). Otra ventaja de los VHH es su resistencia a altas temperaturas,

ya que contrariamente a los anticuerpos convencionales se ha demostrado que los fragmentos VHH son funcionales después de ser incubados a 90°C (Harmsen and De Haard, 2007). La gran estabilidad que presentan los fragmentos VHH se atribuye a la facilidad de replegamiento en presencia de desnaturalización química o térmica (Harmsen y De Haard, 2007).

El aumento en la solubilidad de los VHH en contraste con los VH, se debe al aumento de las regiones hidrofílicas de los VHH. Esto se demostró quitando estas regiones hidrofílicas de los VHH y agregando hidrofóbicas como los que presentan los VH convencionales, en contraste con ello, se agregaron regiones hidrofílicas en los VH convencionales, esto dio lugar a VH convencionales estables y VHH inestables (Harmsen y De Haard, 2007).

Una de las principales ventajas que tiene los VHH es que pueden reconocer antígenos que normalmente no son reconocidos por los anticuerpos convencionales, por ejemplo sitios de enzimas activas (Lauwereys et al., 1998). Esta facilidad de reconocer sitios no accesibles para anticuerpos convencionales, se atribuye a su menor tamaño capaz de penetrar tales sitios con los CDRs, principalmente con el CDR3 (Desmyter A1, 1996).

Existen desventajas en la utilización de los fragmentos VHH, uno de los principales es la unión a antígenos pequeños como haptenos y péptidos, que regularmente se acoplan en la ranura de los fragmentos VH-VL de los anticuerpos convencionales (Hamers-Casterman et al., 1993). Esto no indica que no sea posible

la unión de los VHH a antígenos pequeños, se han reportado VHH específicos contra haptenos y péptidos después de una selección fuerte (Harmsen, 2007).

La utilización de VHH con aplicación terapéutica ya se ha desarrollado con éxito en distintas áreas como en oncología, enfermedades infecciosas, inflamatorias y neurodegenerativas (Gema Ruiz et al., 2007). En el caso de enfermedades infecciosas ya se han desarrollado VHH que neutralizan subtipos de VIH y VHH utilizados en terapias contra infección de rotavirus (Harmsen y De Haard, 2007).

Una de las principales enfermedades infecciosas en humanos es la gripe o influenza, que es la infección por un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, de la cual se agrupan 3 tipos de virus (Influenza A, B y C) siendo el tipo A el más virulento y del cual algunos subtipos han generado pandemias. El virus de influenza empezó siendo un virus exclusivo de aves acuáticas, pero dio un salto evolutivo dando a la aparición a subtipos capaces de infectar cerdo y humano (R G Webster, 1992). El virus AH1N1/2009 pandémico fue una cepa no identificada hasta su aparición en abril del 2009 en América del norte, los análisis genéticos demostraron que el virus de influenza es de origen porcino, aviar y humano, y no está relacionado con el virus AH1N1 estacional humano, que se sabe ha estado presente desde 1977 (OMS, 2016). Después del primer brote el virus AH1N1/2009 pandémico se extendió por 74 países y fue declarado por la OMS como pandemia en junio del 2009. Hoy en día la mayoría de los países han declarado brotes de este virus pandémico (OMS, 2016).

Los análisis para determinar la respuesta inmune contra HA demostraron que los anticuerpos contra AH1N1 estacional no protegen contra el virus AH1N1/2009 pandémico (OMS, 2016). Por otra parte un estudio demostró que algunas personas mayores de 65 años tienen respuesta contra el virus AH1N1/2009 pandémico. Esto da a entender que personas de edad avanzada tuvieron contacto con cepas de virus pandémicos semejantes a la cepa AH1N1/2009 pandémico en el pasado, lo que sugiere una respuesta cruzada (OMS, 2016).

Han existido otras pandemias de influenza a lo largo de la historia, pero la causante de más muertes fue la gripe española. A principios del siglo pasado en 1918 se originó dicha pandemia, que tuvo una mortalidad de entre 20 y 200 millones de personas según diferentes autores (Godínez, 2011). Es por eso necesario estar prevenidos contra este tipo de pandemias ya que hay estudios en los que se analizó suero de pacientes infectados con el virus AH1N1 2009 pandémico y se demostró que los anticuerpos policlonales del suero reconocen y protegen del virus de influenza española 1918 (Medina et al., 2010). Esto indica que existe una convergencia entre los dos virus pandémicos (Medina et al., 2010).

Las dos principales moléculas de virus de influenza son la Hemaglutinina y Neuraminidasa, estas permiten que el virus pueda entrar y salir de la célula que infectan. La Hemaglutinina permite la infección uniéndose al ácido siálico presente en glucoproteínas de la membrana celular. La unión fomenta la fusión de las membranas celulares, ya que el virus de la influenza presenta una membrana que lo envuelve, propiedad de la anterior célula infectada. La Neuraminidasa rompe el enlace entre Hemaglutinina y Ácido Siálico (R G Webster, 1992). Este proceso es

necesario cuando el nuevo virión sale de la célula infectada y se dirige a infectar una nueva célula (R G Webster, 1992). Debido a la importancia de las proteínas HA y NA para que el virus de influenza pueda infectar, son uno de los principales blancos para anticuerpos neutralizantes.

En un trabajo realizado en el laboratorio Dra. Meredith Gould en la Universidad Autónoma de Baja California, donde utilizando la técnica de despliegue de fagos (Barbas, 2001) se encontraron distintas clonas capaces de reconocer el virus de influenza A (H1N1)/2009 pandémico (figura 2.).

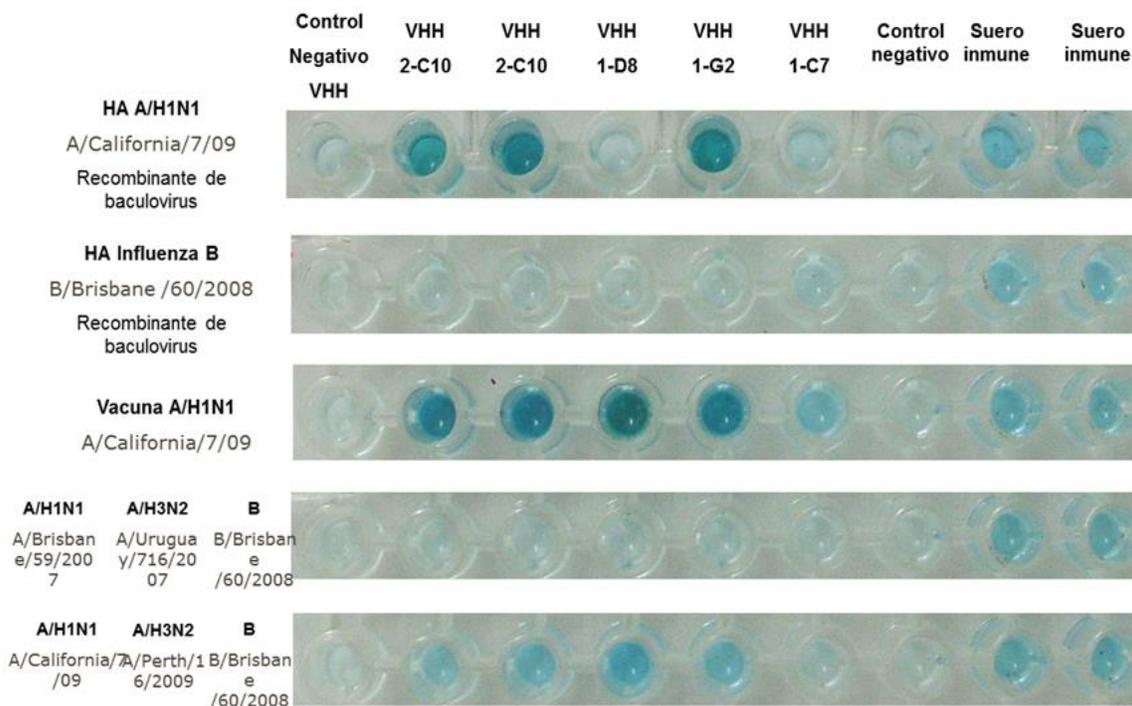


Figura 2. Identificación de clonas capaces de reconocer al virus A(H1N1)/2009 mediante ELISA. Imagen hecha en el Laboratorio Dra Meredith Gould la cual muestra una prueba de ELISA en la que se utilizaron distintos VHH. En la región izquierda se observan los antígenos utilizados y en la parte superior los diferentes VHH utilizados.

El Instituto avanzado de investigación médica de Canadá (Advanced Medical Research Institute of Canada) realizó un ensayo de micro neutralización donde se

utilizaron los VHH 2-C10, 1-D8 y 1-C7 seleccionados en el laboratorio Dra. Meredith Gould, el ensayo consistió en determinar el porcentaje de neutralización que presentan los VHH seleccionados contra dos variantes del virus de influenza A (H1N1)/2009 pandémico. El resultado de la prueba arrojó que en el caso de la cepa A/Texas/48/2009 pdm el VHH 2-C10 presentó un 45% de neutralización, el VHH 1-D8 presentó un 55% de neutralización y el VHH 1-C7 presentó un 50% de neutralización (figura 3). La cepa A/California/07/2009 pdm el VHH 2-C10 presentó hasta un 15% de neutralización, el VHH 1-D8 presentó un 50% de neutralización y el VHH 1-C7 presentó un 25% de neutralización (figura 4.). El ensayo demostró que los VHH 2-C10, 1-D8 y 1-C7 son posibles candidatos para ser utilizados combinados como anticuerpos terapéuticos.

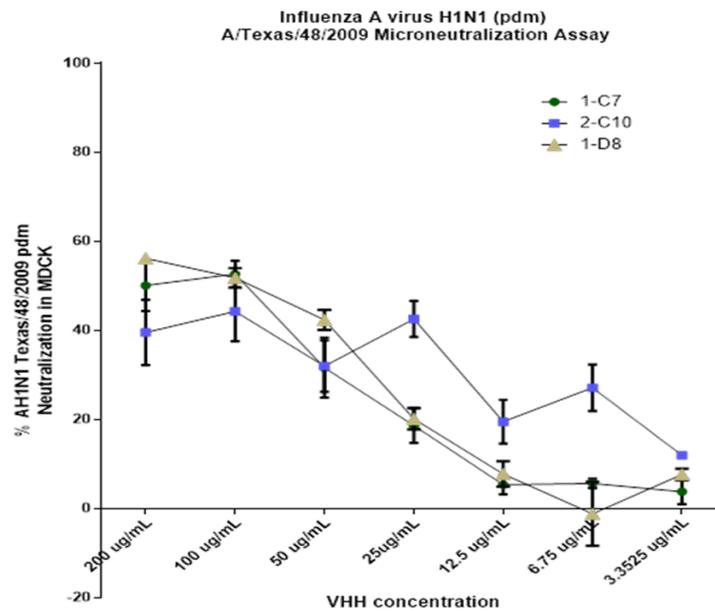


Figura 3. Micro neutralización del virus H1N1 A/Texas/48/2009 pdm utilizando el procedimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Realizado en Advanced Medical Research Institute of Canadá.

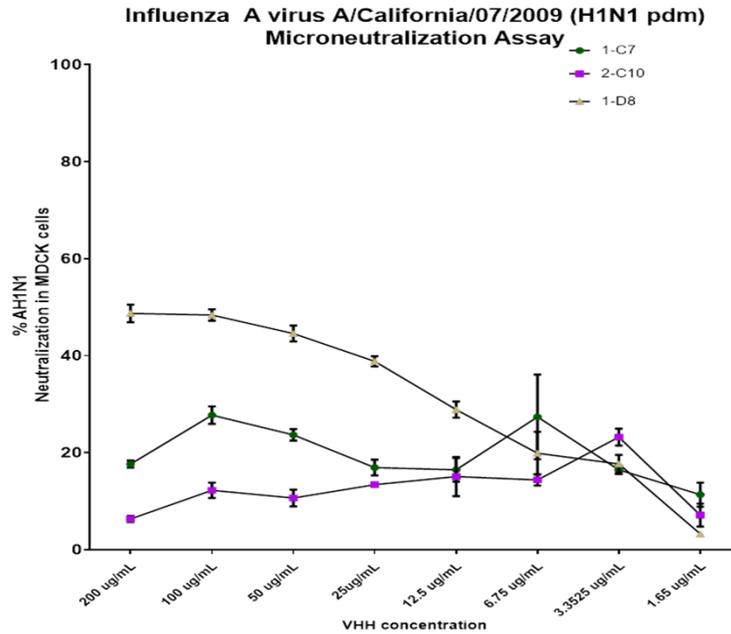


Figura 4. Micro neutralización del virus H1N1 A/California/07/2009 pdm utilizando el procedimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Realizado en Advanced Medical Research Institute of Canada

Uno de los procesos para desarrollar anticuerpos terapéuticos es la humanización, que consiste en una modificación para disminuir la respuesta inmune hacia el anticuerpo terapéutico al ser subministrado (Gema Ruiz et al., 2007). El proceso de humanización consiste en modificar las secuencias conservadas Framework 1 a 4 del anticuerpo VHH para ser igual o semejante a las secuencias de las regiones framework de anticuerpos humanos, esto sin modificar las propiedades del anticuerpo de neutralización y solubilidad (Gema Ruiz et al., 2007). En el caso de los anticuerpos de llama ya se han generado estrategias para diseñar VHH humanizados, mediante la identificación de los cambios que se pueden hacer sin modificar las propiedades del V (Cécile Vincke, 2008). Los cambios recomendados para la humanización de anticuerpos de un solo dominio de llama, son Ser-12→Leu,

Ala-15→Pro, Thr-24→Ala para FR1, Glu-49→Gly, Arg-50→Leu para FR2, Ala-83→Ser, Val-87→Leu, Thr-88→Tyr, Asn-93→Ser, Lys-95→Arg, Pro-96→Ala, Ile-101→Val para FR3 y Gln-123 → Leu para FR4 (Cécile Vincke, 2008).

Los anticuerpos fluorescentes tienen una gran aplicación como herramienta de diagnóstico, debido a la fuerte afinidad que presentan a pesar de estar acoplados a una molécula fluorescente (Tengfei Li, 2012). Uno de los fluoróforos utilizados para marcar anticuerpos con fluorescencia son las proteínas fluorescentes que pueden ser unidas al anticuerpo deseado separadas por un LK (Tengfei Li, 2012). En el caso de anticuerpos VHH se han realizado trabajos donde fueron unidos a proteínas fluorescentes y continúan siendo funcionales (Tengfei Li, 2012). Existen diversas proteínas fluorescentes que pueden ser acopladas a un gen, entre las que destaca la proteína verde fluorescente mWasabi que presenta propiedades superiores a otras proteínas monoméricas fluorescentes (tabla 1.) (Allele Biotech®).

Tabla 1. Comparación entre la proteína verde fluorescente mWasabi con la proteína verde fluorescente EGFP (Allele Biotech®).

Proteína	mWasabi	EGFP
Excitación máxima (nm)	493	488
Emisión máxima (nm)	509	507
Rendimiento cuántico	0.8	0.6
Coefficiente de extinción	70,000	56,000
Brillo	56.0	33.6

#### **IV. OBJETIVOS.**

##### **Objetivo general**

Construir tres anticuerpos humanizados que sean potencialmente usados como anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico.

##### **Objetivos particulares**

- 1.- Diseñar in silico de tres VHH humanizados.
- 2.- Clonar en el vector de expresión pComb3x y expresión en E.coli de los 3 VHHs humanizados.
- 3.- Evaluar la capacidad del reconocimiento al virus de influenza A/H1N1/2009 pandémico comparándolos con los VHH no humanizados de llama (*Lama glama*).
- 4.- Diseñar el gen de VHH 2-C10 a gen mWasabi y clonación en el vector de expresión pNCS
- 5.- Expresar y purificar el anticuerpo fluorescente 2-C10mWasabi
- 6.- Evaluar la capacidad de reconocimiento del anticuerpo fluorescente 2-C10mWasabi al virus de influenza A/H1N1/2009 pandémico comparándolo con el VHH 2-C10.

## **V. HIPÓTESIS**

Los cambios de aminoácidos en los FRs de las clonas 2-C10, 1-D8 y 1-C7 y la unión de la proteína fluorescente mWasabi, no mostrará cambio en el reconocimiento del virus de influenza A/H1N1/2009 pandémico.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### Diseño y síntesis de los VHH 2-C10, 1-D8 y 1-C7

Se escogieron las clonas 2-C10, 1-D8 y 1-C7 para humanizar debido al reconocimiento y capacidad de neutralizar al Virus H1N1/09 pandémico.

Basado en el artículo "Generación de estrategia de humanización de anticuerpos de dominio único e identificación de un templete humanizado universal" (General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold) se hizo el diseño en 3D de la secuencia de la clona 2-C10 utilizando un archivo de un anticuerpo humanizado de nombre 3EAK encontrado en RCSB Protein Data Bank, este diseño se hizo en el programa Swiss-PdbViewer4.1.0, el programa determina *in silico* la solubilidad de la estructura tridimensional de las proteínas.

Teniendo el resultado de la solubilidad de los tres diseños de VHHs humanizados, se mandaron a sintetizar a la compañía Genscript (Nueva Jersey, Estados Unidos). Los genes fueron enviados deshidratados y clonados en el vector pUC57 (figura 5). El plásmido se hidrató para quedar a una concentración de 100 ng por microlitro, posteriormente el plásmido fue transformado en *E.coli* electro competente y cultivadas en agar LB + carbenicilina (50 µg/mL) por 12 h a 37°C. Al siguiente día se escogieron las clonas positivas y se sembraron en caldo LB+ carbenicilina (50 µg/mL) por 12 h a 37°C. El plásmido fue purificado con el kit comercial miniprep (OMEGA bio-tek®). Las clonas positivas fueron verificadas por

digestión enzimática con la endonucleasa Sfi1 (NE Biolabs) cuyo sitio de corte se encuentra en los extremos de los tres genes mandados a sintetizar.

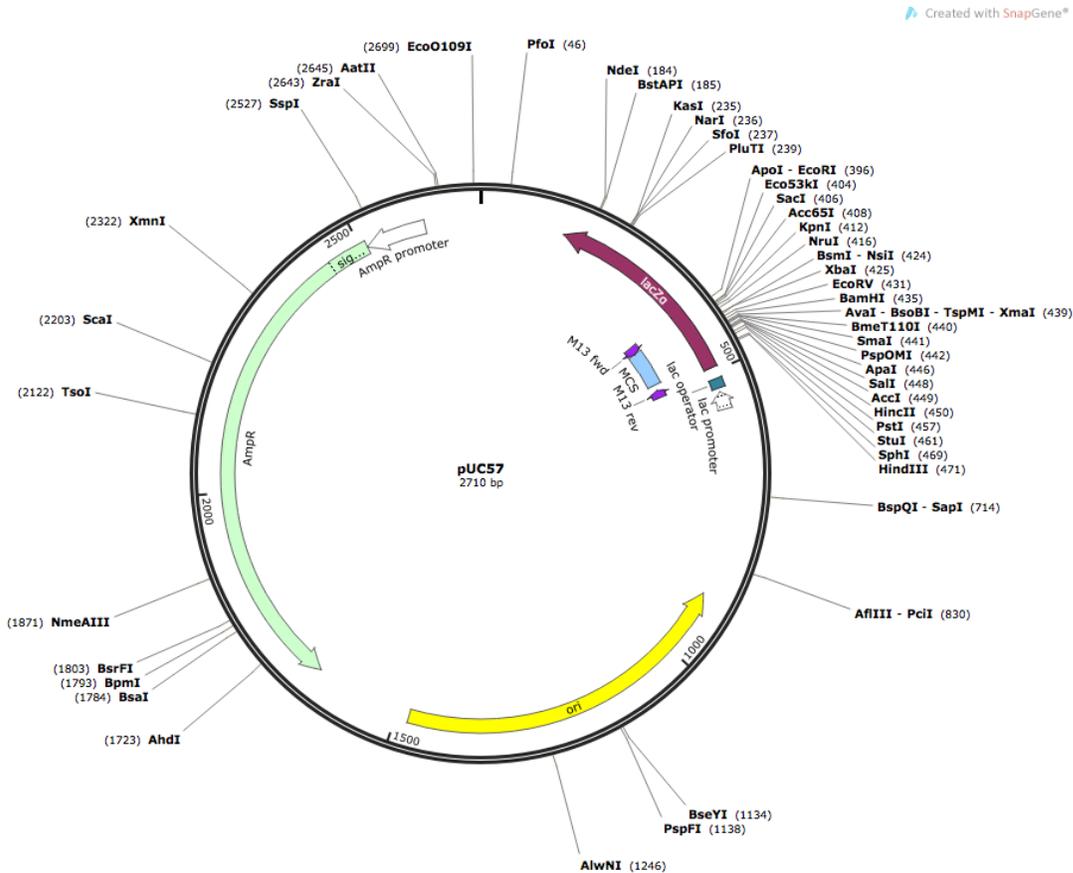


Figura 5. Mapa del plásmido pUC57 (GeneScript®) en el cual se clonaron los tres genes sintetizados 2-C10H, 1-D8H y 1-C7.

### Clonación de 2-C10H\_pComb3x, 1-D8H\_pComb3x y 1-C7H\_pComb3x

Una vez corroborada la presencia de los genes de VHH humanizados se procedió a realizar una segunda digestión del vector pUC57, cortando 6 µg de este y así liberar las secuencias de VHHs humanizados de 400pb. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 10%, después las bandas de 400 pb fueron purificadas con el kit comercial QIAquick PCR purificación kit (QIAGEN®). Después

se procedió a realizar la ligación en el vector pComb3x (figura 6). Para ello se preparó la siguiente reacción: 0.1 µg del vector pComb3x, 1 µL de T7 ligasa (Promega®), 5µL de buffer 2x T7 (Promega®) y 0.1 µg del producto de la digestión previamente purificado. La reacción se incubó durante 12h a 4°C, al finalizar se procedió a transformar los tres constructos pComb3x + 2-C10H, pComb3x + 1-D8H y pComb3x + 1-C7H en células electro competentes de *E. coli*, las cuales posteriormente se sembraron en agar LB + carbenicilina (50 mg/mL) y se cultivaron por 12 horas a 37°C, para después realizar la selección de clonas y propagarlas en caldo LB + carbenicilina (50 mg/mL) bajo las mismas condiciones. Se purificó DNA plasmídico de las clonas positivas y se verificó la digestión, utilizando la enzima de restricción Sfi1. Para verificar la secuencia y el marco de lectura del constructo se envió a secuenciar el plásmido a la compañía Allele biotech, San Diego, California, E.U.

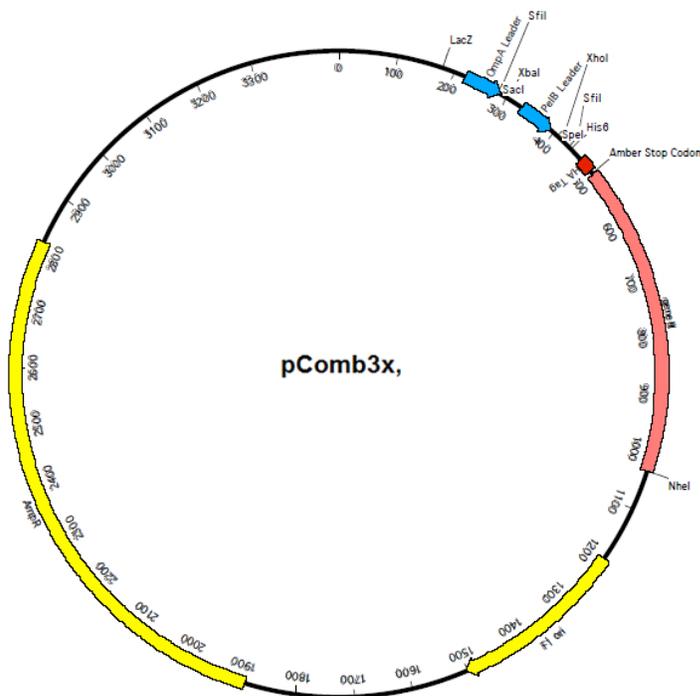


Figura 6. Mapa del plásmido pComb3x (Clontech®) donde se observa el promotor LacZ, los dos sitios de corte Sfi1 (NE Biolabs)(NE Biolabs) y la etiqueta His6.

## **Expresión y purificación de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H**

La expresión extracelular fue hecha en vector de expresión pComb3x con promotor LacZ y en células TopF10 de la siguiente manera: Se inoculó en 10 mL de medio SB líquido las clonas 2-C10H y se incubó a 37°C durante 12 horas, para ser usado como pre inóculo. Se agregaron 2 mL del pre inóculo a 250 mL de medio SB líquido y se incubó por 6 horas. Después de las 6 horas de incubación se agregó 0.5 mL de IPTG a 0.5 Molar y se incubó a 37°C durante 20 horas.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad metálica de la siguiente manera: se centrifugó a 4000 rpm los 250 mL de cultivo y se separó el medio SB del pellet, los 250 mL de medio SB se dividieron en 5 tubos de 50mL y se agregó 0.2 mL de esferas de sefarosa con Ni (Ni Sepharose® High Performance #GE17-5268-01) a cada tubo de 50 mL. Los tubos con esferas de sefarosa y medio se incubaron a 4°C durante 12 h, después los tubos fueron centrifugados a 1000rpm durante 1min y el medio SB descartado. Las esferas de sefarosa se transfirieron en tubos de separación (figura 7) donde se hicieron 3 lavados de 5 mL con buffer de lavado y 5 eluciones de 0.3 mL de buffer de elución (figura 8). La purificación fue confirmada por electroforesis en un gel desnaturalizante de acrilamida al 10%.

El proceso de expresión y purificación de las clonas 1-D8H y 1-C7H se realizó de la misma manera que la clona 2-C10.

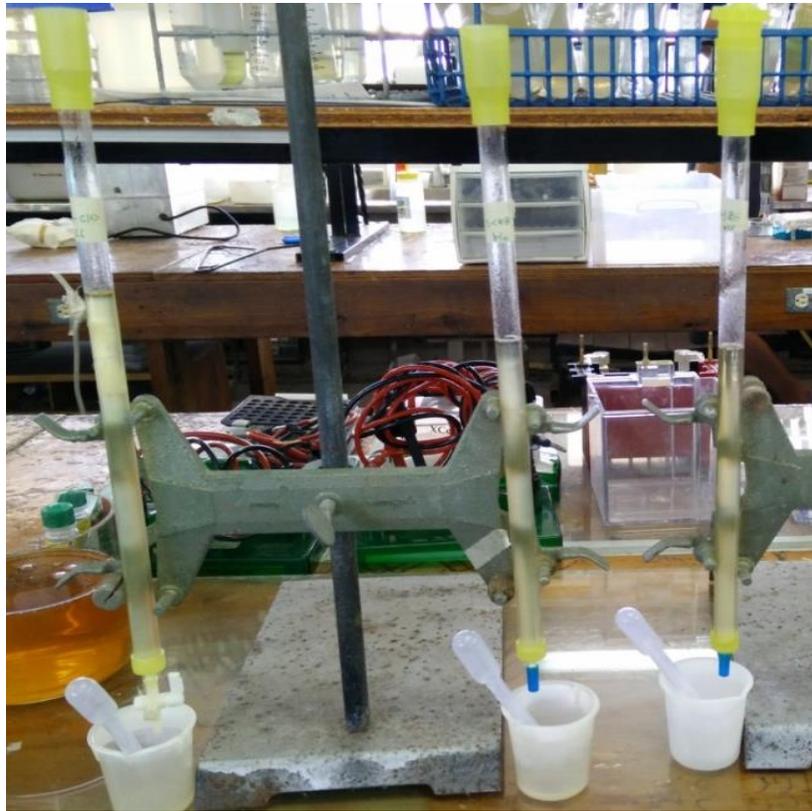


Figura 7. Proceso de purificación por Cromatografía de afinidad metálica de las clonas 2-C10H, 1-D8H y 1-C7.



Figura 8. Elución de la Cromatografía de afinidad metálica las clonas 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H.

## **Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H a la Vacuna de influenza trivalente por el método de ELISA**

La prueba de ELISA se utilizó para determinar cambios en el reconocimiento de los anticuerpos humanizados debido a las modificaciones en la secuencia. El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos (8 filas de 12 pozos) utilizando el diseño de la tabla 2 y el siguiente protocolo:

1. Se agregaron 25  $\mu$ L de vacuna trivalente (VAXIGRIP 2014-2015) en cada pozo de la placa y se incubó por 24 h a 4°C sin cubrir la placa.
  - En el caso de los controles A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, AC10, H11 y H12 se agregó 25  $\mu$ L de PBS en lugar de la vacuna trivalente (VAXIGRIP 2014-2015).
2. Trascurridas las 24 h se incubó la placa descubierta a 37°C hasta evaporar todo el líquido restante de los pozos.
3. Se agregó 50 $\mu$ L de buffer de bloqueo PBS-BSA (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 5% de Albumina de Bovino) a cada pozo de la placa y se incubó cubierta por 2 h a 37°C.
4. Se descartó el PBS-BSA y se agregaron 25  $\mu$ L de los anticuerpos primarios (AC1) a la concentración correspondiente en cada pozo siguiendo el diseño de la tabla 1, posteriormente se incubó la placa durante 2 h 37°C.
  - Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-T para llegar a la concentración establecida.
  - En el caso de los controles H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 Y H10 no se agregó anticuerpo primario, en su lugar se agregó 25  $\mu$ L de PBS-BSA.

5. Se descartó el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS-BSA-T (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 5% de Albumina de Bovino + 0.05% de tween 20)
6. Se agregó 25  $\mu$ L de anticuerpo secundario (AC2) anti 6 His (BETHYL No. AC190-114P) diluido 1:10,000 en PBS-BSA y se incubó 1h a 37°C.
7. Se descartó el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados con PBS-T T (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 0.05% de tween 20) y 2 lavados con PBS.
8. Se agregaron 25 $\mu$ L de sustrato TMB (AGDIA Cat. No. ACC 00412/0060) en cada pozo y se incubó 15min a temperatura ambiente.
9. Se tomó la placa ya revelada y se leyó en el escáner Multiskan GO (Thermo Scientific Cat. No. N10588).

Tabla 2. Diseño del ensayo de ELISA de los VHH humanizados. A: Controles negativos, B: Controles positivos, C: Diluciones del anticuerpo 2-C10H, D: Control positivo, E: Diluciones del anticuerpo 1-D8H, F: Control positivo, G: Diluciones de anticuerpo 1-C7H y H: Controles negativos.

A	B	C	D	E	F	G	H
	Vacuna 2-C10LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LH 750ng AC2	Vacuna 1-D8LI 750ng AC2	Vacuna 1-D8H 750ng AC2	Vacuna 1-C7LI 750ng AC2	Vacuna 1-C7H 750ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
	Vacuna 2-C10LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LH 750ng AC2	Vacuna 1-D8LI 750ng AC2	Vacuna 1-D8H 750ng AC2	Vacuna 1-C7LI 750ng AC2	Vacuna 1-C7H 750ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 2-C10LI 750ng A 2	Vacuna 2-C10LI 375ng AC2	Vacuna 2-C10H 375ng AC2	Vacuna 1-D8LI 375ng AC2	Vacuna 1-D8H 375ng AC2	Vacuna 1-C7LI 375ng AC2	Vacuna 1-C7H 375ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 2-C10LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 187.5ng AC2	Vacuna 2-C10H 187.5ng AC2	Vacuna 1-D8LI 187.5ng AC2	Vacuna 1-D8H 187.5ng AC2	Vacuna 1-C7LI 187.5ng AC2	Vacuna 1-C7H 187.5ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 2-C10H750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 93.75ng AC2	Vacuna 2-C10H 93.75ng AC2	Vacuna 1-D8LI 93.75ng AC2	Vacuna 1-D8H 93.75ng AC2	Vacuna 1-C7LI 93.75ng AC2	Vacuna 1-C7H 93.75ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 2-C10H 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 46.87ng AC2	Vacuna 2-C10H 46.87ng AC2	Vacuna 1-D8LI 46.87ng AC2	Vacuna 1-D8H 46.87ng AC2	Vacuna 1-C7LI 46.87ng AC2	Vacuna 1-C7H 46.87ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 1-D8LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 23.43ng AC2	Vacuna 2-C10H 23.43ng AC2	Vacuna 1-D8LI 23.43ng AC2	Vacuna 1-D8H 23.43ng AC2	Vacuna 1-C7LI 23.43ng AC2	Vacuna 1-C7H 23.43ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 1-D8LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 11.71ng AC2	Vacuna 2-C10H 11.71ng AC2	Vacuna 1-D8LI 11.71ng AC2	Vacuna 1-D8H 11.71ng AC2	Vacuna 1-C7LI 11.71ng AC2	Vacuna 1-C7H 11.71ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 1-D8H 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 5.85ng AC2	Vacuna 2-C10H 5.85ng AC2	Vacuna 1-D8LI 5.85ng AC2	Vacuna 1-D8H 5.85ng AC2	Vacuna 1-C7LI 5.85ng AC2	Vacuna 1-C7H 5.85ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 1D8-H 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 2.92ng AC2	Vacuna 2-C10H 2.92ng AC2	Vacuna 1-D8LI 2.92ng AC2	Vacuna 1-D8H 2.92ng AC2	Vacuna 1-C7LI 2.92ng AC2	Vacuna 1-C7H 2.92ng AC2	Vacuna PBS-BSA AC2
PBS 1-C7LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 1.46ng AC2	Vacuna 2-C10H 1.46ng AC2	Vacuna 1-D8LI 1.46ng AC2	Vacuna 1-D8H 1.46ng AC2	Vacuna 1-C7LI 1.46ng AC2	Vacuna 1-C7H 1.46ng AC2	PBS 1-C7H 750ng AC2
PBS 1-C7LI 750ng AC2	Vacuna 2-C10LI 0.73ng AC2	Vacuna 2-C10H 0.73ng AC2	Vacuna 1-D8LI 0.73ng AC2	Vacuna 1-D8H 0.73ng AC2	Vacuna 1-C7LI 0.73ng AC2	Vacuna 1-C7H 0.73ng AC2	PBS 1-C7H 750ng AC2

## **Prueba de reconocimiento del VHH 2-C10H a la Vacuna de influenza trivalente por Western blot**

La prueba de Western-blot se utilizó para determinar si el VHH 2-C10H reconoce la misma proteína que el anticuerpo 2-C10. El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

1. La vacuna trivalente se concentró 10 veces más, centrifugando a 4000rpm con la columna Centricon YM-30 (micon® Cat. No. 4202).
2. Se tomó 60  $\mu$ L de vacuna concentrada y se le agregó 20 $\mu$ L de buffer de carga 4x Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD Cat. #161-0747) sin  $\beta$ ME y se cargaron 25 $\mu$ L en cada pozo del gel de poliacrilamida SDS.
3. Se corrió el gel de poliacrilamida SDS por 1 h a 100 v, después se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.
4. La membrana de nitrocelulosa, con las proteínas ya transferidas, se incubó con PBS-L (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 5% de leche descremada) durante 12 h a 4°C.
5. Se descartó el buffer PBS-L y se agregó 10 mL de anticuerpo primario diluido en PBS-L y se incubó 12h a 4°C con agitación.
6. Se descartó el anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados con PBS-T para después agregar 10 mL del anticuerpo secundario anti 6 his y el anticuerpo secundario antillama disueltos 1:5000 en PBS y se incubó 1hr a temperatura ambiente con agitación.
7. Se descartó el anticuerpo secundario y se hicieron 3 lavados con PBS-T y 2 con PBS, después se reveló con TMB.

## Diseño y síntesis del gen 2-C10mWasabi

La clona 1-D8H fue sintetizada con secuencias adicionales después de los sitios de corte Sfi1 (NE Biolabs) (figura 9). Estos sitios adicionales son el sitio de corte Nhe1 en el extremo 5', una secuencia de unión flexible y el sitio de corte BamH1 en el extremo 3'.



Figura 9. Esquema de la clona 1-D8H sintetizada con el linker (GGG)<sub>x5</sub> y los sitios de corte Nhe1 y BamH1 para ser clonado en el vector de expresión pNCS-mWasabi.

Una vez corroborada por digestión la presencia de los sitios de corte Nhe1 y BamH1 se procedió a realizar una segunda digestión del vector pUC57, cortando 6 µg de este con las enzimas Nhe1 y BamH1, y así liberar el fragmento 1-D8H. El producto de la digestión se corrió en un Gel de agarosa al 10%, después las bandas de 400 pb fueron purificadas con el kit comercial QIAquick PCR purificación kit (QIAGEN®). La ligación se realizó en el vector pNCS-mWasabi (figura 10 y 11), para ello se preparó la siguiente reacción: 0.1 µg del vector pNCS-mWasabi cortado con Nhe1 y BamH1 previamente purificado, 1 µL de T7 ligasa (Promega®), 5 µL de buffer 2x T7 (Promega®) y 0.1 µg del fragmento 1-D8H cortado con Nhe1 y BamH1 previamente purificado. La reacción se incubó durante 12h a 4°C, al finalizar se procedió a transformar el constructo pNCS-1-D8H-mWasabi en células electrocompetentes de *E.coli*, las cuales posteriormente se sembraron en agar LB +

carbenicilina (50 mg/mL) y se cultivaron por 12 h a 37°C, para después realizar la selección de clonas y propagarlas en caldo LB + carbenicilina (50 mg/mL) bajo las mismas condiciones. Se purificó DNA plasmídico de las clonas positivas que presentaran fluorescencia y se verificó por digestión el fragmento de 400pb que corresponde a la clona 1-D8H, utilizando la enzima de restricción Sfi1 (NE Biolabs).

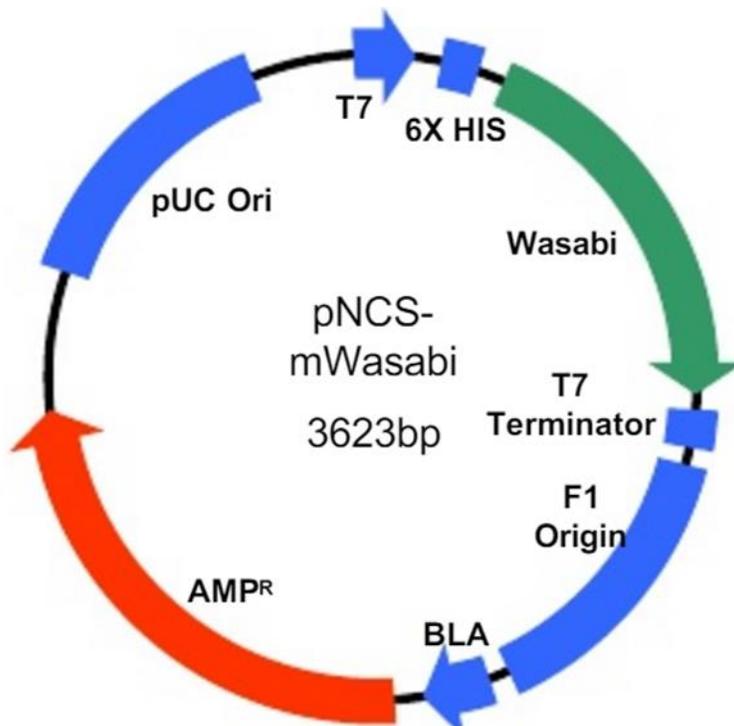


Figura 10. Mapa del plásmido pNCS-mWasabi (Allelebiotech®) donde se observa el promotor CMV (flecha blanca) y el gen AcGFP (flecha verde).

Una vez corroborada la presencia de la clona 1-D8H en el vector pNCS-mWasabi se procedió a realizar una segunda ligación (figura 9), en la cual se sustituye la clona 1-D8H por la clona 2-C10. Para realizar esta ligación se digirió 6 µg del constructo pNCS-1-D8H-mWasabi con la enzima Sfi1 (NE Biolabs) y 6 µg del constructo pComb3x-2-C10. El producto de ambas digestiones se corrió en un gel de agarosa al 10% y después se purificó la banda correspondiente al vector

linearizado pNCS-mWasabi y la banda correspondiente a el fragmento 2-C10 (figura 6), con el kit comercial QIAquick PCR purificación kit (QIAGEN®). Después se procedió a realizar la ligación. Para ello se preparó la siguiente reacción: 0.1 µg del vector pNCS-mWasabi linelizado con Sfi1, 1 µL de T7 ligasa, 5µL de buffer 2x T7 y 0.1 µg del fragmento 2-C10. La reacción se incubó durante 12h a 4°C, al finalizar esto se procedió a transformar el constructo pNCS-2-C10-mWasabi (figura 10.) en células electro competentes de *E. coli*, las cuales posteriormente se sembraron en agar LB + carbenicilina (50 mg/mL) y se cultivaron por 12 h a 37°C, para después realizar la selección de clonas y propagarlas en caldo LB + carbenicilina (50 mg/mL) bajo las mismas condiciones. Se purificó DNA plasmídico de las clonas seleccionadas y se verificó por digestión que presentaran el fragmento 2-C10 utilizando la enzima de restricción Sfi1 (NE Biolabs). Para verificar la secuencia y el marco de lectura del constructo se envió a secuenciar el plásmido a la compañía Allele biotech, San Diego, California, E.U.

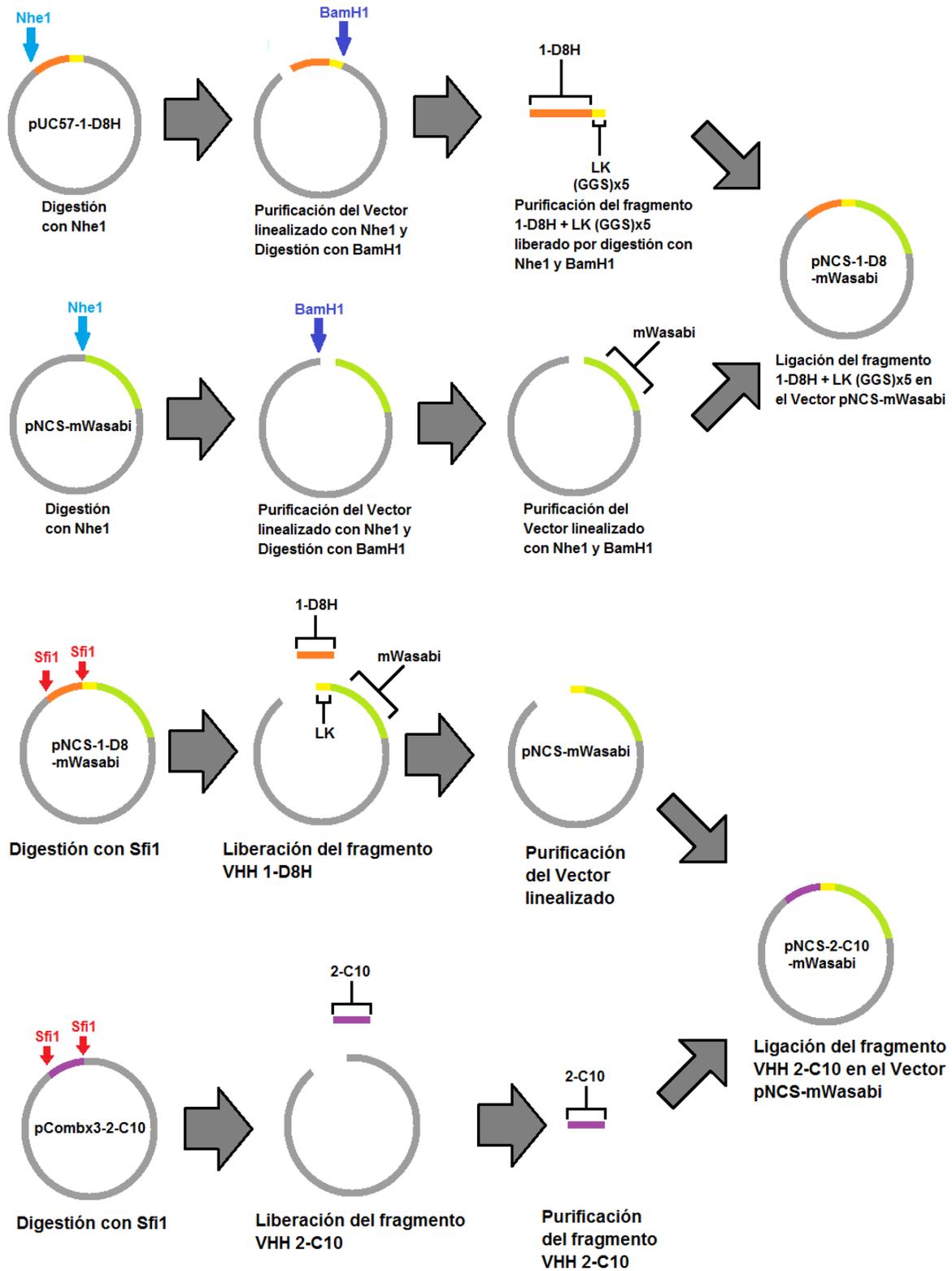


Figura 11. Esquema del proceso del acoplamiento del VHH 2-C10 a la proteína verde fluorescente mWasabi.

## **Expresión y purificación el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína fluorescente mWasabi**

La expresión intracelular fue hecha en células XL1Blue utilizando el vector de expresión pNCS que contiene el promotor T7 de la siguiente manera: se inocularon 10 mL de medio SB líquido con 1  $\mu$ L de crio preservado de la clonas 2-C10H-mWasabi y se incubó a 37°C durante 12 h. Se agregaron 2 mL del pre inóculo a 250 mL de medio SB líquido y se incubó por 36 h.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad metálica de la siguiente manera: se centrifugó a 4000 rpm los 250 mL de cultivo y se separó el medio SB del pellet, los 250 mL de medio SB fueron descartados y el pellet fue colocado en 1 tubo de 12 mL y se resuspendió en 5 mL de PBS (figura 12). El pellet resuspendido se sonicó durante 3 rondas de 1min en el sonicador y 1min en hielo, luego se centrifugó a 4000rpm durante 20 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 12mL con 1mL de esferas de sefarosa y se incubó en rotación a 4°C durante 12h, después se centrifugó a 1000 rpm durante 1min y se descartó el sobrenadante. Las esferas de sefarosa se trasladaron en tubos de separación (figura 13.) donde se hicieron 3 lavados de 5 mL con buffer de lavado y 7 eluciones de 0.5 mL de buffer de elución (figura 14). La purificación fue confirmada con electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 10%.

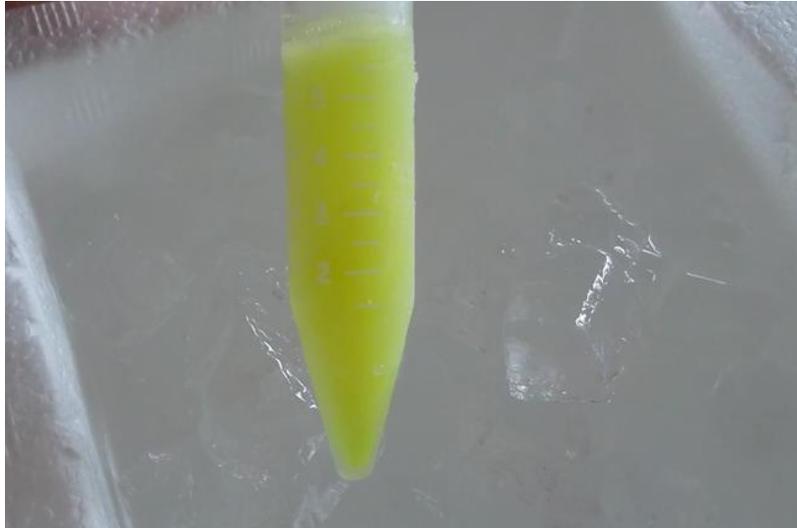


Figura 12. Pellet de las células XL1 Blue las cuales expresaron el VHH 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi.



Figura 13. Cromatografía de afinidad metálica del anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi.

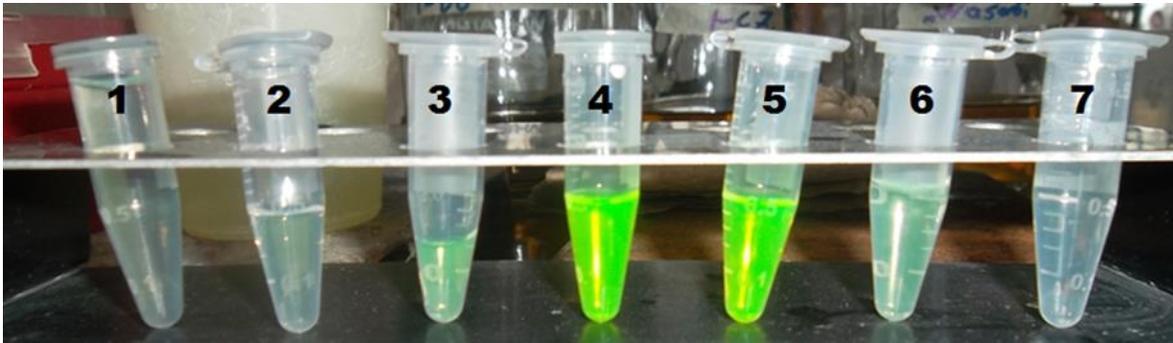


Figura 14. Eluciones de la Cromatografía de afinidad metálica del anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi. Las eluciones se hicieron del tubo 1 al tubo 7.

### **Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10 acoplado a la proteína fluorescente mWasabi por el método de ELISA**

La prueba de ELISA se utilizó para determinar si hay una diferencia en el reconocimiento del VHH marcado con el no marcado.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos utilizando el diseño de la tabla 3 y el siguiente protocolo:

1. Se agregaron 25  $\mu$ L de vacuna trivalente (VAXIGRIP 2014-2015) en cada pozo de la placa y se incubó por 24 h a 4°C sin cubrir la placa.
  - En el caso de los controles C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 se agregó 25  $\mu$ L de PBS en lugar de la vacuna trivalente (VAXIGRIP 2014-2015).
2. Trascurridas las 24 h se incubó la placa descubierta a 37°C hasta evaporar todo el líquido restante de los pozos.
3. Se agregó 50  $\mu$ L de buffer de bloqueo PBS-BSA (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 5% de Albumina de Suero Bovino) a los pozos y se incubaron cubiertos por 2 h a 37°C.

4. Se descartó el PBS-BSA y se agregaron 25  $\mu$ L de los anticuerpos primarios (AC1) a la concentración correspondiente en cada pozo siguiendo el diseño de la tabla 2, posteriormente se incubó la placa 2h 37°C.
  - Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-T para llegar a la concentración establecida.
  - En el caso de los controles A6, A7, B6, B7, D1, D2, D3, D4, D5, D6 Y D7 no se agregó anticuerpo primario, en su lugar se agregó 25 $\mu$ L de PBS-BSA.
5. Se descartó el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS-BSA-T (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 5% de Albumina de Suero Bovino + 0.05% de tween 20)
6. Se agregaron 25  $\mu$ L de anticuerpo secundario (AC2) anti 6His (BETHYL No. AC190-114P) diluido 1:10,000 en PBS-BSA y se incubó 1hr a 37°C.
7. Se descartó el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados con PBS-T (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 0.05% de tween 20) y 2 lavados con PBS.
8. Se agregaron 25 $\mu$ L de sustrato TMB (AGDIA Cat. No. ACC 00412/0060) en cada pozo y se incubó 15min a temperatura ambiente.
9. Se tomó la placa ya revelada y se leyó en el escáner Multiskan GO (Thermo Scientific Cat. No. N10588).

Tabla 3. Diseño del ensayo de ELISA del VHH fluorescente 2-C10mWasabi. A1 a A5: controles positivo, B1 a B5: prueba de reconocimiento del VHH 2-C10mWasabi, C1 a C7: control negativo, D1 a D7: control negativo, A6, A7, B6, y B7 :control negativo.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	Vacuna 2-C10 750ng AC2	Vacuna 2-C10 750ng AC2	Vacuna 2-C10 750ng AC2	Vacuna 2-C10 750ng AC2	Vacuna 2-C10 750ng AC2	Vacuna mWasabi AC2	Vacuna mWasabi AC2
<b>B</b>	Vacuna 2-C10mW 1,312ng AC2	Vacuna 2-C10mW 1,312ng AC2	Vacuna 2-C10mW 1,312ng AC2	Vacuna 2-C10mW 1,312ng AC2	Vacuna 2-C10mW 1,312ng AC2	Vacuna mWasabi AC2	Vacuna mWasabi AC2
<b>C</b>	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2	PBS 2-C10mW 1,312ng AC2
<b>D</b>	Vacuna PBS-BSA AC2	Vacuna PBS-BSA AC2	Vacuna PBS-BSA AC2	Vacuna PBS-BSA AC2	Vacuna PBS-BSA AC2	Vacuna PBS-BSA AC2	Vacuna PBS-BSA AC2

### **Prueba de reconocimiento del anticuerpo fluorescente 2-C10mWasabi a la Vacuna de influenza trivalente por la técnica de Western blot**

La prueba de Western-blot se utilizó para determinar si los anticuerpos 2-C10mW reconocen la misma proteína que el anticuerpo 2-C10. El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

1. La vacuna trivalente se concentró 10 veces más, centrifugando a 4000 rpm con la columna Centricon YM-30 (micon® Cat. No. 4202).
2. Se tomó 60 µL de vacuna concentrada y se le agrego 20 µL de buffer de carga 4x Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD Cat. #161-0747) sin βME y se cargaron 25 µL en cada pozo del gel de poliacrilamida SDS.

3. Se corrió el gel de poliacrilamida SDS por 1 h a 100 v, después se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.
4. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas ya trasferidas se incubó con PBS-L (Buffer de Fosfatos Salino 1X con 5% de leche descremada) durante 12 h a 4°C.
5. Se descartó el buffer PBS-L y se agregó 10mL de anticuerpo primario diluido en PBS-L y se incubó 12 h a 4°C con agitación.
6. Se descartó el anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados con PBS-T para después agregar 10mL del anticuerpo secundario anti his6 y el anticuerpo secundario antillama disueltos 1:5000 en PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación.
7. Se descartó el anticuerpo secundario y se hicieron 3 lavados con PBS-T y 2 con PBS, después se rebeló con TMB.

## VII. RESULTADOS

### Diseño y síntesis de los VHHs 2-C10, 1-D8 y 1-C7

Se obtuvieron tres diseños distintos de VHH con sustituciones en los FRs como se observa en la Figura 15. No todos los VHH humanizados presentan el mismo número de cambios debido a que presentan diferentes secuencias entre sus FRs. La clona 2-C10H presenta 9 cambios, la clona 1-D8H presenta 14 cambios y la clona 1-C7H presenta 10 cambios. Sólo se hizo el modelo en 3D de los anticuerpos 2-C10 y 2-C10H utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0 (figura 16 y 17.). Estos dos modelos se utilizaron para determinar la solubilidad utilizando un programa de determinación de solubilidad *in silico* (Proteína-Sol) proporcionando por Alejandro Carballo. El programa sólo toma el parche positivos más alto para determinar la solubilidad del anticuerpo, si los valores de este parche son mayores o igual a 1, el anticuerpo será insoluble, pero si el parche es menor a 1 el anticuerpo será soluble (figura 18). El valor más alto de un parche positivo del anticuerpo de Llama 2-C10 fue de 0.41 lo nos indica que es un anticuerpo soluble. En el caso del anticuerpo humanizado 2-C10H el valores más alto de un parche positivo fue de 0.57 lo que indica que aunque se volvió ligeramente menos soluble no fue suficiente para ser insoluble.

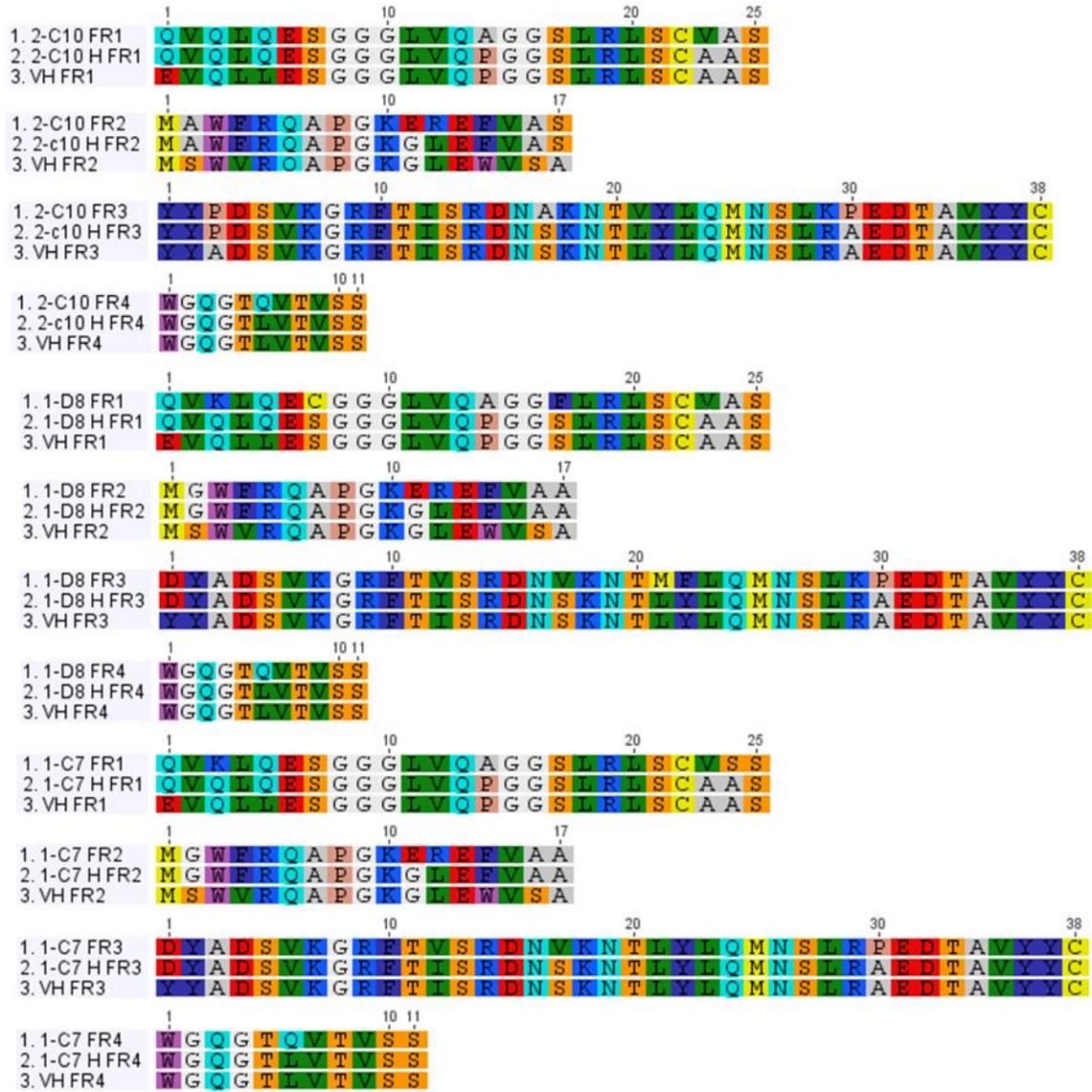


Figura 15. Alineación de los FRs de las tres clonas de VHH (2-C10, 1-D8, y 1-C7), tres clonas de VHHs humanizados (2-C10H, 1-D8H, y 1-C7H) y un VH de humano subtipo 3 (Characteristics of human antibody).

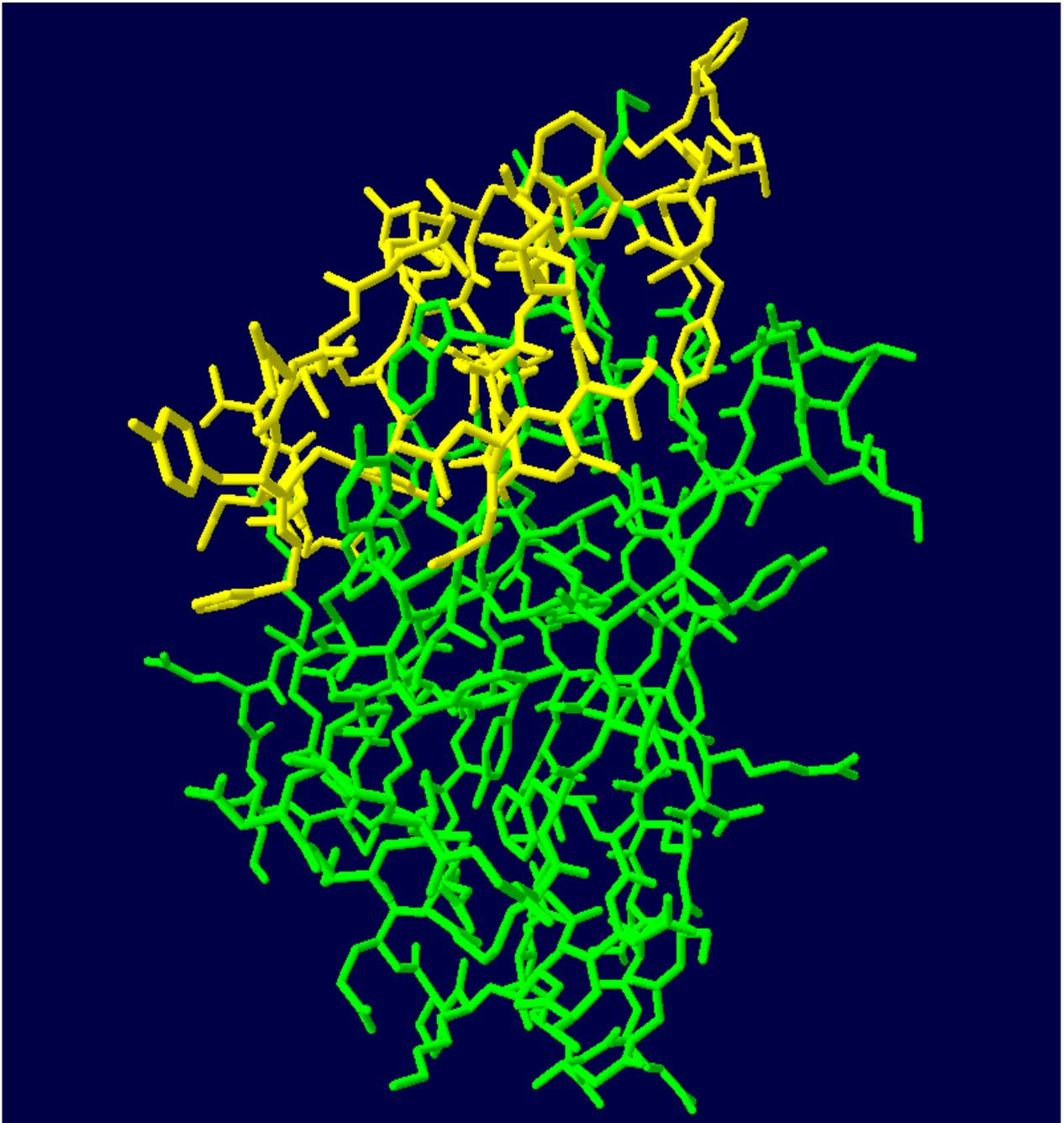


Figura 16. Diseño de la estructura tridimensional del VHH 2-C10LI utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0. En color verde se observa las cuatro regiones FR y en color amarillo se observan los tres CDRs.

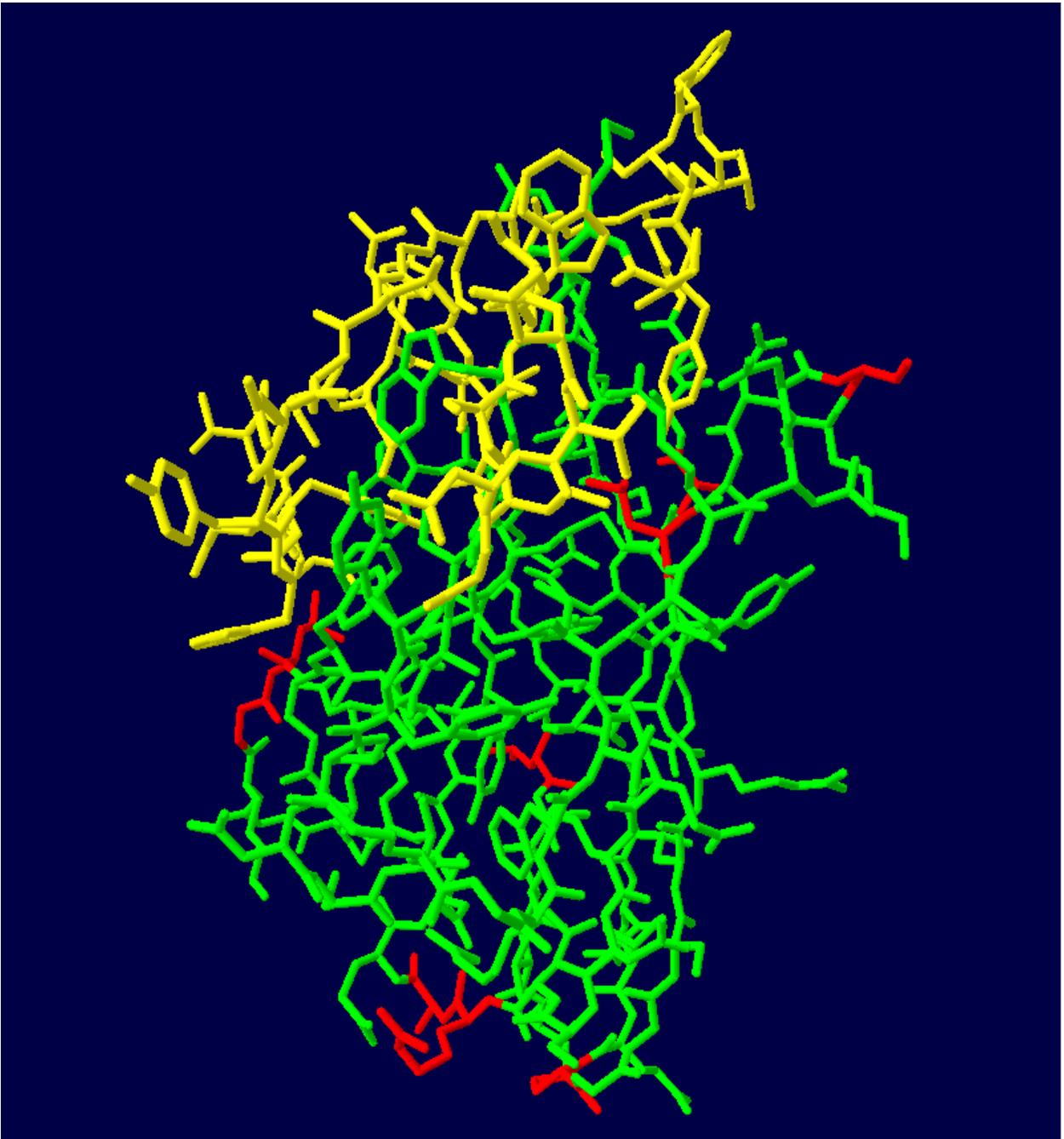


Figura 17. Diseño de la estructura tridimensional del VHH 2-C10H utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0. Verde: cuatro regiones FR, amarillo: tres CDRs y en color rojo se observan las nueve sustituciones hechas.

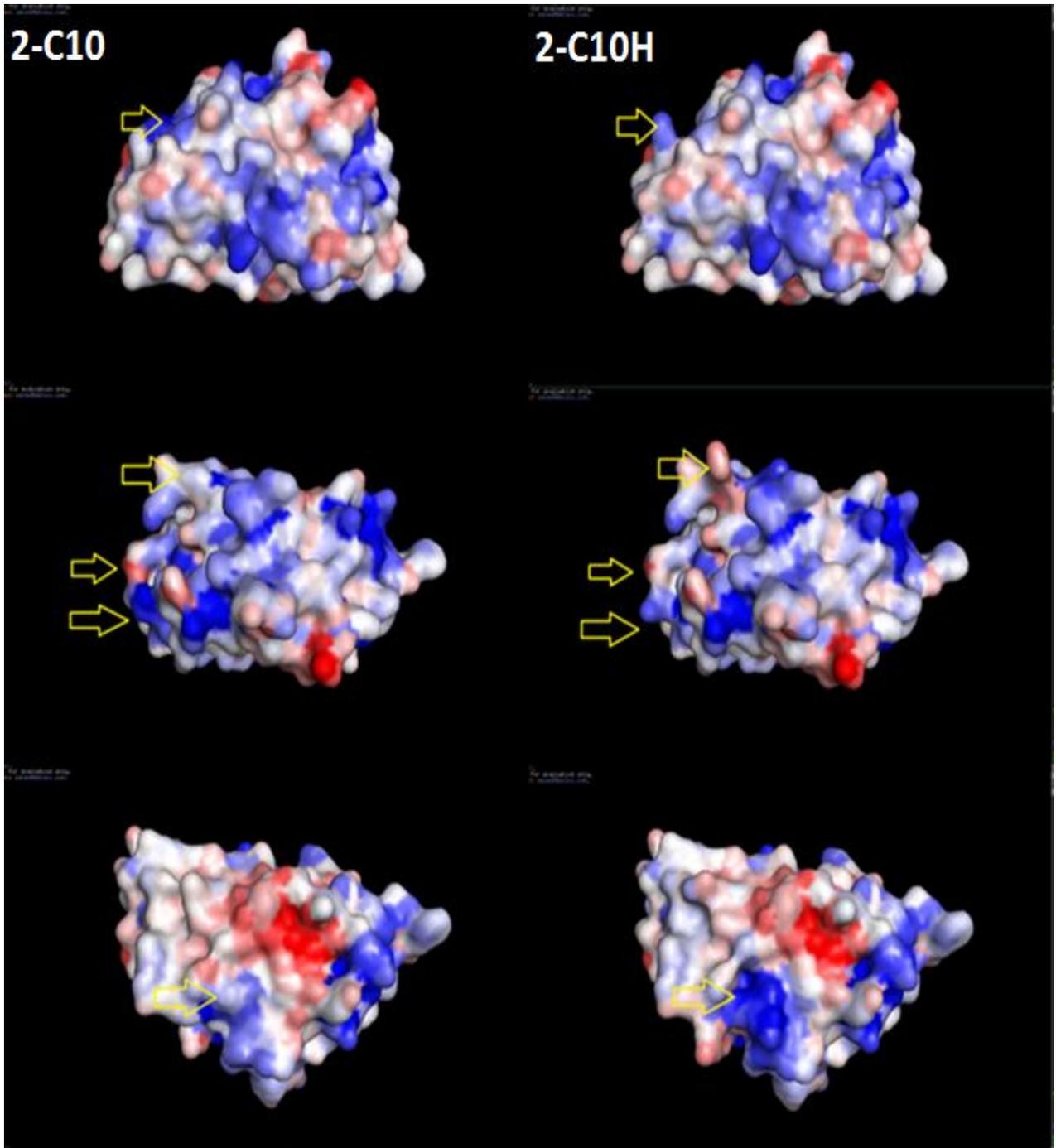


Figura 18. Comparación de los anticuerpos 2-C10 y 2-C10H utilizando el programa PyMOL. Las distintas cargas son identificadas en colores (Azul: parches positivo, rojo: parches negativos y blanco: parches neutros) y las flechas amarillas indican las diferencias entre los anticuerpos.

## Clonación de 2-C10H\_pComb3x, 1-D8H\_pComb3x y 1-C7H\_pComb3x

Los diseños sintetizados en la compañía Genscript (Nueva Jersey, Estados Unidos) se clonaron en el vector de expresión pComb3x utilizando los sitios de corte Sfi1. Los constructos pComb3x+2-C10H, pComb3x+1-D8H, y pComb3x+1-C7H (figura 19.) se utilizaron para transformar las células de expresión TopF10.

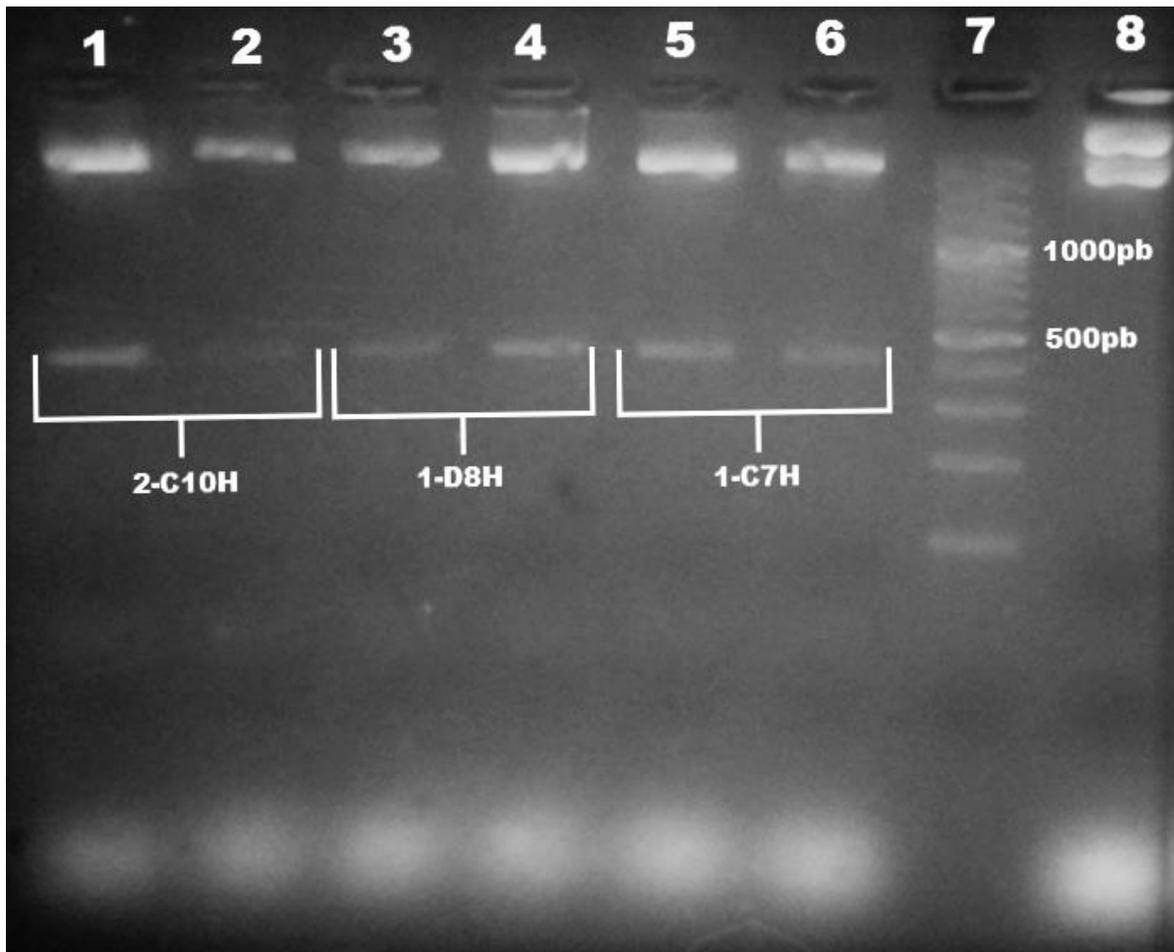


Figura 19. Gel de agarosa al 1% se observa, el producto de la digestión de los constructos liberando un fragmento de 400pb, en el carril 1 y 2 el constructo pComb3x+2-C10H, en el carril 3 y 4 el constructo pComb3x+1-D8H, en el carril 5 y 6 el constructo pComb3x+1-C7H, en el carril 7 el estándar GeneRuler™ 100bpPlus #SM0321, en el carril 8 pComb3xss sin digerir.

## Expresión y purificación de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H

Los VHHs humanizados se expresaron en las células TOPF10 y se purificaron por cromatografía de afinidad metálica, la cual fue corroborada en geles de poliacrilamida (figura 20). La cantidad de proteína se midió por Abs a 280nm utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (tabla 4.) y se observó que los VHH (2-C10H, 1-D8H y 1-C7H) siguen manteniendo un nivel similar de expresión aunque al ser humanizados se cambiaron 9, 14 y 10 aminoácidos correspondientemente.

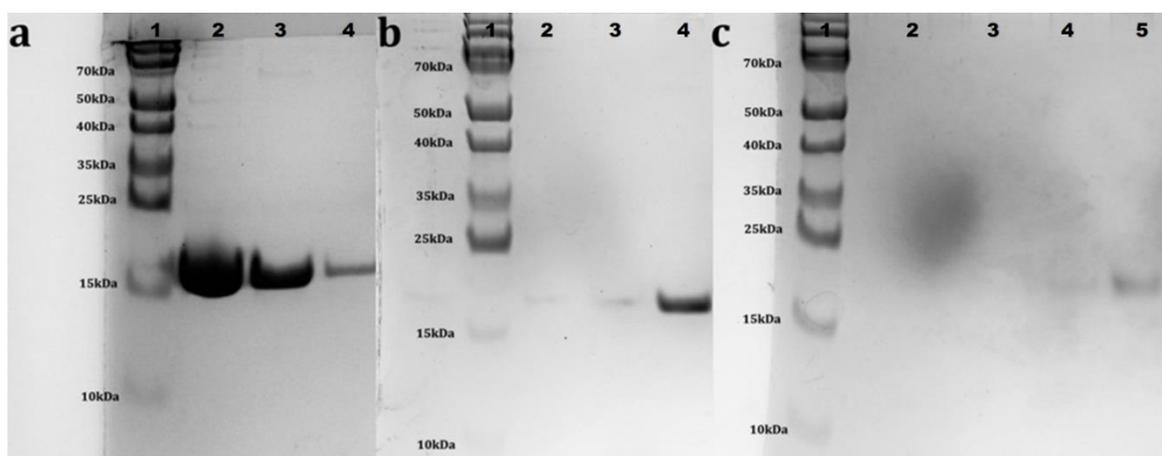


Figura 20. Geles de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie. a) En el carril 1 de las tres imágenes, el estándar PageRuler™ # 26616, en el carril 2, 3 y 4 el anticuerpo 2-C10H con un peso molecular de 17 kDa. b) En el carril 2, 3 y 4 el anticuerpo 1-D8H con un peso molecular de 17kDa. c) En el carril 2, 3, 4 y 5 el anticuerpo 1-C7H con un peso molecular de 17kDa.

Tabla 4. Cantidad de anticuerpos humanizados expresados en 250 mL de medio SB.

VHH humanizado	Volumen de cultivo	Cantidad total
2-C10H	250 mL	4.0 mg
1-D8H	250 mL	0.8 mg
1-C7H	250 mL	0.38 mg
2-C10	250 mL	3.6 mg
1-D8	250 mL	1.1 mg
1-C7	250 mL	0.30 mg

## Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H a la Vacuna de influenza trivalente por el método de ELISA

La placa de ELISA se reveló con el sustrato TMB (figura 21.) y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 400nm con el escáner Multiskan GO. Los datos de absorbancia arrojados por el escáner se utilizaron para graficar el reconocimiento de las tres clonas de VHH humanizados (figura 22, 23, y 24).

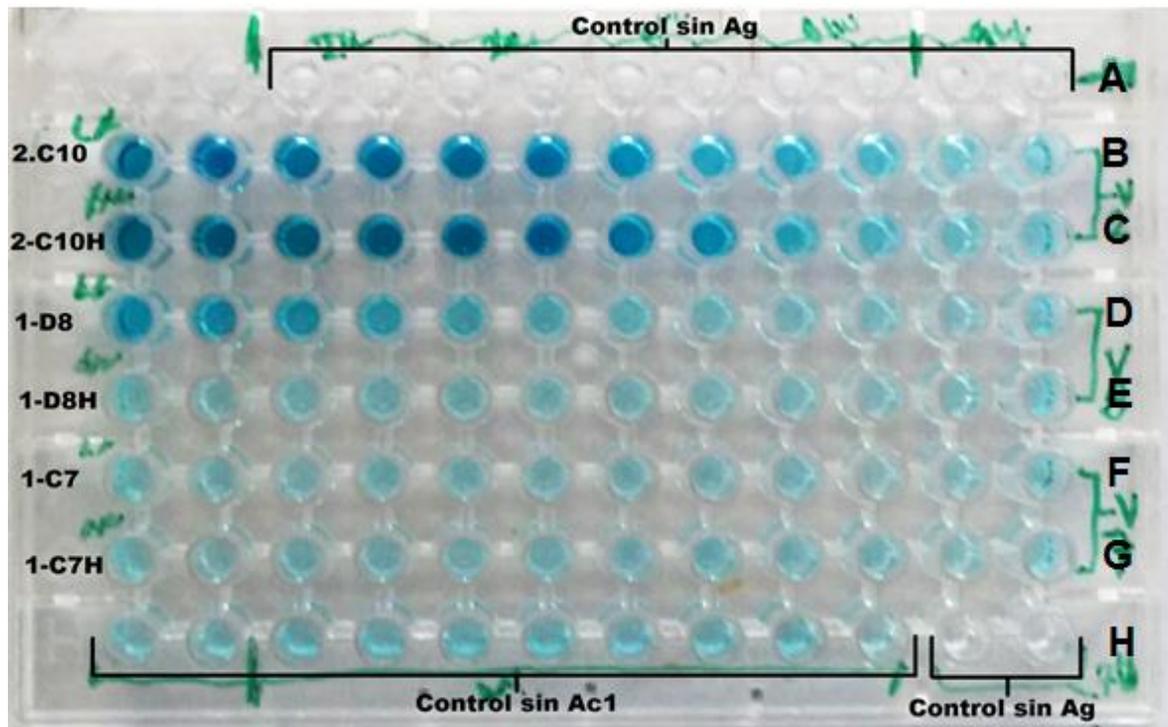


Figura 21. Comparación por prueba de ELISA de 3 anticuerpos humanizados (2-C10H, 1-D8H y 1-C7H) con los 3 anticuerpos de llama no humanizados (2-C10, 1-D8 Y 1-C7). A: controles negativos sin Antígeno, B: diluciones del anticuerpo 2-C10LI, C: diluciones del anticuerpo 2-C10H, D: diluciones del anticuerpo 1-D8H, E: diluciones del anticuerpo 1-D8H, F: diluciones del anticuerpo 1-C7H, G: diluciones de anticuerpo 1-C7H y H: controles negativos sin Ac1.

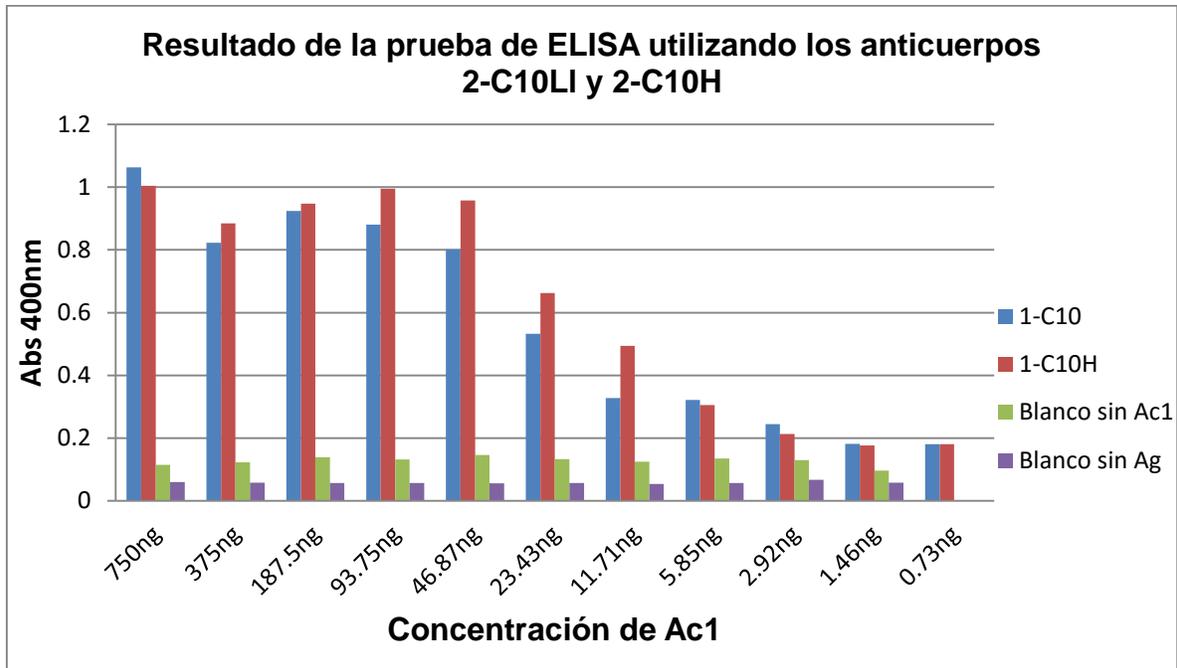


Figura 22. Comparación de los VHH 2-C10 y 2-C10H. En el eje Y se encuentra los niveles de absorbancia y en el eje X, las diferentes concentraciones de Ac1 empleadas.

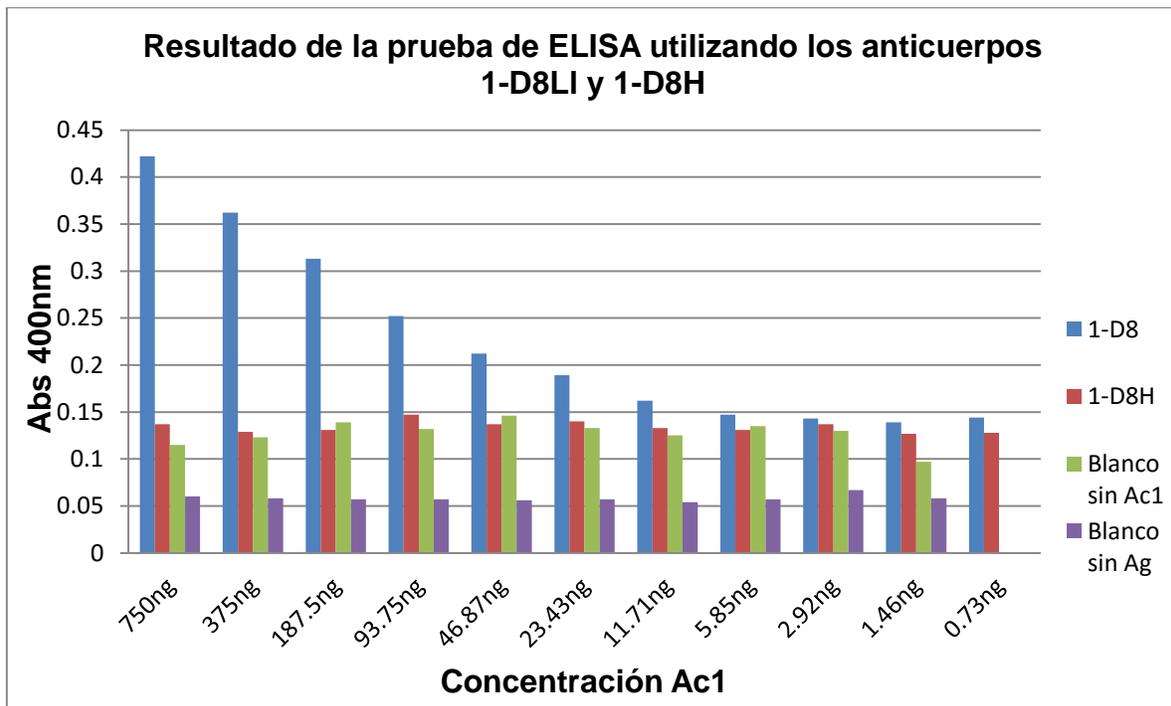


Figura 23. Comparación de los VHH 1-D8 y 1-D8H. En el eje Y se encuentra los niveles de absorbancia y en el eje X, las diferentes concentraciones de Ac1 empleadas.

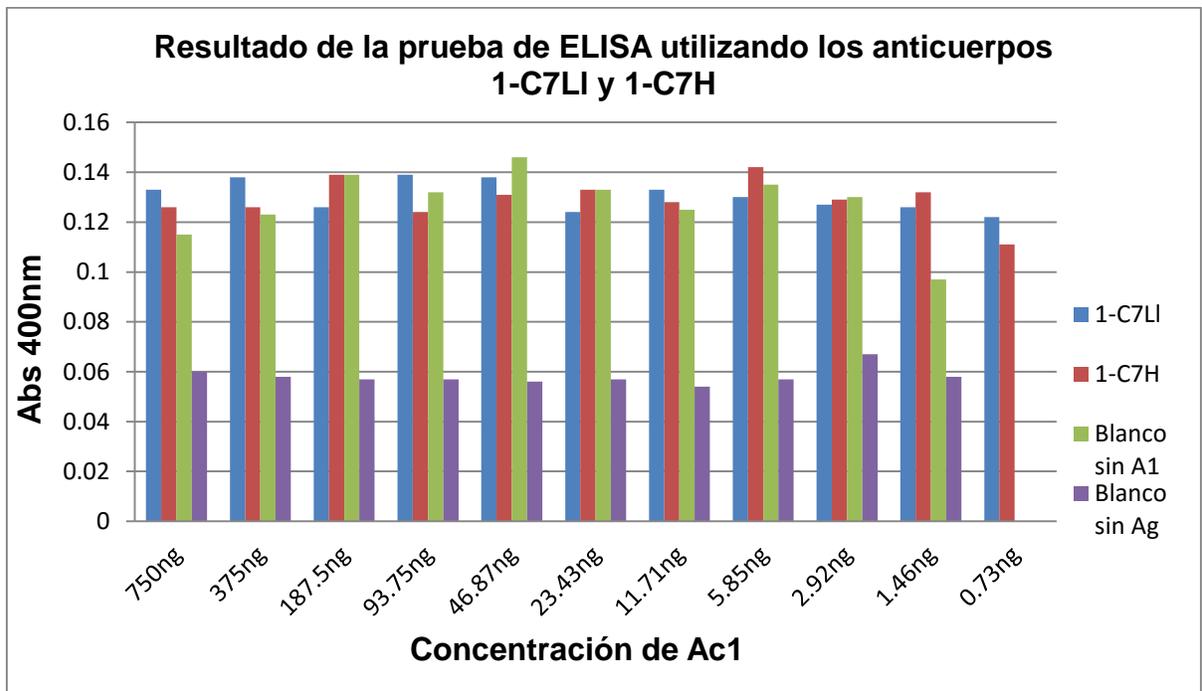


Figura 24. Comparación de los VHH 1-C7 y 1-C7H. En el eje Y se encuentra los niveles de absorbancia y en el eje X, las diferentes concentraciones de Ac1 empleadas.

En el caso del anticuerpo 2-C10H reconoció la vacuna trivalente VAXIGRIP® 2014-2015 a las mismas diluciones del anticuerpo no humanizado 2-C10LI (1.46ng), lo que nos demuestra que no perdió capacidad de reconocimiento a pesar de los 9 aminoácidos sustituidos. En el caso del anticuerpo 1-D8H no reconoció la vacuna trivalente VAXIGRIP® 2014-2015 a las mismas diluciones del anticuerpo no humanizado 1-D8LI, lo que nos demuestra que perdió capacidad de reconocimiento por los 14 aminoácidos sustituidos. En el caso del anticuerpo 1-C7H no reconoció la vacuna trivalente VAXIGRIP® 2014-2015 pero de igual manera el anticuerpo 1-C7LI no reconoció la vacuna trivalente VAXIGRIP® 2014-2015.

### **Prueba de reconocimiento del VHH 2-C10H a la Vacuna de influenza trivalente por la técnica de Western blot**

La prueba de Western-blot se utilizó para determinar si los anticuerpos 2-C10H reconocían la misma proteína que el anticuerpo 2-C10. El peso molecular del HA /California/07/2009 pandémico es de 62 kDa aproximadamente (Elena Feshchenko and Cox, 2012) el cual está presente en la vacuna trivalente VAXIGRIP® 2014-2015 (figura 25.). El anticuerpo 2-C10H reconoció específicamente a la proteína HA de 62 kDa al igual que el anticuerpo 2-C10LI. Utilizando el programa ImangeJ se cuantificó el reconocimiento el anticuerpo 2-C10H y 2-C10LI (figura 26). En el caso del anticuerpo 2-C10LI tuvo un promedio de 28877 pixeles y el anticuerpo 2-C10H tuvo un promedio de 29581 pixeles utilizando la misma área, lo que demuestra que el anticuerpo 2-C10H no perdió afinidad de la proteína HA /California/07/2009.

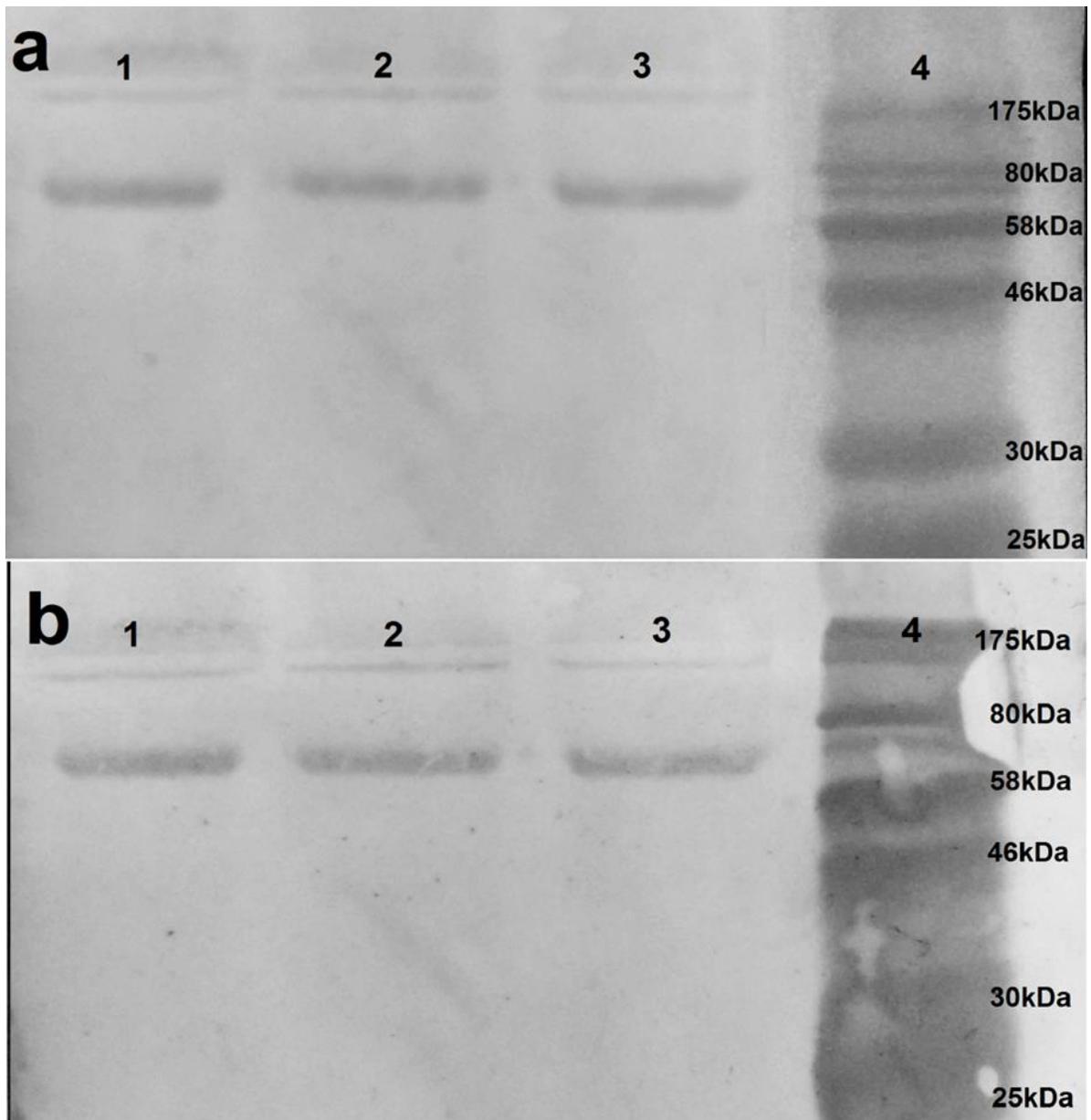


Figura 25. Reconocimiento del anticuerpo humanizado 2-C10H a la proteína hemaglutinina por Western-blot utilizando los anticuerpos 2-C10LI y 2-C10H. a) reconocimiento del anticuerpo 2-C10LI a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa. b) reconocimiento del anticuerpo 2-C10H a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa.

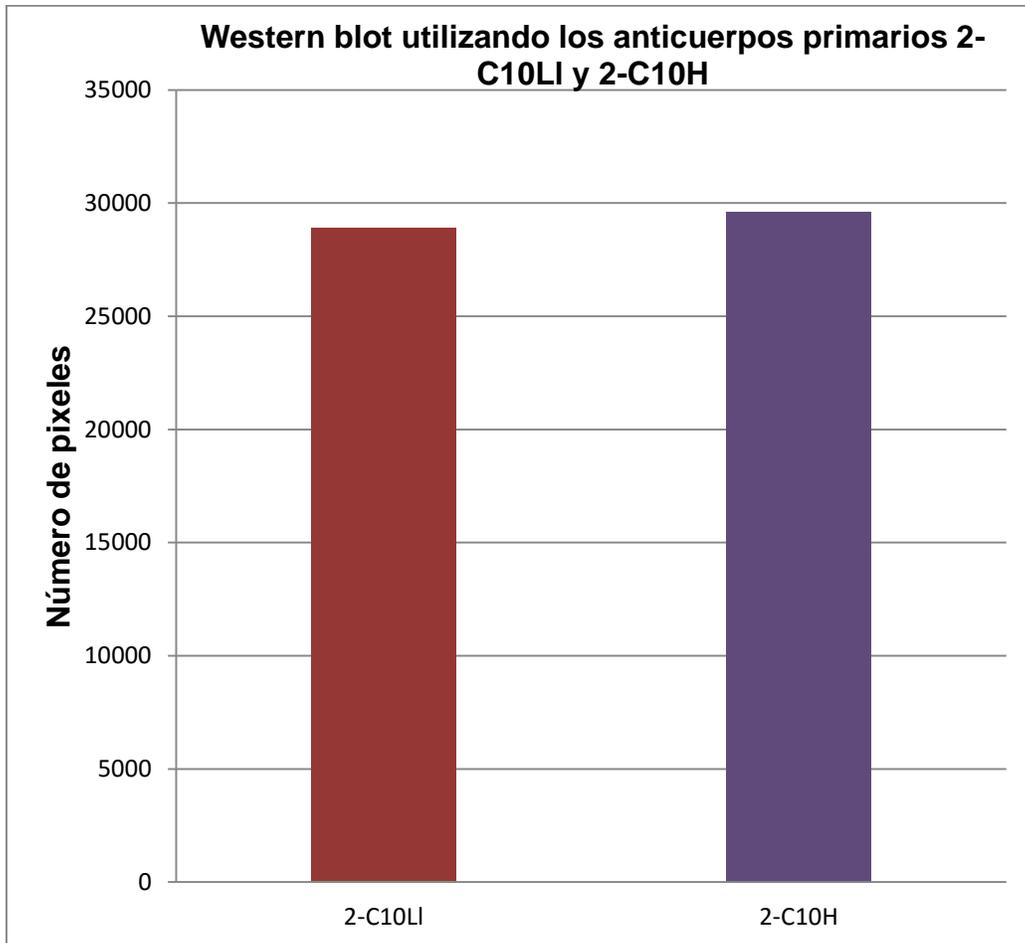


Figura 26. Comparación del anticuerpo 2-C10LI con el anticuerpo 2-C10H utilizando el área de la gráfica del programa ImageJ.

### Diseño y síntesis del gen 2-C10mWasabi

La construcción pNSC\_2-C10mWasabi ya diseñada y sintetizada fue corroborada por digestión con las enzimas Sfi1 (NE Biolabs) y EcoR1. Estas enzimas liberarían tres pedazos, el gen VHH de 425pb y el gen de la proteína verde fluorescente mWasabi de 786pb y la unión de ambos de 1198pb (figura 27.).

El constructo, que se secuenció en la empresa Eton Bioscience, presenta el gen 2-C10 en el extremo 5', el gen mWasabi en el extremo 3', una etiqueta His6

(rojo), el sitio de corte Nhe1 (azul), el sitio de corte Sfi1(morado), el linker GGSx5 (amarillo), el sitio de corte EcoR1 (verde) y el sitio de corte HindIII (gris):

5' **CATCATCATCATCAT**GGTATG**GCTAGC**GG**GGCCAGGCGGCC**CAGGT  
GCAGTTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCAGGGGGCTCTTTGAG  
ACTATCCTGTGCCGCCTCCGGACGCACCTATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAG  
GCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTTTGTAGCAGCTATTACGGGGAGTGGCGGT  
GGAATAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
ACTCTAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACAC  
GGCCGTTTATTACTGTGCAGGAGACTCAGGGTTGGGGGAGGGGGGTGATAG  
CCGCTTCCCAATTCGTATGACAGCTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGT  
CTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCACAACCA**GGCCAGGCGGCC**TG**GG**  
**TGGCAGCGGTGGCAGCGGTGGCAGCGGTGGCAGCGGTGGCAGC**GGGGGG  
ATCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGACCACAATGGGCGTAATCAAGCCCG  
ACATGAAGATCAAGCTGAAGATGGAGGGCAACGTGAATGGCCACGCCTTCGT  
GATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGACGGCACCAACACCATCAA  
CCTGGAGGTGAAGGAGGGAGCCCCCTGCCCTTCTCCTACGACATTCTGACC  
ACCGCGTTCAGTTACGGCAACAGGGCCTTCACCAAGTACCCCGACGACATCC  
CCAACTACTTCAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTACTCTTGGGAGCGCACCAT  
GACCTTCGAGGACAAGGGCATCGTGAAGGTGAAGTCCGACATCTCCATGGAG  
GAGGACTCCTTCATCTACGAGATACACCTCAAGGGCGAGAACTTCCCCCCA  
ACGGCCCCGTGATGCAGAAGGAGACCACCGGCTGGGACGCCTCCACCGAGA  
GGATGTACGTGCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGACGTCAAGATGAAGCTGC  
TGCTGGAGGGCGGCGGCCACCACCGCGTTGACTTCAAGACCATCTACAGGG

CCAAGAAGGCGGTGAAGCTGCCCCGACTATCACTTTGTGGACCACCGCATCGA  
 GATCCTGAACCACGACAAGGACTACAACAAGGTGACCGTTTACGAGATCGCC  
 GTGGCCCCGCAACTCCACCGACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA  
 GAATTCGAAGCTT3'.

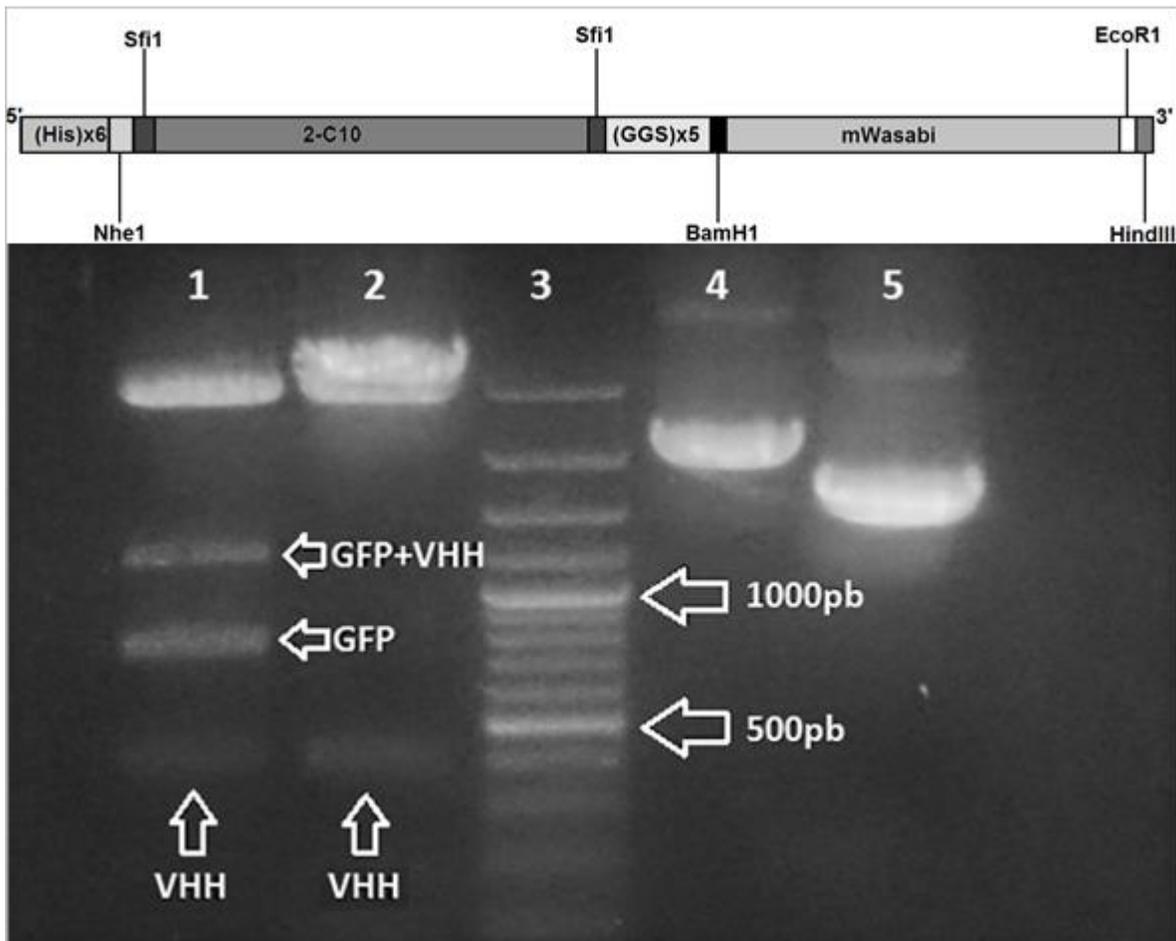


Figura 27. Diseño y construcción del gen 2-C10mWasabi. En la parte superior se observa un esquema de la construcción del VHH fluorescente 2-C10mWasabi, el cual presenta un linker (GGG)<sub>5</sub> y los sitios de corte Nhe1, BamH1, Sfi1, EcoR1. En la parte inferior se observa un gel de agarosa al 1%. Carril 1: pNSC-VHH-mWasabi digeridos con Sfi1 (NE Biolabs)(NE Biolabs)y EcoR1, carril 2: pComb3x-2-C10 digerido con Sfi1, carril 3: estándar GeneRuler™100bpPlus #SM0321, carril 4: pNSC-VHH-mWasabi sin digerir, carril 5: pComb3x-2-C10.

## **Expresión y purificación el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína fluorescente mWasabi**

La proteína 2-C10mWasabi está constituida por un VHH de 142 aminoácidos, en el extremo N-terminal se encuentra la etiqueta de 6 histidinas y en el extremo C-terminal se encuentra la proteína verde fluorescente mWasabi (figura 28.). Debido a esta unión la proteína 2-C10mWasabi fluoresce al ser excitada con luz UV a 320nm, gracias a esto la selección de clonas positivas se determinó bajo este tipo de luz (figura 29.). Se comparó el anticuerpo 2-C10mWasabi con la proteína verde fluorescente mWasabi en un gel de poliacrilamida y se encontró que el peso molecular de ambas corresponde a lo predicho. La intensidad de las dos proteínas a simple vista es similar (figura 30.), lo que sugiere que la proteína mWasabi acoplada al VHH 2-C10LI no pierde intensidad.

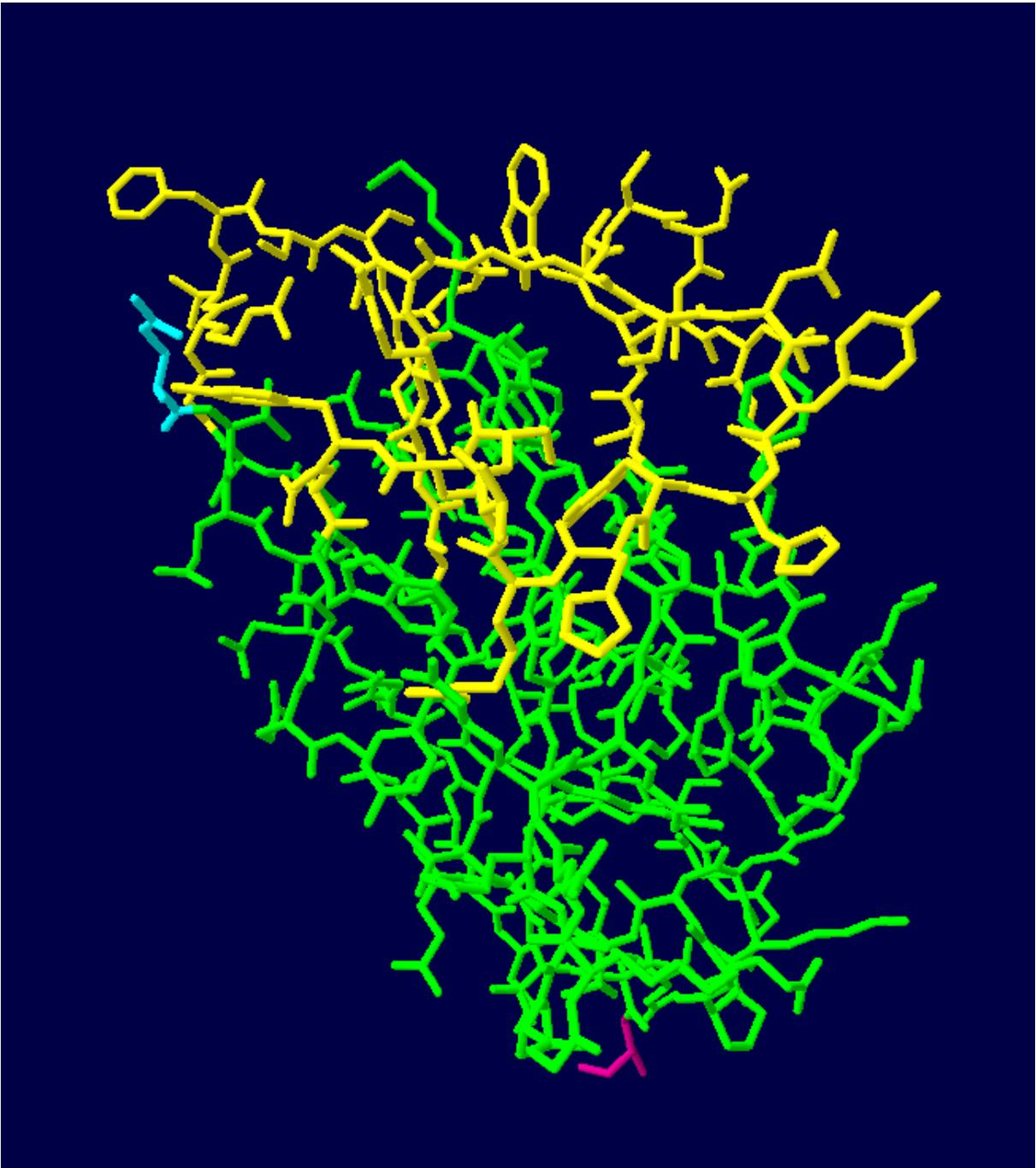


Figura 28. Estructura tridimensional del VHH 2-C10 utilizando el programa Swiss-PdbViewer4.1.0. Verde: regiones FR, amarillo: CDRs, azul: extremo N-terminal donde se encuentra la etiqueta His6 y morado: extremo C-terminal.

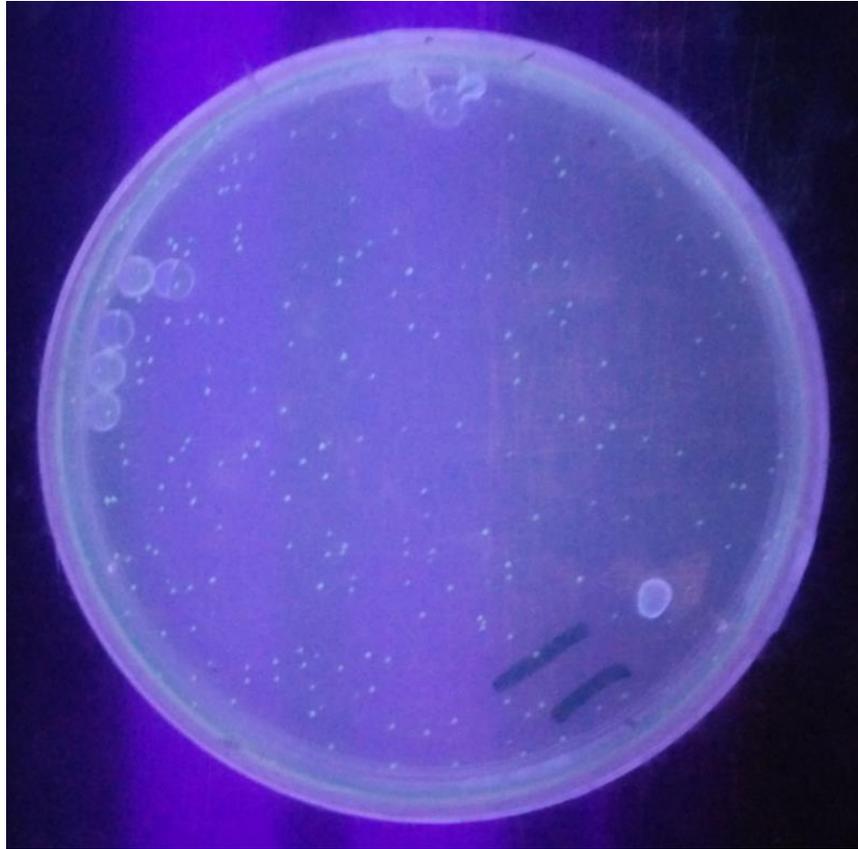


Figura 29. Fotografía de clonas positivas en una caja de Petri con Agar LB + carbencilina.

La purificación del anticuerpo fluorescente 2-C10mWasabi se corroboró en un gel de poliacrilamida en el cual se comparó con el peso molecular de mWasabi. El peso molecular del VHH 2-C10 es de 16kDa, en el caso de la proteína verde fluorescente mWasabi anda alrededor de los 25kDa, lo que da un peso alrededor de 41kDa para la proteína 2-C10mWasabi (figura 30.).

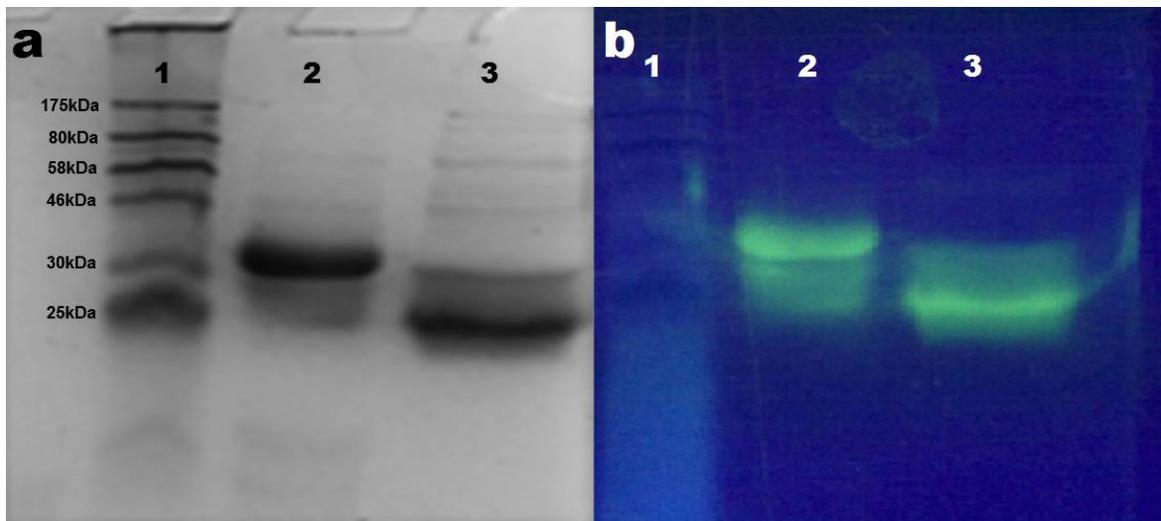


Figura 30. Expresión del anticuerpo fluorescente mWasabi. a) Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, en el carril 1 el estándar preteñido prestained Protein Marker #P7706, en el carril 2 el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi y en carril 3 la proteína verde fluorescente mWasabi. b) Gel de poliacrilamida al 10% excitado con luz UV, en el carril 1 el estándar preteñido Prestained Protein Marker #P7706, en el carril 2 el anticuerpo 2-C10 acoplado a la proteína verde fluorescente mWasabi y en carril 3 la proteína verde fluorescente mWasabi.

### **Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10 acoplado a la proteína fluorescente mWasabi por el método de ELISA**

Los cambios hechos en el VHH 2-C10 fueron: el cambio de la etiqueta His6 del extremo C-terminal al N-terminal y unión a la proteína verde fluorescente mWasabi a través de un linker flexible (GGsX5). Por medio de una prueba de ELISA (figura 31.) fue necesario determinar el nivel de reconocimiento del anticuerpo 2-C10mWasabi al virus AH1N1/2009 pandémico presente en la vacuna anti influenza trivalente 2014-2015 VAXIGRIP® por medio de una (figura31.) y los datos de absorbancia arrojados por el escáner se observó que el reconocimiento al antígeno fue afectado pero se desconoce la causa (figura 32.).

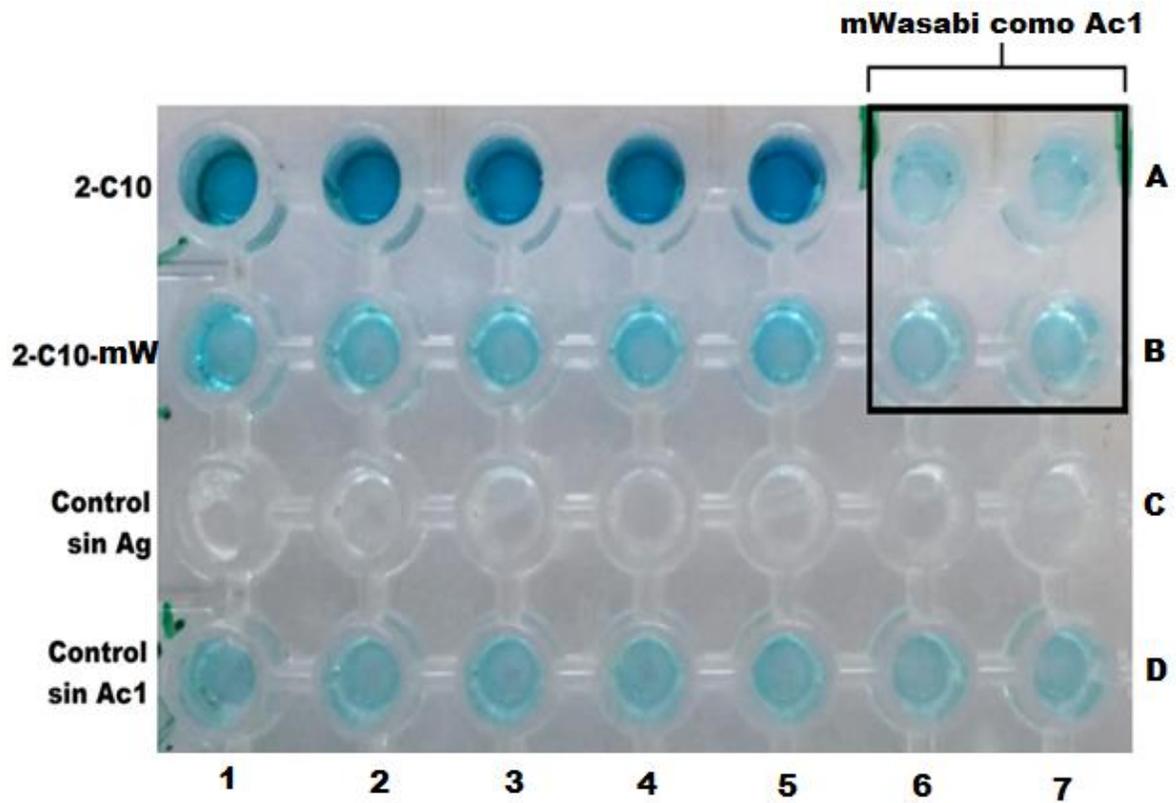


Figura 31. Evaluación de afinidad del anticuerpo 2-C10mWasabi mediante una prueba de ELISA utilizando el anticuerpo 2-C10mWasabi. AC1 a A5: controles positivo, B1 a B5: prueba de reconocimiento del VHH 2-C10mWasabi, C1 a C7: control negativo, D1 a D7: Control negativo, A6, A7, B6, y B7 :control negativo.

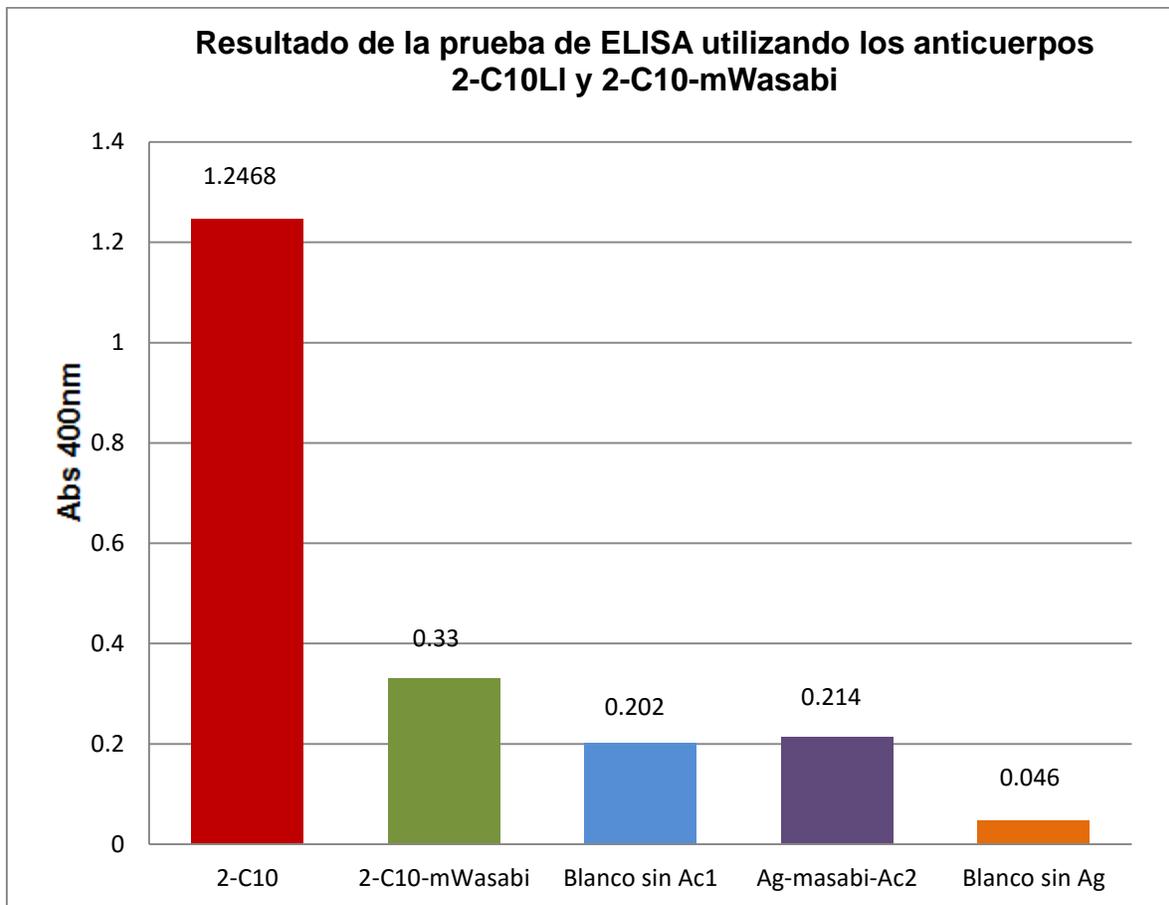


Figura 32. Comparación del VHH 2-C10 y el VHH fluorescente 2-C10mWasabi. Los valores de Abs de los pozos se promediaron para cada columna.

### **Prueba de reconocimiento de los anticuerpos 2-C10H, y 2-C10 mWasabi a la Vacuna de influenza trivalente por la técnica de Western blot**

La prueba de Western-blot se utilizó para determinar si los anticuerpos 2-C10mWasabi reconoce la misma proteína que el anticuerpo 2-C10LI. El peso molecular del HA /California/07/2009 pandémico es de 62 kDa aproximadamente (HA 62 kDa) el cual está presente en la vacuna trivalente VAXIGRIP® 2014-2015 (figura 33.). El anticuerpo 2-C10mWasabi reconoció específicamente a la proteína HA de 62 kDa pero con menor intensidad que el anticuerpo 2-C10LI. Utilizando el programa ImangeJ se cuantificó el reconocimiento el anticuerpo 2-C10H y 2-C10LI

(figura 34). En el caso del anticuerpo 2-C10LI tuvo un promedio de 28877 pixeles y el anticuerpo 2-C10H tuvo un promedio de 29581 pixeles utilizando la misma área, lo que demuestra que el anticuerpo 2-C10H no perdió reconocimiento a la proteína HA /California/07/2009.

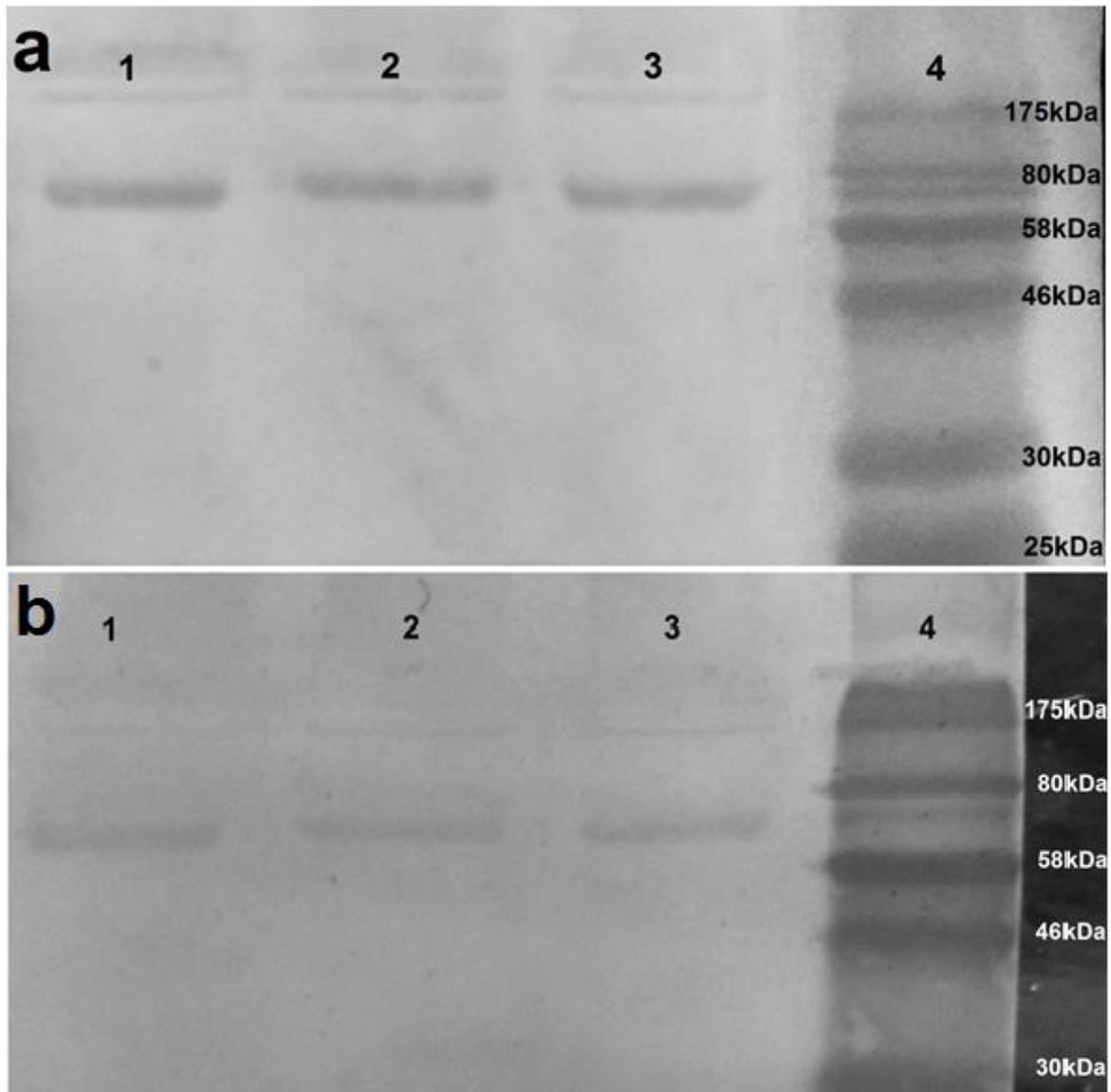


Figura 33. Western-blot utilizando los anticuerpos 2-C10LI y 2-C10mWasabi. a) Reconocimiento del anticuerpo 2-C10LI a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa. b) Reconocimiento del anticuerpo 2-C10mWasabi a la proteína HA /California/07/2009 pandémico de 62kDa.

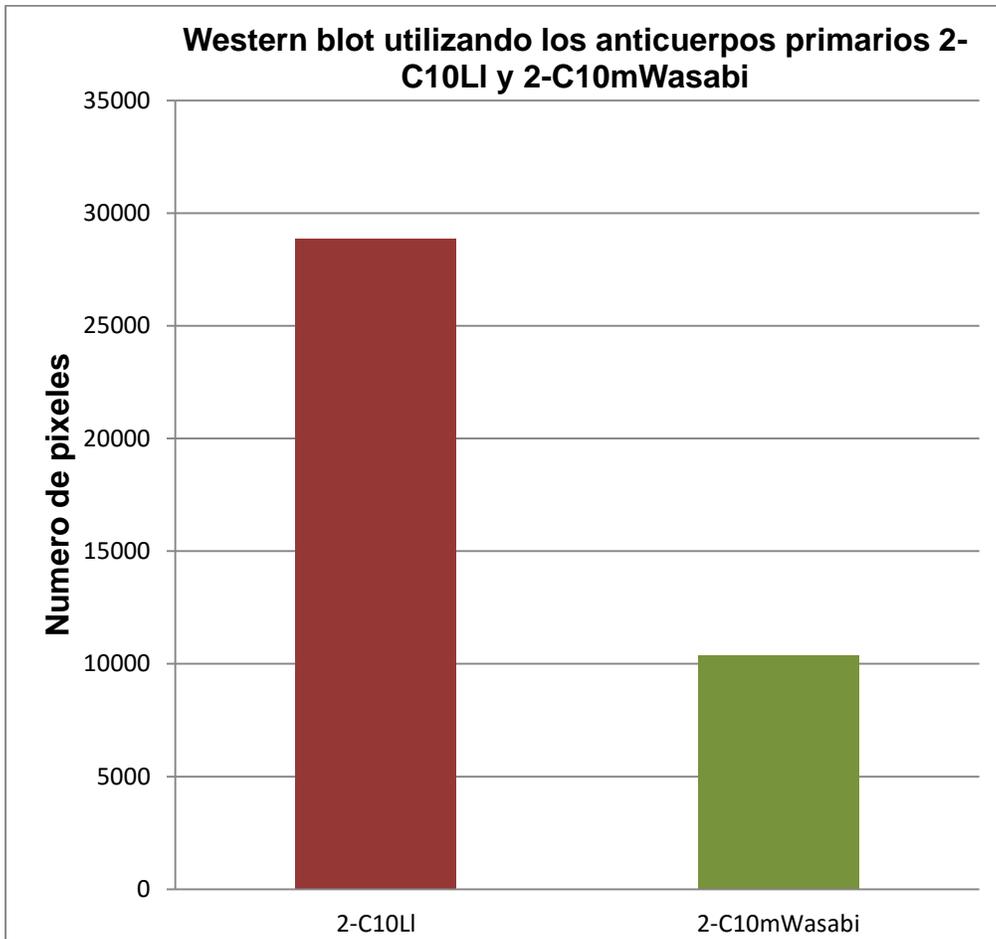


Figura 34. Comparación del anticuerpo 2-C10LI con el anticuerpo 2-C10mWasabi.

## VIII. DISCUSIÓN.

Desde el descubrimiento de los VHH en 1983 y su clasificación en 1993 se han realizado investigaciones en el área de la salud dentro de las que destacan, para este trabajo, el descubrimiento de VHH capaces de neutralizar virus incluidos varios tipos del virus de la influenza (Harmsen et al., 2013). Las ventajas de usar los VHH se debe a la propiedades que presentan, que consiste en resistir altas temperaturas, resistencia a alto y bajo pH, fácil plegamiento, fácil expresión y purificación en bacterias y levaduras, fuerte reconocimiento en ausencia de cadena pesada y reconocimiento de epítomos de difícil acceso (Wesolowski et al., 2009).

Este trabajo se realizó con 3 clonas de VHH que tienen distinto porcentaje de neutralización y reconocimiento contra diferentes subtipos del virus AH1N1/2009 pandémico (A/Texas/48/2009pdm y A/California/07/2009pdm) según estudios que se realizaron en Advanced Medical Research Institute of Canada (figura 2.). Es por ello la importancia de usarse como anticuerpos terapéuticos y por tal motivo fue el interés de humanizarlos.

Uno de los primeros aspectos para determinar si la estrategia utilizada sería funcional fue, comprobar *in silico* si el diseño 2-C10H sería soluble, utilizando el programa Proteína-Sol proporcionado por Alejandro Carballo. Este programa mide los parches positivos de la superficie de una proteína utilizando un archivo PDB. El valor positivo más alto en la superficie de la proteína es el que determina su solubilidad, en el caso que el valor sea mayor o igual a 1 la predicción será una proteína insoluble. En los valores menores a 1 la predicción será una proteína soluble. En el caso de la proteína 2-C10L, que se sabía que era soluble, tuvo un valor máximo  $pos=0.41$  lo que nos indica que es una proteína positiva. En el caso

del diseño humanizado 2-C10H, el valor máximo fue de  $\text{pos}=0.57$ , esto nos indica que el diseño es soluble pero sí hubo cambios en las cargas positivas debido a la modificación de aminoácidos para ser humanizado, aunque esto no modificó el reconocimiento por ELISA ni especificidad por Western Blot.

En la expresión en las células Top10 de los anticuerpos humanizados y no humanizados se observó que la clona 1-C7LI y su variante 1-C7H presentó baja expresividad, dando valores de 1mg por litro. En trabajos anteriores se observó este mismo comportamiento en el VHH 1-C7LI (Laboratorio Dra Meredith Gould). Este nivel bajo de expresión se podría mitigar optimizando los codones del gen 1-C7H, esto es necesario para tener la cantidad necesaria en caso de ser utilizado como anticuerpo terapéutico, ya que en anticuerpos terapéuticos utilizados como Rituximab (Mabthera®) se utilizan concentraciones de 10 mg/mL (McLaughlin et al., 1998) aunque éste es un anticuerpo convencional completo y por ende el número de copias sería menor al número de copias de un VHH a la misma concentración de proteínas.

En ensayo de ELISA corroboró que el anticuerpo 1-D8H no reconocía la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015, al contrario del anticuerpo 1-D8LI, que sí dio un resultado positivo. Esta variación pudo deberse a los cambios de aminoácidos que modificaron su reconocimiento. En el caso del anticuerpo 2-C10H se hicieron 9 cambios y el 1-D8H se le hicieron 14 cambios, los 5 cambios extra son aminoácidos que ya estaban presente en el anticuerpo 2-C10LI lo que deja una secuencia similar en los FR. Una posible solución sería sintetizar los tres CDRs del anticuerpo 1-D8LI con los cuatro FR del anticuerpo 2-C10H y determinar por ELISA si reconoce la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015.

En el ensayo de ELISA se determinó que el anticuerpo 1-C7H no reconoce a la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015, pero de misma forma el anticuerpo 1-C7LI no reconoce la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015. En un trabajo realizado en el Laboratorio Dra Meredith Gould se determinó que el VHH 1-C7LI no reconoce la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015 sino que reconoce la vacuna monovalente A/H1N1 Birmex 2009, esto deja sin determinar si el anticuerpo 1-C7H sigue manteniendo las propiedades funcionales del anticuerpo 1-C7LI.

En anticuerpo 2-C10H mantuvo las propiedades de reconocimiento y especificidad que presenta el anticuerpo 2-C10LI, esto puede indicar que presenta las mismas propiedades neutralizantes que el VHH no humanizado. En otros trabajos donde se realizó la humanización de VHH que neutraliza el virus de la Hepatitis C (HCV) (Jittavisutthikul et al., 2015) seguía manteniendo la capacidad de neutralizar el HCV. Incluso trabajos donde anticuerpos VHH humanizados neutralizaban actividad enzimática (Chavanayarn et al., 2012).

El anticuerpo 2-C10LI presentó un 15% de neutralización para el virus H1N1 A/California/07/2009 pdm y 45% de neutralización para el virus H1N1 A/Texas/48/2009 pdm, este porcentaje debe ser elevado para obtener un anticuerpo con mayor eficacia. En trabajos anteriores donde anticuerpos VHH con capacidad neutralizante hacia el virus de influenza A/H5N1, aumentaron su capacidad de neutralizar (Cardoso et al., 2014). Esto se logró utilizando dos estrategias que consistían en hacer VHH diméricos unidos por un linker, o unir un fragmento FC al VHH neutralizante. Estas dos estrategias aumentaron significativamente la capacidad de neutralización hacia el virus de influenza A/H5N1 (Cardoso et al., 2014). Por lo tanto una estrategia a seguir para aumentar la capacidad de

neutralización del anticuerpo humanizado sería hacer diméricos del anticuerpo 2-C10H y/o unir el anticuerpo 2-C10H a un fragmento FC de humano.

La proteína 2-C10mWasabi presentó una disminución de reconocimiento de la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015, lo que nos sugiere que pudo ser debido al cambio del extremo C-terminal al N-terminal de la etiqueta de His6. Esto pudo haber ocasionado dos cosas: 1) La etiqueta His6 interfiere en la unión al epítoto. 2) La unión al epítoto interfiere el reconocimiento del anti-His a la etiqueta His6. En trabajos anteriores en los que se unió un VHH a la proteína EGFP, se observó que no hubo disminución de reconocimiento al antígeno (Tengfei Li, 2012), pero en ese trabajo la etiqueta His6 se encontraba en el extremo C-terminal del VHH utilizado, por lo tanto puede ser la razón de la disminución del reconocimiento a la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015.

## **IX. CONCLUSIONES.**

1. Se diseñaron, con el programa Swiss-PdbViewer4.1.0, tres VHH humanizados (2-C10H, 1-D8H y 1-C7H).
2. Los VHH humanizados 2-C10H, 1-D8H y 1-C7H fueron clonados en el vector pComb3x y su expresión en E.coli fue de 4.0 mg, 0.8mg y 0.38 mg en 250 mL de medio de cultivo.
3. El anticuerpo humanizado 2-C10H mantuvo su reconocimiento a la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015 y su especificidad a HA, verificado por ELISA y Western Blot, sin embargo, el anticuerpo 1-D8H perdió reconocimiento a la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015. En el caso del anticuerpo 1-C7H no reconoció a la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015 pero no se probó si afectó su reconocimiento y especificidad la vacuna monovalente A/H1N1 Birmex 2009.
4. El VHH 2-C10 fue unido al gen mWasabi y clonado en el vector de expresión pNCS.
5. El anticuerpo fluorescente 2-C10mWasabi fue expresado y purificado exitosamente en E.coli.

6. El VHH fluorescente 2-C10mWasabi perdió reconocimiento a la vacuna trivalente VAXIGRIP 2014-2015 verificado por ELISA pero mantuvo su especificidad a la molécula HA /California/07/2009, verificado por Western Blot.

## X. REFERENCIAS.

- ABUL K. ABBAS, M., ANDREW H. H. LICHTMAN, MD, PHD AND SHIV PILLAI, MBBS, PHD 2003. *Cellular and Molecular Immunology*.
- BARBAS, C. F., BURTON, D. R., SCOTT, J. K. & SILVERMAN, G. J. 2001. PHAGE DISPLAY, 2001. *Phage Display*.
- CARDOSO, F. M., IBANEZ, L. I., VAN DEN HOECKE, S., DE BAETS, S., SMET, A., ROOSE, K., SCHEPENS, B., DESCAMPS, F. J., FIERS, W., MUYLDERMANS, S., DEPICKER, A. & SAELENS, X. 2014. Single-domain antibodies targeting neuraminidase protect against an H5N1 influenza virus challenge. *J Virol*, 88, 8278-96.
- CÉCILE VINCKE, R. L., DIRK SAERENS, SERGIO MARTINEZ-RODRIGUEZ, SERGE MUYLDERMANS AND KATJA CONRATH 2008. General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold.
- CHAVANAYARN, C., THANONGSAKRIKUL, J., THUENG-IN, K., BANGPHOOMI, K., SOOKRUNG, N. & CHAICUMPA, W. 2012. Humanized-single domain antibodies (VH/VHH) that bound specifically to Naja kaouthia phospholipase A2 and neutralized the enzymatic activity. *Toxins (Basel)*, 4, 554-67.
- DESMYTER A1, T. T., GHAHROUDI MA, THI MH, POORTMANS F, HAMERS R, MUYLDERMANS S, WYNS L. 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme.
- ELENA FESHCHENKO, D. G. R., RACHAEL FELBERBAUM, CLIFTON MCPHERSON, JOSEPH A RININGER, PENNY POST & COX, A. M. M. 2012. Pandemic influenza vaccine: characterization of A/California/07/2009 (H1N1) recombinant hemagglutinin protein and insights into H1N1 antigen stability.
- FLAJNIK, M. F., DESCHACHT, N. & MUYLDERMANS, S. 2011. A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? *PLoS Biol*, 9, e1001120.
- GEMA RUIZ, M. M., MARTA LÓPEZ & VEGA., M. 2007. Anticuerpos monoclonales terapéuticos.
- GODÍNEZ, G. M. 2011. recordando a la gripe española. *Medicina Interna de México*.
- HAMERS-CASTERMAN, C., ATARHOUCHE, T., MUYLDERMANS, S., ROBINSON, G., HAMERS, C., SONGA, E. B., BENDAHMAN, N. & HAMERS, R. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363, 446-8.
- HARMSSEN, M., BLOKKER, J., PRITZ-VERSCHUREN, S., BARTELINK, W., VAN DER BURG, H. & KOCH, G. 2013. Isolation of Panels of Llama Single-Domain Antibody Fragments Binding All Nine Neuraminidase Subtypes of Influenza A Virus. *Antibodies*, 2, 168-192.
- HARMSSEN, M. M. 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 13-22.
- JITTAVISUTTHIKUL, S., THANONGSAKRIKUL, J., THUENG-IN, K., CHULANETRA, M., SRIMANOTE, P., SEESUAY, W., MALIK, A. A. & CHAICUMPA, W. 2015. Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication. *Viruses*, 7, 2030-56.
- LAUWEREYS, M., ARBABI GHAHROUDI, M., DESMYTER, A., KINNE, J., HOLZER, W., DE GENST, E., WYNS, L. & MUYLDERMANS, S. 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*, 17, 3512-20.
- MCLAUGHLIN, A J GRILLO-LÓPEZ, B K LINK, R LEVY, M S CZUCZMAN, M E WILLIAMS, M R HEYMAN, I BENICE-BRUCKLER, C A WHITE, F CABANILLAS, V JAIN, A D HO, J LISTER, K WEY, AND, D. S.

& DALLAIRE, B. K. 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program.

- MEDINA, R. A., MANICASSAMY, B., STERTZ, S., SEIBERT, C. W., HAI, R., BELSHE, R. B., FREY, S. E., BASLER, C. F., PALESE, P. & GARCIA-SASTRE, A. 2010. Pandemic 2009 H1N1 vaccine protects against 1918 Spanish influenza virus. *Nat Commun*, 1, 28.
- OMS. 2016. *¿Qué es el virus gripal A (H1N1) 2009 pandémico?* [Online].
- R G WEBSTER, W. J. B., O T GORMAN, T M CHAMBERS, AND Y KAWAOKA 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses.
- TENGFEI LI, J.-P. B., SUSANNA CELLI†, FABIENNE GLACIAL,, ANNE-MARIE LE SOURD†, SALAH MECHERİŞ, BABELLE WEKSLER††, IGNACIO ROMERO, PIERRE-OLIVIER COURAUD,, FRANÇOIS ROUGEO AND PIERRE LAFAYE, 2012. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging.
- WARD ES1, G. D., GRIFFITHS AD, JONES PT, WINTER G. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*.
- WESOLOWSKI, J., ALZOGARAY, V., REYELT, J., UNGER, M., JUAREZ, K., URRUTIA, M., CAUERHFF, A., DANQUAH, W., RISSIEK, B., SCHEUPLEIN, F., SCHWARZ, N., ADRIOUCH, S., BOYER, O., SEMAN, M., LICEA, A., SERREZE, D. V., GOLDBAUM, F. A., HAAG, F. & KOCH-NOLTE, F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical microbiology and immunology*, 198, 157-174.