

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE MARINAS

POSGRADO DE ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA



“ANTICUERPOS DE TIBURON DE DOMINIO SENCILLO Y QUIMERIZADO
NEUTRALIZANTES DE CITOCINAS HUMANAS”

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el
grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

TANYA AMANDA CAMACHO VILLEGAS

ENSENADA B. C. A 14 DE DICIEMBRE DE 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS
POSGRADO DE ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

**Anticuerpos de dominio sencillo y quimérico de tiburón
neutralizantes de citocinas humanas**

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA

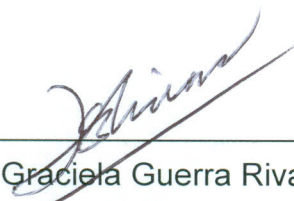
Tanya Amanda Camacho Villegas

APROBADA POR



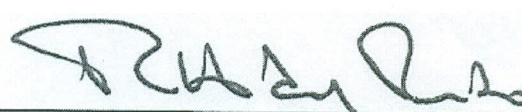
Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro

Director de tesis



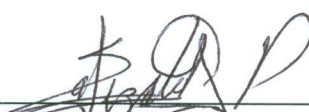
Dra. Graciela Guerra Rivas

Sinodal



Dr. Rogelio Hernández Pando

Sinodal



Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Sinodal



Dra. Maria Teresa Viana Castrillón

Sinodal

RESUMEN de la tesis de **Tanya Amanda Camacho Villegas**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 14 de Diciembre de 2012.

ANTICUERPOS DE DOMINIO SENCILLO Y QUIMERICO DE TIBURON NEUTRALIZANTES DE CITOCINAS HUMANAS

La identificación de fragmentos de anticuerpos capaces de unirse al antígeno, ha progresado de moléculas recombinantes Fab (fragmento de unión al antígeno) y scFv (fragmento variable de cadena sencilla) a dominios sencillos de unión a proteínas basados en inmunoglobulinas de dominios tipo V_H (variable pesado), ofreciendo el desarrollo de nuevas estrategias immuno-terapéuticas e immuno-diagnósticas. La mimetización de los fragmentos de unión al antígeno a dominios más pequeños ofrece la ventaja de incrementar la estabilidad y la posibilidad de acceso a epítopos antigénicos que no son reconocidos por anticuerpos convencionales. Partiendo de anticuerpos de dominio sencillo de tiburón, y empleando bibliotecas no inmunes e inmunes se han aislado diversos vNAR con capacidad de reconocimiento a una gran variedad de proteínas de diversos orígenes. Las citocinas son proteínas producidas por células principalmente del sistema inmunológico, y regulan la proliferación celular, diferenciación celular, quimiotaxis, efectos pro inflamatorios y/o anti inflamatorios. Cuando citocinas como $TNF\alpha$ y $TGF\beta$ se encuentran desreguladas se desarrollan patologías autoinmunes o neoplásicas respectivamente.

En ese trabajo se logró obtener un dominio sencillo vNAR con capacidad de neutralización de la citocina $TNF\alpha$ que fue usado como base para generar un anticuerpo quimérico (T43ch) demostrando, ambos formatos la capacidad neutralizante *in vitro*. Se logró obtener un dominio sencillo vNAR capaz de

reconocer TGF β en sus tres isoformas (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3) y neutralizar dos de ellas en ensayos *in vitro* (TGF β 1, TGF β 2).

En ensayos preliminares de toxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*, no se detectó efecto nocivo del dominio sencillo evaluado. La producción de los vNAR se realizó una fermentación en lote agitado obteniendo rendimiento de 3.3 mg/L del anticuerpo quimérico y 10 mg/L respectivamente haciendo necesaria la estandarización de las condiciones de producción bajo este sistema.

Palabras clave: vNAR, *Heterodontus francisci*, TNF α , TGF β , neutralización, bioreactores

ABSTRACT of the thesis presented by **Tanya Amanda Camacho Villegas** as a partial requirement to obtain the **DOCTOR OF SCIENCES IN MOLECULAR ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. December 14th, 2012.

SINGLE DOMAIN AND CHIMERIC SHARK ANTIBODIES NEUTRALIZING HUMAN CYTOKINES

The identification of small antibody fragments capable to join antigen its being progress from recombinant Fab (fragment antibody) and scFv (single chain variable fragment) to single domains based on V_H immunoglobulin's (variable heavy), promising the develop of new immune-therapeutic and immune-diagnoses strategies. The mimetic of Fab to smallest domains offer the advantage to increase stability and possible access to another epitopes that are not recognized by conventional antibodies. Starting from single domains shark antibodies, from non-immune and immune libraries, it's being isolated vNAR's whit capability to recognized wide variety of proteins from diverse origins. Cytokines are proteins produced mainly in immune cells they function is based on regulated chemotaxis, cell proliferation and differentiation, pro or anti-inflammatory effects. When cytokines like TNF α y TGF β are deregulated the human developed certain pathologies like autoimmune or neoplastic diseases respectively.

In this work we isolated a vNAR single domain with capability to neutralize TNF α and then modified into chimeric antibody, demonstrate tha bout formats are capable to neutralize in vitro this cytokine. We obtain a single domain vNAR capable to recognize the three isoforms of TGF β bans neutralized two of them on in vitro assays. In preliminary in vitro and in vivo toxicity assays we don't detect

toxic effect of the evaluated single domain. The production of vNAR it is performed under fermentation of batch stirred tank obtaining 3.3 mg/L of chimeric antibody and 10 mg/L of the single domain, making necessary the method standardization to produce vNAR under these system.

Keywords: vNAR, *Heterodotus francisci*, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, neutralization, bioreactor.

A Paulo y Pavel, por ser mi motor, los amo profundamente...

El presente trabajo fue realizado en parte en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Departamento de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) bajo la dirección del Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro. Los Bioprocesos fueron realizados en la Planta Piloto de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Mauricio Trujillo Roldán. Los ensayos de neutralización de la citocina $TNF\alpha$ se realizaron en Laboratorio SILANES, bajo la asesoría de la Dra. Teresa Mata González. Los ensayos de neutralización de la citocina $TGF\beta$ se realizaron en el Laboratorio de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Fernando López Casillas.

Durante la realización de este proyecto, se contó con beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de tesis Dr. Alexei F. Licea Navarro, por su ayuda y apoyo durante la realización de este trabajo, en las estancias y la generación de conocimiento en los últimos ocho años.

A mi comité de tesis: Dra. Graciela Guerra Rivas, Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dra. Teresa Viana Castrillón, Dr. Rogelio Hernández Pando, por su invaluable apoyo durante mis avances de tesis, y por ayudar a delimitar los alcances de esta tesis.

A la Dra. Teresa Mata González, por siempre apoyarme inclusive más allá de sus compromisos, por ser además de "sinodal honoraria", ser mi amiga.

Al Dr. Mauricio Trujillo Roldan, por darme la oportunidad, el apoyo y la confianza para hacer uso de las instalaciones de la Planta Piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A la Dra. Adriana Valdez por sus consejos y su entusiasta apoyo para llevar a cabo mi estancia en la UNAM.

Al Dr. Fernando López Casillas por permitirme realizar los ensayos de neutralización de la citocina TGF β en su laboratorio.

Al apoyo técnico recibido por parte de la Dra. Edna Sánchez, MC. Ramsés García, MC. Valentín Mendoza y Lic. Linda Núñez.

Al apoyo recibido por Angélica Arce para llevar a cabo todos los trámites requeridos durante mi doctorado y por sus asesorías constantes.

Al personal de la División de Biología Experimental y Aplicada (CICESE), Lupita Martínez y Viviana Olono, por su apoyo en la realización de trámites y becas.

A Yolanda Rivas (CICESE) por su ayuda siempre continua.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a Pavel, mi esposo y mejor amigo, por emprender conmigo este camino y por acompañarme en esta nueva aventura al lado de Paulo Darío. Definitivamente me haces feliz. Gracias.

A mis padres Joaquín y Angelina, a mis hermanas Olessya y Celia Yleana, por siempre ser incondicionales, por formar parte de mis alegrías y por amar a Pavel y Paulo, por ser mi familia, no los cambiaría por nada!!

A mis amigos, por las charlas, la convivencia llena de risas, las palabras de apoyo y de desesperación! Por escuchar siempre. Gracias, Dinora, Félix, Ana Bertha, Jairo, Iván "mi cuñis", Ángel (Angelópolis), Rosalía, Mandy, Pilar "Pilarica", Elia, Yoli Rivas, Ramsés "el Ramsi", Héctor "Dexter", Daniel, Tere Mata, Hilda "chaparrita" Vázquez, Abigail y Abelardo, etc.

A Félix Olivares, "El ayer es historia, el mañana es un misterio pero el hoy es un obsequio, por eso se llama presente".

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas, por las vivencias del día a día que nunca son iguales y siempre son divertidas.

A la tía Alex y toda su familia, por dejarme entrar en su hogar durante tantos meses y siempre tratarme como familia, por las largas charlas y las caminatas, por mostrarme lo hermoso del DF.

A toda los miembros de la Planta Piloto de la UNAM, conocí a grandes personas, y las llevo conmigo en la memoria y en mi corazón.

CONTENIDO

Resumen	i
Abstract	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vii
Contenido	ix
Lista de Figuras	xv
Lista de Tablas	xviii

CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1 Estructura y función de los anticuerpos	1
I.2 Descripción de la técnica de despliegue en fagos	2
I.3 Ingeniería de anticuerpos	3
I.4 Anticuerpos IgNAR	6
II. ANTECEDENTES	8
II.1 Bibliotecas de anticuerpos vNAR	8
III. OBJETIVO GENERAL	10
III.1 Objetivos Específicos	10

CAPITULO II

**Aislamiento de un dominio sencillo vNAR de tiburón neutralizante de $\text{TNF}\alpha$.
 Generación y clonación en *Pichia pastoris* de un anticuerpo quimérico
 (vNAR, región bisagra y región CH2 de la IgG1 humana**

IV. INTRODUCCION	11
IV.1 Descripción del Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$)	11
IV.2 Anticuerpos comerciales neutralizantes de $\text{TNF}\alpha$	13
IV.3 Sistemas de expresión recombinante de anticuerpos:	

Escherichia coli y *Pichia pastoris*

16

CONTENIDO (continuación)

IV.2 MATERIALES Y METODO	20
IV.2.1 Optimización del gen vnaR <i>t43</i> para <i>Pichia pastoris</i>	20
IV.2.2 Diseño del gen quimérico <i>t43/región bisagra/ch2</i>	21
IV.2.3 Clonación del gen quimérico <i>t43ch</i> en <i>Pichia pastoris</i>	21
IV.2.4 Transformación en <i>E. coli</i> de la ligación pPICZαA-T43ch	22
IV.2.5 Transformación en <i>P. pastoris</i> (X-33)	23
IV.2.6 Bioproceso de producción de anticuerpo quimérico T43ch	24
IV.2.6.1 Desarrollo de inóculos	24
IV.2.6.2 Descripción del Bioreactor	25
IV.2.6.2.1 Biocontrolador	25
IV.2.6.2.2 Bioconsola	25
IV.2.6.2.3 Sistema de computo	26
IV.2.7 Preparación del bioreactor e instalación	26
IV.2.8 Condiciones de cultivo en bioreactor	26
IV.2.9 Obtención y purificación de anticuerpo T43ch producido en bioreactor	28
IV.2.10 Análisis de la producción del anticuerpo quimérico	28
IV.2.10.1 Preparación de muestras	28
IV.2.10.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (Glicina-SDS-PAGE)	28
IV.2.10.3 Inmunodetección de T43ch producido en bioreactor (Western blot)	29
IV.2.11 ELISA de reconocimiento de TNFα usando medio de cultivo obtenido durante el bioproceso	29
IV.2.12 Bioensayos de neutralización <i>in vitro</i> empleando el anticuerpo quimérico T43ch	30
IV.2.12.1 Ensayos de citotoxicidad de TNFα en células L929	30
IV.2.12.2 Ensayos de neutralización de TNF-α con el anticuerpo quimérico T43ch empleando células L929	31
V.1 RESULTADOS	32
V.1.1 Artículo "Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from	

<i>Heterodontus francisci</i> shark: a potential therapeutic use"	32
---	----

CONTENIDO (continuación)

V.1.2 Optimización del uso de condones del gen <i>t43</i> para <i>P. pastoris</i>	47
V.1.3 Diseño del gen T43ch	48
V.1.4 Clonación del gen <i>t43ch</i> en el vector pPICZ α A	49
V.1.5 Bioproceso de producción del anticuerpo quimérico T43ch en lote agitado	51
V.1.6 Geles de poliacrilamida desnaturalizante SDS-PAGE	53
V.1.7 Inmunodetección por WB y cuantificación de proteína	54
V.1.8 ELISA de sobrenadante durante el bioproceso	56
V.1.9 Ensayo de citotoxicidad de TNF α en células L929	57
V.1.10 Ensayo de neutralización de TNF α empleando el anticuerpo T43ch	58
VI.1 DISCUSIONES	59

CAPITULO III

Obtención de anticuerpos de dominio sencillo neutralizantes de la citocina humana TGF β

VII.1 INTRODUCCION	63
VII.1.1 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)	63
VII.1.2 Ruta de señalización	65
VII.2 MATERIALES Y METODO	67
VII.2.1 Re-amplificación de la Biblioteca No Inmune	67
VII.2.2 Rondas de selección contra la citocina TGF β empleando una biblioteca no inmune	68
VII.2.3 Búsqueda de clonas positivas por PCR al fragmento de dominio sencillo vNAR	69
VII.2.3.1 PCR de colonia	69
VII.2.3.2 Aislamiento de plásmido	71
VII.2.3.3 Secuenciación de plásmidos	71
VII.2.4 Expresión de fragmentos de dominio sencillo vNAR	71

VII.2.5 Extracción periplásmica de proteína vNAR	72
CONTENIDO (continuación)	
VII.2.6 ELISA de expresión	72
VII.2.7 ELISA de reconocimiento citocina – vNAR	72
VII.2.8 Purificación de anticuerpo vNAR por cromatografía de afinidad a metales	73
VII.2.9 Análisis de proteína recombinante vNAR expresada en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	74
VII.2.9.1 Preparación de las muestras	74
VII.2.9.2 Geles desnaturizantes de poliacrilamida	75
VII.2.9.3 Cuantificación de anticuerpo empleando ácido bicinonínico	74
VII.2.10 Bioproceso de producción en lote agitado de un dominio sencillo de tiburón neutralizante de la citocina humana TGF β , expresado en <i>Escherichia coli</i>	75
VII.2.10.1 Desarrollo de inóculos	75
VII.2.10.2 Descripción del Bioreactor	75
VII.2.10.3 Biocontrolador	76
VII.2.10.4 Bioconsola	76
VII.2.10.5 Sistema de computo	76
VII.2.10.6 Preparación del bioreactor e instalación	76
VII.2.10.7 Condiciones de cultivo en bioreactor	77
VII.2.11 Obtención y purificación de anticuerpo vNAR producido en bioreactor	77
VII.2.12 Análisis de anticuerpo de dominio sencillo vNAR producido en bioreactor	79
VII.2.12.1 Geles desnaturizante de poliacrilamida de anticuerpo T-1 producido en bioreactor de lote agitado y diálisis	79
VII.2.12.2 Cuantificación de anticuerpo T-1 producido en bioreactores	79
VII.2.12.3 Electrotransferencia (western blot) de anticuerpo vNAR anti-TGF β expresado en bioreactor	79

CONTENIDO (continuación)

VII.2.12.4 ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR contra las isoformas de la citocina TGF β	80
VII.2.13 Ensayos de neutralización <i>in vitro</i> de las isoformas TGF β 1 y TGF β 2, empleando el vNAR purificado	81
VII.2.13.1 Ensayo del gen reportero luciferasa	81
VII.2.13.2 Transfección por el método DEAE-Dextran	81
VII.2.13.3 Ensayo de luciferasa	82
VII.2.14 Ensayos preliminares de toxicidad del anticuerpo vNAR neutralizante de TGF β	84
VII.2.14.1 Inyección de ratones Wt con anticuerpo de dominio sencillo vNAR	84
VII.2.14.2 ELISA de reconocimiento empleando el vNAR anti-TGF β como antígeno con los sueros de ratones Wt	84
VII.2.14.3 Ensayo de citotoxicidad empleando cultivos primarios de hepatocitos	85
VII.3 RESULTADOS	87
VII.3.1 Selección de vNAR específicos contra la citocina TGF β 1	87
VII.3.2 Búsqueda de colonias positivas a inserto por PCR	88
VII.3.3 Análisis de secuencias proteicas procedentes de colonias aisladas de la ronda 3	89
VII.3.4 ELISA de expresión de anticuerpo vNAR anti-TGF β	90
VII.3.5 ELISA de reconocimiento	91
VII.3.6 Purificación de anticuerpo vNAR T-1	92
VII.3.7 Análisis del anticuerpo vNAR T-1	92
VII.3.7.1 Análisis en gel de SDS-PAGE al 12% del anticuerpo T-1 purificado	92
VII.3.7.2 Cuantificación de proteína, expresión pequeña escala	93
VII.3.8 Bioproceso de producción de anticuerpo T-1 en lote agitado de 15 L	93
VII.3.8a Cinética de crecimiento <i>E. coli</i> BL21(DE3) que expresa el anticuerpo T-1	93

CONTENIDO (continuación)

VII.3.9 Análisis de anticuerpo de dominio sencillo vNAR producido en bioreactor	96
VII.3.9.1 Purificación del anticuerpo T-1 producido en bioreactor	96
VII.3.9.2 Western blot de T-1	97
VII.3.9.3 Cuantificación de proteína T-1 purificada producida en bioreactor	97
VII.3.9.4 ELISA de reconocimiento a las isoformas de TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 por el vNAR T-1	98
VII.3.10 Ensayo de neutralización <i>in vitro</i> de las isoformas TGF β 1 y TGF β 2 empleando el anticuerpo T-1	99
VII.3.11 Ensayo preliminar de toxicidad de T-1 en ratones <i>Wt</i>	103
VII.3.12 Ensayo preliminar de citotoxicidad de T-1 <i>in vitro</i> empleando cultivo primario de hígado aislados de ratones <i>Wt</i>	104
VII.4 DISCUSIONES	106
 CAPITULO IV	
VIII.1 CONCLUSIONES GENERALES	113
IX. PERSPECTIVAS	115
X. LITERATURA CITADA	116
XI. SOLICITUD DE PATENTE	125
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Modelo tridimensional de las Inmunoglobulinas convencionales	1
2. Representación esquemática del fago filamentoso M13	3
3. Evolución del desarrollo de anticuerpos terapéuticos	4
4. Comparación entre inmunoglobulinas convencionales y de cadena pesada	5
5. Representación esquemática de isoformas de inmunoglobulinas secretadas y transmembranales de peces cartilaginosos	6
6. Estructura de $\text{TNF}\alpha$, homotrímero de 51 kDa	12
7. Esquema de las cinco moléculas anti $\text{TNF}\alpha$	16
8. Rutas metabólicas del metanol en levaduras metilotróficas	18
9. Vector de clonación y expresión pPICZ α A de 3.6 kb	19
10. Comparación entre las secuencias de los genes T43 (vNAR nativo) y T43P (vNAR con codones optimizados para <i>P. pastoris</i>)	47
11. Secuencia de proteína del anticuerpo quimérico T43ch	48
12. Amplificación de fragmentos y digestión para clonar en pPICZ α A	49
13. Alineamiento de proteína teórica y de la colonia positiva a inserto	50
14. Curva de crecimiento inducción 7 L <i>Pichia pastoris</i>	52
15. Gráficas de monitoreo de las condiciones físicas en la inducción de 10L <i>Pichia pastoris</i>	53
16. SDS-PAGE proteína T43ch	54
17. Western blot anticuerpo T43ch purificado	55
18. ELISA de reconocimiento contra $\text{TNF}\alpha$ usando medio de cultivo tomado del bioreactor	56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
19. Curva de citotoxicidad de $\text{TNF}\alpha$ en células L929	57
20. Curva de neutralización de 3ED_{50} (1.8 ng/mL) de $\text{rhTNF}\alpha$ en células L929	58
21. Representación de la citocina $\text{TGF}\beta 1$	64
22. Rondas de selección empleando despliegue en fagos usando una biblioteca no inmune del tiburón <i>Heterodontus francisci</i>	87
23. PCR de colonia, Gel agarosa 1.8% teñido con bromuro de etidio	88
24. Alineamiento de secuencias de proteína vNAR aisladas contra la citocina $\text{TGF}\beta 1$	88
25. ELISA de expresión de las clonas T-1, T-20 y T-28	89
26. ELISA de reconocimiento $\text{TGF}\beta$	90
27. Gel desnaturalizante de poliacrilamida 12%, purificación de anticuerpo T-1	91
28. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21(DE3), en bioreactor de lote agitado	94
29. Condiciones físicas del bioreactor. Inducción de 10L, medio SB cepa BL21 (DE3) productora de T-1	95
30. Gel 12% SDS-PAGE. Anticuerpo vNAR T-1 producido en bioreactor	96
31. Western blot. vNAR purificado y extraído de la clona T-1	97
32. ELISA de reconocimiento vNAR T-1 con las isoformas de $\text{TGF}\beta$	98
33. Ensayo de luciferasa $\text{TGF}\beta 1$	100
34. Ensayo de luciferasa $\text{TGF}\beta 2$	102

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Página
35. Ensayo preliminar de toxicidad del vNAR T-1 en ratones silvestres	104
36. Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos	105

LISTA DE TABLAS

	Página
I Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR	23
II Condiciones de PCR para amplificar el gen quimérico T43ch	23
III Oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos vNAR clonados en el vector pCOMb3X	71
IV Condiciones de PCR para amplificar fragmentos vNAR de colonia	71

CAPITULO I

Introducción General

I.1 Estructura y función de los anticuerpos.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (IgG) convencionales, se componen de un tetrámero unido por enlaces disulfuro, que comprende dos unidades idénticas llamadas cadenas pesadas de alrededor de 50 kDa y dos cadenas ligeras de 25 kDa. En el caso de las IgG, cada cadena pesada consta de cuatro dominios, uno variable (V_H) y tres constantes denominados CH. Estos componentes son específicos al tipo de inmunoglobulina, además de estar relacionados con efectos de citotoxicidad, fijación del complemento y estabilidad en el suero (Ghetie y Ward, 2000). EL sitio de unión al antígeno está compuesto de dos dominios, uno ligero y uno pesado, (V_L y V_H), y están unidos a la región constante pesada por un dominio constante ligero que también es específico de cada tipo de anticuerpo (Figura 1). Esta estructura simétrica de las inmunoglobulinas ha sido la clave central del desarrollo e ingeniería genética de anticuerpos por los últimos 25 años, pues ha permitido la generación de diversos formatos de anticuerpo, expandiendo el desarrollo y comercialización de anticuerpos como agentes terapéuticos.

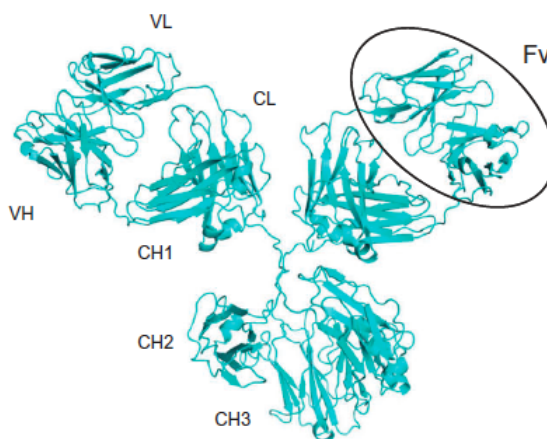


Figura 1. Modelo tridimensional de las Inmunoglobulinas convencionales. Homodímero compuesto por dos cadenas pesadas constantes y dos cadenas ligeras variables. La interacción de V_H y V_L forman el sitio de unión al antígeno (Modificado de Campbell et al. 2010).

Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B activados, y se encuentran unidos a membrana o de forma soluble. Representan la fase efectora de la respuesta inmune humoral. En la fase efectora de la respuesta inmune adaptativa, los anticuerpos secretados se unen al antígeno y despiertan varias respuestas efectoras para eliminar al antígeno, neutralizarlos y marcarlos para que sean eliminados; ya sea promoviendo la fagocitosis o despertando la respuesta de mediadores inflamatorios (Abbas y Lichman, 2004).

I.2 Descripción de la técnica de despliegue en fagos

El despliegue en bacteriófagos es una técnica de selección *in vitro* de proteínas o péptidos que permite identificar y aislar un polipéptido con características deseadas de un repertorio de millones de variantes. Se basa en la fusión de un gen codificante de una proteína en el genoma del fago, resultando en la expresión de la proteína deseada en su superficie, lo que permite generar repertorios o bibliotecas que pueden ser sujetos a pasos de selección y recuperación de clones que se pueden identificar por secuenciación y finalmente pasar de un huésped bacteriano a otro, para su expresión como proteína soluble.

Los fagos filamentosos presentan versatilidad como vehículos de clonación y para desplegar proteínas (Figura 2). Su genoma es pequeño, toleran inserciones de genes en regiones no esenciales, lo que permite generar de manera relativamente sencilla, bibliotecas de las cuales se pueden aislar cadenas simples y dobles de ADN; permiten obtener un alto número de copias de fagos, ya que su replicación no elimina a los hospederos y finalmente, son estables en un amplio rango de condiciones de selección, lo que implica mayores posibilidades de obtener una proteína con las capacidades deseadas (McCafferty et al. 1990). La generación de anticuerpos recombinantes de origen humano y su uso como agentes terapéuticos inició su desarrollo con tecnologías alternativas, como el despliegue en fagos (McCafferty et al, 1990) que permitió la expresión heteróloga de anticuerpos o fragmentos en bacterias.

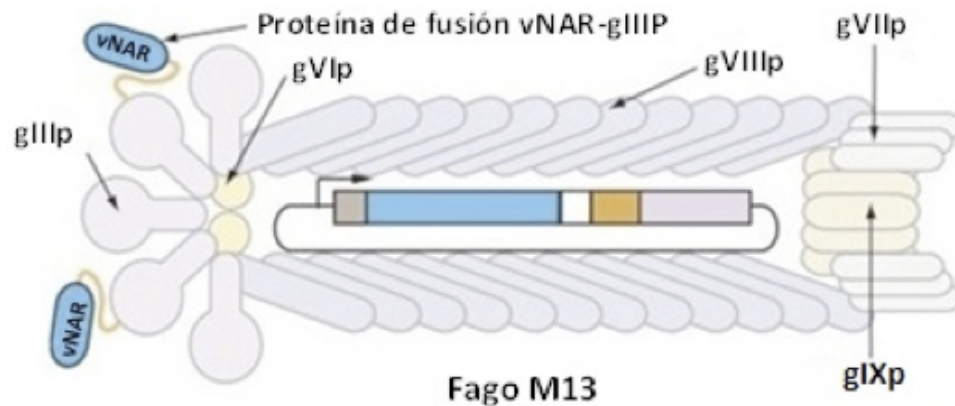


Figura 2. Representación esquemática del fago filamentoso M13. Se muestran las proteínas que componen la cápside del fago y el despliegue de sdAb (anticuerpos de dominio sencillo) tipo vNAR o VHH en su superficie (Modificado de Wesolowski et al. 2009).

I.3 Ingeniería genética de anticuerpos.

El uso de los anticuerpos convencionales como agentes terapéuticos a llevado a la industria farmacéutica a buscar la reducción del tamaño, a realizar hacer modificaciones como quimerización y humanización (Figura 3), o a la generación de fragmentos funcionales como: los fragmentos variables de cadena sencilla (ScFv de ~15 kDa) o los fragmentos de anticuerpo (Fab de ~60 kDa).

Mediante la modificación de anticuerpos de ratón utilizando técnicas de biología molecular y empleando la técnica de hibridoma, Boulianne y colaboradores en 1984 permutaron aminoácidos y dominios constantes por aquellos que fueran funcionales en humanos, dando pie a la disminución de la inmunogenicidad de estas moléculas, generando los llamados anticuerpos “quiméricos”. Ejemplo de ello, es el fármaco Infliximab, aprobado por la FDA en 1999 y empleado en el tratamiento de la artritis reumatoide; siendo de los primeros anticuerpos de este tipo en salir a la venta.

Las modificaciones en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) llevadas a cabo por Winter y colaboradores en 2000, fueron las bases para el desarrollo de los anticuerpos “humanizados”, donde solamente se mantienen aminoácidos murinos en los CDR’s y el resto del anticuerpo corresponde a

inmunoglobulina humana. Ejemplo de ello son los fármacos, Tocilizumab anti-IL-6 (Nishimoto y Kishimoto, 2008), Tastuzumab y Bevacizumab que se emplean en tratamientos oncológicos; Omalizumab para asma y Natalizumab para tratamiento de esclerosis múltiple.

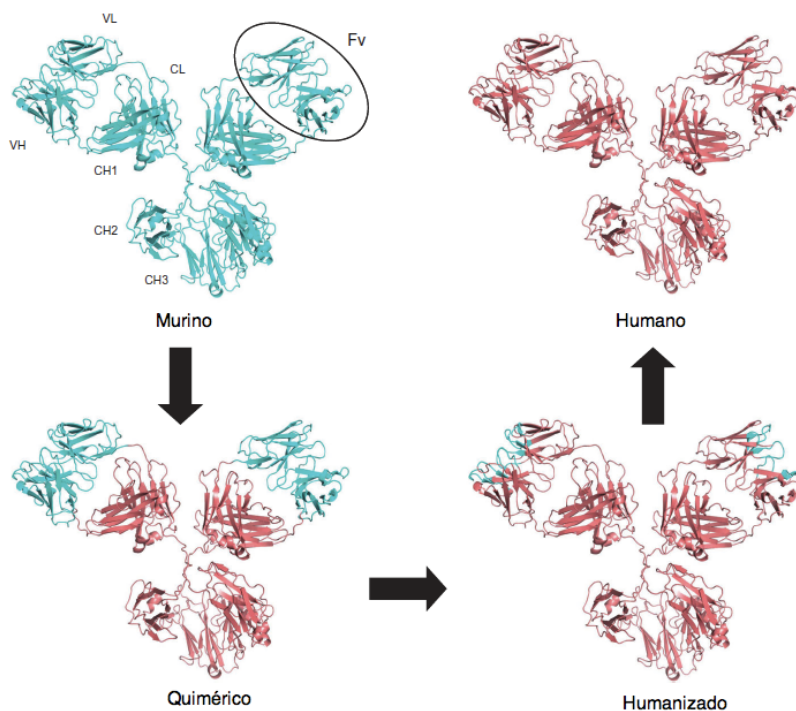


Figura 3. Evolución del desarrollo de anticuerpos terapéuticos. Los anticuerpos quiméricos, están generados por un Fab fusionado genéticamente con la región Fc de humano. Los anticuerpos humanizados, están generados por las regiones determinantes de complementariedad (CDR's) de murino que se insertan en anticuerpo humanos (Modificado de Campbell et al. 2010).

A diferencia de los anticuerpos convencionales, en camélidos se han encontrado anticuerpos que carecen de cadena ligera y además del dominio constante pesado 1 (C_H1), teniendo un peso molecular de ~95 kDa (Riechmann y Muyldermans, 1999). En los elasmobranquios como el tiburón *Ginglymostoma cirratum*, también se ha reportado la presencia de inmunoglobulinas compuestas solamente por cadenas pesadas (cinco dominios constantes pesados) y un fragmento variable pesado (V_H) (Greenberg et al. 1995). Estos anticuerpos no convencionales se denominaron IgNAR (nuevo receptor de antígeno). Los fragmentos variables pesados de ambos anticuerpos no convencionales (camélidos y tiburón) tienen un peso molecular de 12-15 kDa y se denominan de forma general como anticuerpos de dominio sencillo (sdAbs) (Figura 4).

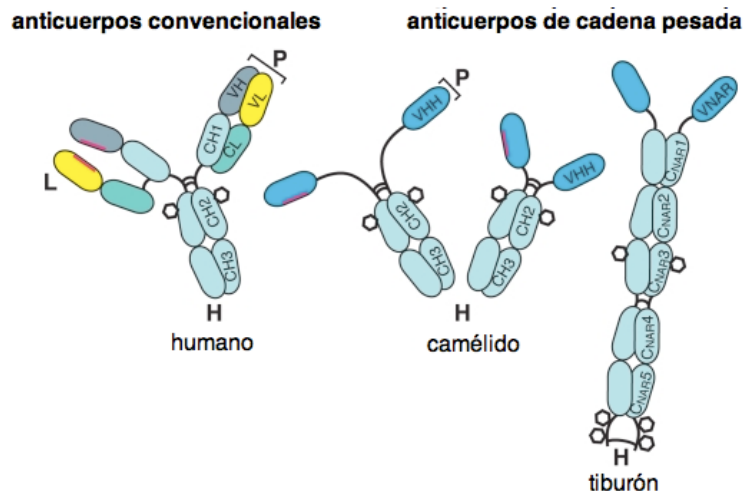


Figura 4. Comparación entre inmunoglobulinas convencionales y de cadena pesada. a) IgG humana, compuesta de tres dominios constantes pesados y dos cadenas pesadas variables y dos cadenas ligeras variables b) Ig de camélidos, consta de dos regiones constantes y sus dominios sencillos; c) IgNAR, tiene dos cadenas pesadas, con cinco regiones constantes y una región variable pesada (Modificado de Wesolowski et al. 2009).

I.4 Anticuerpos IgNAR.

Hace aproximadamente 450 millones de años (Streltsov et al. 2004), divergieron en los vertebrados, los componentes principales del sistema inmune adaptativo son: anticuerpos, receptores de células T y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I y II (Rumfelt et al., 2004).

En peces cartilaginosos, se han descrito la presencia de anticuerpos que presentan dominios variables en las cadenas pesadas y ligeras V_H/V_L (Streltsov et al., 2004), y que podrían considerarse convencionales (IgM e IgW), además la presencia de anticuerpos no convencionales de cadena pesada IgNAR (Greenberg et al, 1995). Los IgNARs pueden ser transmembranales o encontrarse de forma soluble (Figura 5).

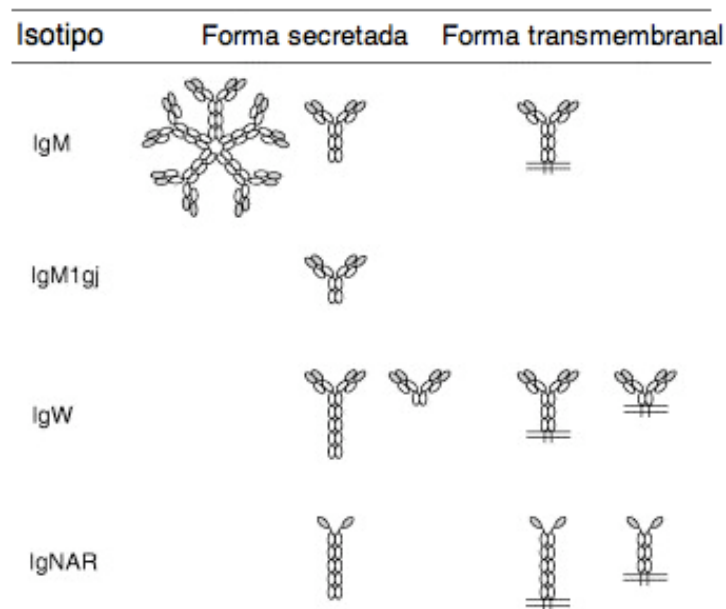


Figura 5. Representación esquemática de isoformas de inmunoglobulinas secretadas y transmembranales de peces cartilaginosos. Los dominios constantes se representan en blanco y los dominios variables en gris (Modificado de Dooley y Flajnik, 2006).

El dominio variable de los anticuerpo IgNAR, ha sido denominado vNAR. Este dominio sencillo, no contiene la interfase V_H/V_L , implicando que la unión al antígeno es mediada solamente por el domino vNAR (Roux et al. 1998). Se han encontrado tres isotipos de IgNAR: tipo I, con cisteínas conservadas en Fr2 y Fr4 y un par adicional de cisteínas en el CDR3. Los IgNAR tipo II, similares en estructura general al tipo I, y residuos adicionales en los CDR1 y CDR3. Los IgNAR tipo III, se encuentran en embriones de tiburones, tiene un CDR3 de tamaño constante y su diversidad es limitada, además de un residuo de tirosina conservado en el CDR1, probablemente sirven como primera línea de defensa. Independientemente del tipo, los dominios sencillos vNAR tienen un CDR2 y un CDR4 poco variable y concentran su diversidad en su CDR3, que puede variar de 5 a 23 residuos de largo dependiendo del isotipo de vNAR (Streltsov *et al.*, 2004).

II. Antecedentes

II.1 Bibliotecas de anticuerpos vNAR.

La identificación de pequeños fragmentos de anticuerpos con capacidad de unirse al antígeno, ha progresado de moléculas recombinantes Fab (fragmento de unión al antígeno) y scFv (fragmento variable de cadena sencilla) a dominios sencillos de unión a proteínas basados en inmunoglobulinas de dominios tipo V_H (variable pesado), ofreciendo el desarrollo de nuevas estrategias inmuno-terapéuticas e inmuno-diagnósticas. La mimetización de los fragmentos de unión al antígeno a dominios más pequeños ofrece la ventaja de incrementar la estabilidad y la posibilidad de acceso a epítomos antigénicos que no son reconocidos por anticuerpos convencionales (Nuttall *et al.*, 2000).

Los anticuerpos de dominio sencillo (sdAbs), tienen varias ventajas comparados con los anticuerpos convencionales y con los scFv, como: estabilidad térmica, capacidad de plegamiento y buena penetración a tejidos *in vivo* (Muydermans, 2001), haciéndolos ideales para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas (Els-Conrath *et al.* 2001). Además, pueden ser clonados fácilmente en varios formatos de fusión con péptidos por ejemplo, las proteínas fluorescentes. La clonación de dos sdAbs idénticos conectados con un péptido de unión aumenta la avidéz por el antígeno. Por otro lado la clonación de dos sdAbs con diferente especificidad, por ejemplo, a albumina de suero, puede representar el incremento en la vida media (Coppieters *et al.* 2006). Los sdAbs bivalentes pueden ser generados al unirlos a la región Fc de ratón o de humano (Wesoloski *et al.* 2009).

Empleando los anticuerpos de dominio sencillo de tiburón y partiendo de bibliotecas no inmunes e inmunes, se han aislado diversos vNAR con capacidad de reconocimiento a una gran variedad de proteínas que tienen diversos orígenes. Por ejemplo, del tiburón *Orectolobus maculatus* se aisló un vNAR con capacidad de reconocer a la proteasa gingipaína K de *Porphyromonas gingivalis* (Nuttall *et*

al. 2002) también, se de una biblioteca sintética se aisló un vNAR capaz de reconocer a la proteína Tom70 con una $K_d = 2.2 \times 10^{-9}$ M (Nuttall et al. 2003). También, se han aislado vNAR contra lisozima y el antígeno 1 de la membrana apical de *Plasmodium falciparum* (AMA-1) (Nuttall et al. 2004). De una biblioteca inmune del tiburón *Ginglymostoma cirratum*, se aislaron vNAR's contra la lisozima de huevo blanco de gallina (HEL) (Dooley et al. 2003). Se ha demostrado la alta afinidad de estos anticuerpos de dominio sencillo, la cual está en el rango de 10^{-7} a 10^{-10} M y gran resistencia a la desnaturalización por calor, al conservar más del 20% de su funcionalidad después de ser incubado 3 horas a temperaturas de 100° C (Dooley et al. 2003). Del tiburón *Heterodontus francisci*, se han aislado vNAR's con capacidad de reconocimiento de la proteína CD38 (Juárez et al. 2011) y con capacidad de neutralización la citocina humana $TNF\alpha$ (Camacho-Villegas et al., *en prensa*). Los anticuerpos de dominio sencillo vNAR, podrían ser considerados una fuente alternativa de agentes terapéuticos debido a su tamaño (12-16 kDa), su alta afinidad por el antígeno (rango de 10^{-7} a 10^{-10} M); y su termoestabilidad y posible rápida eliminación del organismo (Nuttall et al. 2000).

En el presente trabajo, se propone el empleo de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo vNAR, obtenidos de bibliotecas inmunes y no inmunes mediante la técnica de despliegue en fagos filamentosos, como agentes neutralizantes *in vitro* de las citocinas humanas $TNF\alpha$ y $TGF\beta$. También, se propone la quimerización de un anticuerpo inicialmente de dominio sencillo vNAR y aislado del tiburón *Heterodontus francisci*, con la región bisagra y CH2 de IgG1 de humano, como opción al empleo del dominio sencillo.

Este trabajo, está conformado por: una sección de resultados publicados que corresponden al aislamiento de un dominio sencillo obtenido de una biblioteca inmune del tiburón *H. francisci* (T43) y neutralizante de $TNF\alpha$; resultados no publicados, correspondientes a la construcción de un anticuerpo quimérico (T43ch) basado en resultados del artículo; y resultados no publicados de un anticuerpo de dominio sencillo neutralizante de $TGF\beta$ y finalmente una solicitud de patente.

III. Objetivo General

Construir anticuerpos quiméricos y obtener anticuerpos de dominio sencillo del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de neutralizar la función biológica de las citocinas humanas $\text{TNF}\alpha$ y $\text{TGF}\beta$ en modelos *in vitro*.

III.1 Objetivos Específicos

1. Obtener y caracterizar anticuerpos de dominio sencillo vNAR neutralizantes de la citocina $\text{TNF}\alpha$.
2. Obtener la construcción y expresión de un anticuerpo quimérico, que contenga el dominio vNAR, el dominio bisagra y el dominio CH2 de la inmunoglobulina G1 humana.
3. Realizar un bioproceso de producción en lote agitado del anticuerpo quimérico (vNAR-bisagra-CH2) empleando la levadura *Pichia pastoris*.
4. Determinar la capacidad neutralizante *in vitro* del anticuerpo quimérico contra la citocina humana $\text{TNF}\alpha$.
5. Obtener anticuerpos de dominio sencillo de una biblioteca no inmune neutralizantes *in vitro* a la citocina $\text{TGF}\beta$.
6. Realizar un bioproceso de producción en lote agitado del anticuerpo de dominio sencillo vNAR empleando *E. coli*.
7. Realizar ensayos preliminares de toxicidad del vNAR neutralizante de $\text{TGF}\beta$.

CAPITULO II

Aislamiento de un fragmento de dominio sencillo vNAR de tiburón con capacidad neutralizante de $\text{TNF}\alpha$.

Generación y clonación en *Pichia pastoris* de un anticuerpo quimérico (vNAR, región bisagra y región CH2 de la IgG1 humana)

IV.1 INTRODUCCION

IV.1.1 Descripción del Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$).

El factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), miembro de la TNFSF (super familia del factor de necrosis tumoral), tiene una vida media en circulación de pocos minutos y representa del 1 al 2% de las proteínas secretadas por los macrófagos activados, aunque también puede ser secretado por linfocitos B y T estimulados, células NK, mastocitos y fibroblastos humanos (Chen et al. 2006; Mackay et al. 1993). $\text{TNF}\alpha$ es sintetizado como una glucoproteína homotrimérica de membrana de tipo II, que es escindida por metaloproteasas, liberando polipéptidos de 17 kDa. Tres de estas cadenas polipeptídicas se polimerizan, dando lugar a un homotrímero estable de 51 kDa (Abbas et al. 2004).

El $\text{TNF}\alpha$ secretado (Figura 6), adquiere una forma de pirámide triangular donde cada lado de la pirámide está formado por una subunidad, por lo tanto, puede unirse a tres receptores al mismo tiempo (Abbas et al. 2004; Paul, 2003).

La superfamilia de TNF, está comprendida por al menos 19 genes que codifican 20 proteínas transmembranales del tipo II, es decir, proteínas que tienen el extremo amino terminal intracelular y el extremo carboxilo terminal extracelular. Esta superfamilia, incluye miembros como el $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$ (linfotóxina), el ligando de Fas (FasL) y el ligando de CD40 (CD40L) (Paul, 2003).

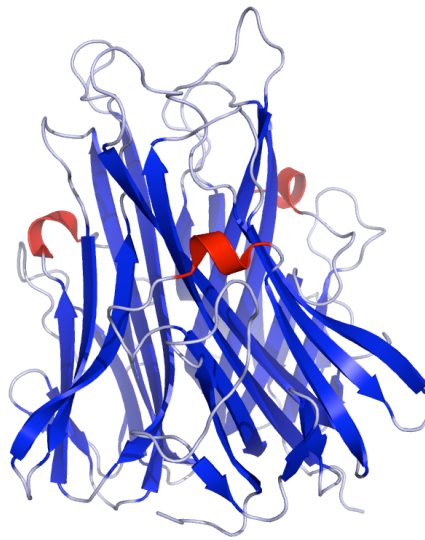


Figura 6. Estructura de TNF- α , homotrímero de 51 KDa. Puede unirse a tres receptores al mismo tiempo. Las tres cadenas peptídicas se representan en diversos colores (<http://www.rcsb.org/>).

Dependiendo del aumento en la concentración del TNF en suero, se puede inducir fiebre, caquexia, inhibición de la contracción cardiaca y del tono de músculo liso vascular, hipotensión arterial, trombosis arterial y reducción de la concentración de glucosa. Concentraciones elevadas de TNF α se asocian a enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, espondiloartropatías, psoriasis y ciertas formas de colitis. Algunas enfermedades agudas inflamatorias también son asociadas a altas concentraciones séricas de esta citocina, como choque séptico, meningococcemia, otitis media, hepatitis B y C, síndrome de Reye y malaria cerebral entre otras (Abbas et al. 2004; Paul, 2003).

IV.1.2 Anticuerpos comerciales neutralizantes de $\text{TNF}\alpha$.

Actualmente, existen cinco inhibidores de la actividad de $\text{TNF}\alpha$, aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y la EMEA (Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos) para su uso en pacientes con artritis reumatoide u otras patologías asociadas al incremento de concentración sérica de esta citocina. Tres de los bloqueadores de $\text{TNF}\alpha$ son anticuerpos monoclonales completos, Infliximab, Adalimumab y Golimumab (Thalathayasingam et al. 2011).

Infliximab (Remicade®, Schering-Plough), es un anticuerpo quimérico compuesto de la región variable de ratón y la región constante de humano, presenta la capacidad de neutralizar al $\text{TNF}\alpha$ monomérico o trimérico, cuando está en forma soluble, en transmembrana y unido a su receptor. Dado que contiene la región constante del anticuerpo humano, puede lisar las células que expresan $\text{TNF}\alpha$, esto debido a la activación del sistema del complemento. Actualmente es usado en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y se extendió su indicación para el tratamiento de artritis reumatoide, logrando disminuir el dolor, la rigidez matutina y la inflamación después de una a dos semanas de tratamiento (Andreakos et al. 2002; Fleischmann y Shealy, 2003). Se han descrito anticuerpos anti-infliximab en pacientes con artritis reumatoide, y su prevalencia va de un 14% al 40%, pero en pacientes con enfermedad de Crohn se ha reportado hasta en un 61% (Taylor, 2010).

Adalimumab (Humira®, Abbott Laboratories), es un anticuerpo tipo IgG1 de humano producido de forma recombinante y que ha sido modificado mediante despliegue en fagos, se le insertaron secuencias de aminoácidos de líneas germinales humanas, con el fin de evadir al sistema inmune y disminuir su inmunogenicidad. Presenta la capacidad de lisar las células que expresan TNF *in vitro* en presencia del complemento. Actualmente se administra con metotrexato y como monoterapia. Weinblatt y colaboradores en 2002, demostraron que la combinación de fármacos incrementa la eficiencia del mismo (Fleischmann y Shealy, 2003). En un estudio de seguimiento de tres años en pacientes con artritis

reumatoide, se estimaron niveles de anticuerpos anti-adalimumab en un 28% (Bartelds et al. 2011).

Golimumab (Simponi®, Centocor Ortho Biotech) es un anticuerpo completo recombinante humano tipo IgG1, con un peso molecular de 150kDa. Tiene capacidad de unión con las formas solubles y de membrana del TNF; su producción se basa en el uso de la técnica de hibridoma. Tiene una vía de administración subcutánea y una vida media de 12 ± 3 días. Se recomienda en terapia mixta con metotrexato, actualmente está aprobado por la FDA desde 2009, como tratamiento para artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante y se encuentra próximo a aprobarse su uso en colitis ulcerativa (Thalthayasingam et al. 2011).

Etanercept (Enbrel®, Wyeth Laboratories), consiste en una fusión dimérica que contiene la porción extracelular del receptor humano p75 unido a la porción Fc (fragmento constante) de la IgG1 humana. Su acción primaria es unirse e inactivar el TNF α soluble y de membrana. Aunque la región Fc contiene el sitio de unión de complemento no lisa las células que expresan TNF *in vitro*. Sin embargo, la adición de la región Fc de la IgG1 humana le proporciona una vida media de 4.8 días y una afinidad de unión de 10^{-10} M (Spencer-Green, 2000). Se ha empleado en el tratamiento de artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante y psoriasis artropática severa (Chen et al. 2006). Esta construcción es menos inmunogénica, se han reportado una prevalencia de anticuerpos anti-etanercept en un 18% de los pacientes (Taylor, 2010).

Certolizumab (Cimzia®, UBC Pharma), es un Fab humanizado conjugado con PEG, siendo el único anti-TNF producido en *Escherichia coli* lo cual disminuye su costo de producción y aumenta la capacidad de producción del mismo. La conjugación con PEG se ideó para incrementar su biodisponibilidad disminuyendo la depuración renal, así como la proteólisis y la inmunogenicidad. Actualmente su principal blanco terapéutico está en la enfermedad de Chron (Chang y Kavanaugh, 2005; Mease, 2011).

La empresa Ablynx (Bélgica), ha desarrollado dos “nanocuerpos” (nanobody) que tienen capacidad de neutralizar $TNF\alpha$ partiendo de dominios sencillo de anticuerpos de camélidos (V_HH). El primero, denominado ATN-103, corresponde a un nanocuerpo trivalente y se encuentran en Fase II de estudios clínicos. El segundo, denominado ATN-192, es una construcción bivalente unida a polietilenglicol para extender su vida media, se encuentra en fase I de ensayos clínicos (www.ablynx.com).

Estos antagonistas (Figura 7), presentan muchas ventajas sobre otros DMARDs (medicamentos modificadores de la enfermedad) que se emplean en el tratamiento principalmente de artritis reumatoide, debido a que exhiben un corto tiempo de respuesta, proveen una respuesta clínica significativa y mejoran la calidad de vida (Chang y Kavanaugh, 2005).

A pesar del progreso en el campo de la terapia basada en el uso de anticuerpos monoclonales, su aplicación tiene ciertas limitantes: 1) los costos de producción, por el uso de sistemas de expresión en células de mamífero; 2) la escasa penetración en tejidos (dependiendo del blanco); 3) limitada vida útil; 4) la presencia de la región Fc (fragmento cristizable) puede resultar en activación del complemento y unión al receptor de Fc. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de fragmentos de dominios sencillos que puedan ser fácilmente modificables y producidos en bacterias o levaduras (Gasser y Mattanovich, 2007; Zhang et al. 2000).

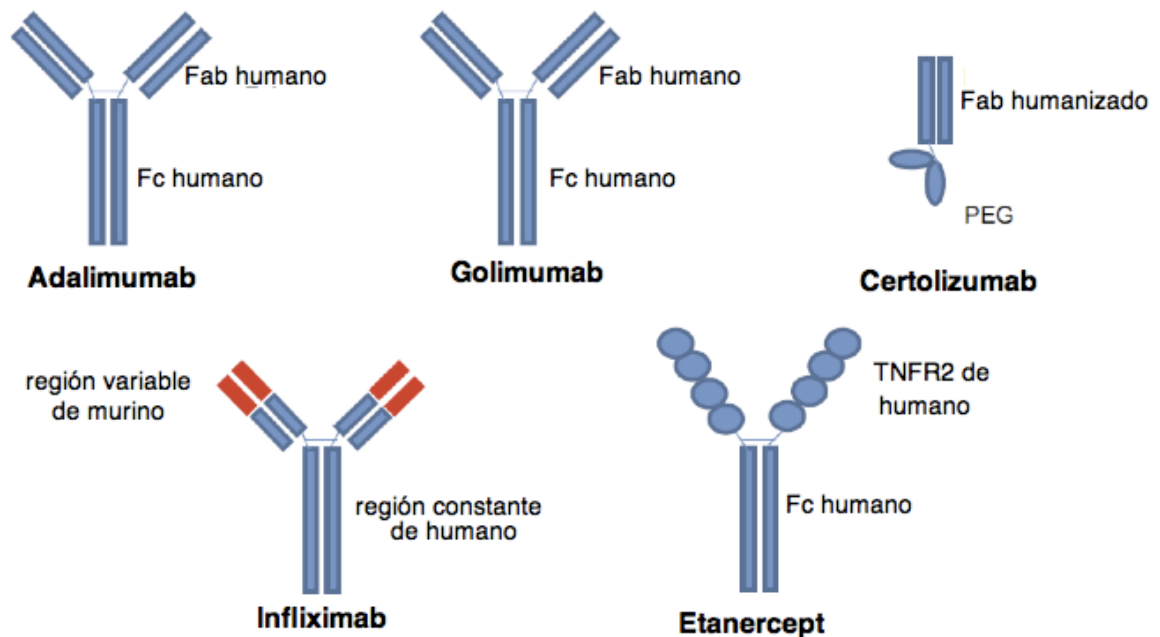


Figura 7. Esquema de las cinco moléculas anti TNF α . Adalimumab y Golimumab son anticuerpos recombinantes humanos completos. Infliximab es un anticuerpo quimérico monoclonal, con la región variable de ratón. Etanercept es una proteína de fusión con dos receptores tipo dos y la región Fc de una IgG1. Finalmente Certolizumab es un Fab humanizado conjugado con PEG (modificado de Thalthayasingam et al. 2011).

IV.1.3 Sistemas de expresión recombinante de anticuerpos: *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

La bacteria *Escherichia coli*, representa el sistema de expresión de proteínas recombinantes más ampliamente empleado, debido al conocimiento de su genoma y fisiología que permiten una fácil manipulación de su genoma y de su crecimiento en cultivo. Lo anterior puede resultar en el bajo costo de los mismos, aumentando la cantidad de proteína recombinante obtenida. Sin embargo, no es posible realizar modificaciones post-traduccionales y en ocasiones la proteína se mantiene en cuerpos de inclusión que aumenta el costo de extracción de la proteína (Rai y Padh, 2001) y afecta la cantidad final de proteína producida.

La levadura *Pichia pastoris* representa un sistema de expresión eucariota eficiente, dado que existen cepas comerciales que permiten la expresión efectiva de proteínas recombinantes funcionales (Cereghino y Cregg, 2000). Además, permite realizar modificaciones post-traduccionales como el procesamiento de secuencias señal, plegamiento de la proteína, formación de enlaces disulfuro y glucosilaciones tipo N y O (Higgins y Cregg, 2008). Adicionalmente, se han obtenido altas concentraciones de proteína heteróloga, comparando con un sistema bacteriano. Sin embargo, el uso a nivel industrial de *P. pastoris* aumenta los costos de producción comparando con *E. coli*.

P. pastoris puede utilizar metanol como única fuente de carbono para producir dióxido de carbono y energía, lo cual la clasifica como una levadura metilotrófica. La enzima alcohol oxidasa (AOX que esta codificada por los genes AOX1 y AOX2), se emplea como catalizador de la primera reacción metabólica que implica la oxidación de metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno. En los peroxisomas, se degrada el peróxido de hidrogeno por la catalasa. Cierta cantidad de formaldehído es oxidado a formato y CO₂. Este proceso genera energía para la célula. Adicionalmente, la enzima DHAS (dihidroxiacetona) condensa el formaldehido restante. Como producto de ésta reacción, el gliceraldehido 3-fosfato y la dihidroxiacetona generan gliceraldehido-3-fosfato y xilulosa-5-monofosfato (Figura 8) (Gellisen et al. 2005).

De acuerdo a la utilización del metanol como fuente de carbono, existen principalmente dos fenotipos de *P. pastoris*, las cepas Mut⁺, que contienen los genes AOX1 y AOX2 y crecen de forma similar a las cepas silvestres y las cepas Mut^S, que tienen el gen AOX1 parcialmente eliminado y crecen lentamente en metanol (por ejemplo la cepa KM71).

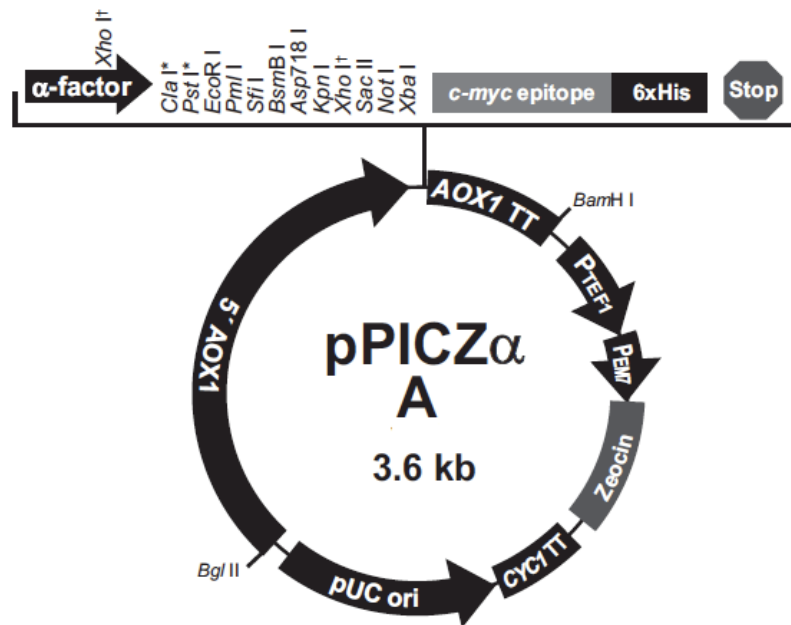


Figura 9. Vector de clonación y expresión pPICZ α A de 3.6 kb. Se muestran las características generales del vector. Tomado de www.invitrogen.com/.../manuals/ppicz_man.pdf

El empleo de *Pichia pastoris* para bioprocesos permite el incremento en la producción de la proteína heteróloga de interés. Los protocolos de fermentación, generalmente constan de tres fases: la primer fase de crecimiento en glicerol, con crecimiento en lote; la segunda fase de alimentación de glicerol, en la cual se agrega una limitada cantidad de glicerol seguida de su terminación como consecuencia hay un incremento en la biomasa generada en el biorreactor; la tercera fase de alimentación de metanol, en la cual el metanol es alimentado a un flujo limitante para mantener un nivel controlado de inducción del gen AOX1 (Zhang et al. 2000).

Las ventajas del uso del *Pichia* como sistema de expresión incluyen: el crecimiento de altas densidades de cultivo celular en un medio simple, la existencia de promotores fuertemente inducibles, la existencia de cepas y vectores genéticamente manipulados (Gasser y Mattanovich, 2007).

IV.2 MATERIALES Y METODO

IV.2.1 Optimización del gen *vnar t43* para *Pichia pastoris*.

Se obtuvo la clonación del fragmento de dominio sencillo vNAR en el vector pPICZ α A y se transformaron células de *Pichia pastoris* y se obtuvo una producción de 8 mg/L empleando el medio rico BMMY (a esta construcción se le denominó T43P, datos no mostrados). Este anticuerpo vNAR tiene capacidad de neutralización de la citocina TNF α . Con la finalidad de mejorar la cantidad de proteína vNAR T43P obtenida, se obtuvo por síntesis el gen *t43p* con codones optimizados para la levadura *Pichia pastoris* (GenScript, Piscataway, NJ).

Se diseñaron oligonucleótidos que permitieran la clonación de este gen después del sitio de corte Kex2 (secuencia empleada en el procesamiento del factor α en el vector pPICZ α A) y otro oligonucleótido sin este sitio, con la finalidad de que permita la comparación en la expresión a pequeña escala del vNAR T43P. Estos oligonucleótidos agregan los sitios de restricción para las enzimas XhoI y XbaI (Tabla I). Los fragmentos amplificados correspondientes al fragmento *vnar* optimizado se denominaron T43PFor1 y T43PFor2 respectivamente.

Se realizó un PCR de gradiente de temperaturas (50-65° C) para obtener los fragmentos T43PFor1 y T43PFor2 del tamaño esperado (~420pb). Se corrió en gel de agarosa al 1.8%. Se limpiaron las reacciones positivas con el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) y se digirió con las enzimas XhoI y XbaI (Promega). Paralelamente, se digirió el plásmido pPICZ α A con las mismas enzimas de restricción y se cortó de gel de agarosa el fragmento correspondiente al vector digerido en ambos sitios de corte.

Se ligó durante toda la noche en una relación de 3:1 (inserto:vector) a temperatura ambiente. Se electroporaron 3 μ L de esta ligación en 150 μ L de células electrocompetentes TOP10 y se incubaron por 1 hora a 37° C. Se sembraron 50 μ L y 100 μ L en placas de LB-LS con zeocina 25 μ g/mL, las cuales se incubaron durante toda la noche a 37° C. Se picaron 5 colonias al azar y se

realizó un PCR con los oligonucleótidos específicos 5'AOX y 3'AOX (Tabla I). Se seleccionaron las colonias positivas y se aislaron los plásmidos por lisis alcalina. Se obtuvo la secuencia para verificar que el inserto se mantenía en fase (SeqXcel, San Diego).

IV.2.2 Diseño del gen quimérico *t43/región bisagra/ch2*.

Se diseñó un anticuerpo quimérico que está compuesto por el gen *vnar* que codifica el fragmento de dominio sencillo de tiburón T43 con capacidad de neutralizar la citocina $\text{TNF}\alpha$ (conforme a lo descrito en el artículo anexo en este trabajo de tesis Camacho-Villegas et al. 2003), unido a la región bisagra y el CH2 de la IgG1 de humano. Esta construcción del anticuerpo quimérico fue denominada T43ch. Se analizaron las secuencias publicadas en Kabat (1991) y en el banco de genes del NCBI para la región bisagra (B) y el dominio CH2 de la inmunoglobulina IgG1 de humano. Se optimizó el uso de codones correspondientes al vNAR para el hospedero *P. pastoris*. Las secuencias de ADN codificantes de los dominios bisagra y CH2 se mantuvieron sin optimizar.

IV.2.3 Clonación del gen quimérico *t43ch* en pPICZ α A.

Se obtuvo el gen quimérico por síntesis (GenScript, Piscataway, NJ). El gen se encontraba en el plásmido pUC19. Empleando 150 ng de plásmido se transformaron por electroporación (200 Ohms, 2.5kV y 4 milisegundos) en 100 μL de *E. coli* TOP10 electrocompetentes, las células se recuperaron en 3 mL de medio SOC (2%, triptona extracto de levadura 0.5%, 8.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO_4 , 20 mM glucosa). Se incubó el cultivo por 1 hora y se tomaron 100 μL para inocular 10 mL de medio SB (super broth) que contenía 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Se incubó toda la noche a 37° C y 250 rpm. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo y se procedió a la extracción de plásmido por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). Se cuantificó en espectrofotómetro y se corrió en gel de agarosa al 0.8%. Se empleó el plásmido purificado para el PCR (Tabla II), empleando los oligonucleótidos específicos (Tabla I). El producto de PCR se

analizó mediante un gel de agarosa al 1.8% y se purificó con QIAQuick PCR purification kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor.

El vector pPICZ α A, se digirió por 1 hora a 37° C con las enzimas XhoI y XbaI (Promega) y se analizó en gel de agarosa al 1%. Se purificó la banda correspondiente al vector digerido con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), y fue resuspendido en agua libre de nucleasas. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20° C hasta su uso.

Con los fragmentos digeridos y purificados correspondientes al vector y al gen T43ch se procedió a su ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Se incubó la reacción a 16° C por 12 h empleando 150 ng de vector y 60 ng de inserto, la reacción se a 60° C por 20 min.

IV.2.4 Transformación en *E. coli* de la ligación pPICZ α A-T43ch.

Empleando 50 μ L de células TOP10, se electroporaron 5 μ L de la reacción de ligación en celdas de 2 mm (apartado II.2.1). Se sembraron los volúmenes de 1, 10 y 100 μ L en placas de medio de cultivo LB-LS (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%, pH 7.5) suplementado con zeocina (25 μ g/mL). Se incubó a 37° C hasta obtener colonias aisladas.

Se seleccionaron 10 colonias al azar y se evaluaron utilizando los con los oligonucleótidos 5'AOX1 y 3'AOX1 (Tabla II). Se tomaron dos colonias positivas para obtener el plásmido y verificar su secuencia. Se aisló plásmido empleando lisis alcalina y se cuantificó en un espectrofotómetro.

Tabla I. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.

Nombre	Sentido	Secuencia
5'AOX1	5' → 3'	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'AOX1	3' → 5'	GCAAATGGCATTCTGACATCC
T43chFor	5' → 3'	CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCTTCACTT GACCAGACTTTGAG
T43chRev	3' → 5'	GCTCTAGAGATTTGGCTTTGGAGATGGTTTTCTCG

Tabla II. Condiciones de PCR para amplificar el gen quimérico T43ch

Numero de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	95	3 minutos
30	95	45 segundos
	54	45 segundos
	72	1 minuto
1	72	7 minutos

IV.2.5 Transformación en *P. pastoris* (X-33).

Se empleó la cepa Mut+ X-33 para la transformación con el vector linearizado pPICZ α A-T43ch. Se emplearon 150 U de SacI en un volumen de reacción de 300 μ L, conteniendo 15 μ g de plásmido, la reacción se llevó a cabo por 12 h a 55° C y se desactivó la enzima a 65° C por 20 min. Se purificó el vector empleando fenol-cloroformo y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%, se realizaron dos lavados con etanol 80% y se resuspendió en 10 μ L de agua destilada. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta su empleo posterior.

Se prepararon células electrocompetentes X-33 de acuerdo a lo descrito en el manual EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen). Se electroporaron 100 μ L de células electro competentes y 10 μ g de vector linearizado en celdas de 0.2 cm bajo las condiciones de 2.0 kv, 25 μ F, 200 omhs, 5 ms. Las células se recuperaron en 1 mL de 1 M sorbitol 1M y se incubaron por 1 h a 30° C. Después se agregó 1 mL de medio YPD y se incubó 2 h a 30° C y 200 rpm. Se sembraron 25, 50 y 100 μ L en placas de medio YPDS con zeocina (100 μ g/mL). Las placas se incubaron a 30° C hasta que se observaron colonias aisladas (aproximadamente 4-5 días).

Se resembraron colonias aisladas y se incubaron en las mismas condiciones y se verificó la presencia de inserto por PCR usando los oligonucleótidos 5'AOX y 3'AOX. Previamente, se seleccionó la colonia y se colocó en 10 μ L de agua destiladas y se adicionaron 5 μ L de liticasa (5U/ μ L) (Sigma), se incubó 10 min a 30° C y posteriormente por 10 min 80° C. Se procedió al PCR (Tabla II) usando como templado 5 μ L de colonia tratada con liticasa. Una vez, verificada la presencia de inserto, el plásmido fue purificado por lisis alcalina y se obtuvo la secuencia (SeqxCel, San Diego).

IV.2.6 Bioproceso de producción de anticuerpo quimérico T43ch.

Una vez determinada la expresión en matraz se procedió a realizar un bioproceso para obtener una mayor cantidad de proteína T43ch.

IV.2.6.1 Desarrollo de inóculos

Partiendo de una colonia aislada crecida en medio MGY se inocularon dos matraces blafeados de 2 L conteniendo 400 mL de medio BGMY. Se incubaron de 16 a 24 horas a 30° C y 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de 4. Se seleccionó un cultivo para inocular el biorreactor. Se tomaron muestras antes y después de la inoculación.

IV.2.6.2 Descripción del Biorreactor

En este caso, se trabajó con una jarra de fermentación, con volumen nominal de 15 L, volumen de trabajo mínimo de 5 L y máximo de 12 L. El sistema de agitación esta constituido por dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas planas cada una y un motor de velocidad variable (rango de velocidad de 0-800 rpm), cuenta con dispersor de aire de orificio. El calentamiento se llevó a cabo usando baño maría. Los sensores empleados fueron; sensor de pH (rango de 0-14), sensor de oxígeno disuelto (rango de 0-500%) y sensor de temperatura (rango de 0-150° C). La espuma fue controlada mediante adiciones manuales de 5 mL de silicón grado alimenticio al 10%.

IV.2.6.2a Biocontrolador.

Lleva a cabo la medición y control de las variables durante el proceso de fermentación, es decir, monitorea y controla la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la adición de anti-espumante y la velocidad de agitación. Este funciona mediante un control tipo Proporcional-Integral-Derivativo (PID). El biocontrolador empleado en este trabajo es un diseño especialmente fabricado para suplir las necesidades la Planta Piloto del IIB de la UNAM.

IV.2.6.2b Bioconsola.

La bioconsola recibe las señales del biocontrolador para llevar a cabo el control de las variables del bioproceso. Esta equipada, con una bomba de adición para ácido y otra para adición de base, que operan de forma automática. Un rotámetro, con el cual se regula de forma manual el flujo de aire; dos válvulas solenoides para controlar la entrada de agua al sistema de control de temperatura por baño maría.

IV.2.6.2c Sistema de cómputo.

Los datos se obtuvieron cada 2 minutos con el programa LabView Signal Express (National Instruments). Este sistema permite llevar a cabo el monitoreo en tiempo real y el control remoto del sistema de fermentación. Así como, el registro de los datos y el gráfico del comportamiento de cada uno de los parámetros del cultivo.

IV.2.7 Preparación del biorreactor e instalación.

Se esterilizaron en autoclave vertical (Yamato, SM510), 7 L de medio FBSM a pH 5 ajustado con hidróxido de amonio concentrado, con calor húmedo y 120° C por 20 minutos. Los electrodos de oxígeno disuelto (calibrado al 100% de saturación de aire); pH (calibrado a dos puntos) y termómetro fueron calibrados y se esterilizaron montados en el biorreactor. Bajo condiciones de asepsia, se agregaron 30 mL de sales PTM1.

Se dejó polarizando el electrodo de oxígeno toda la noche, una vez que el medio de cultivo del biorreactor se enfrió, el medio de cultivo se aireó con agitación a 400 rpm y presión positiva de aire para asegurar que las lecturas realizadas fueran las adecuadas.

También se adaptó una toma de gas LP para la instalación de un mechero Bunsen que permitió mantener estéril el área durante la inoculación y la toma de muestra.

IV.2.8 Condiciones de cultivo en biorreactor.

Al día siguiente, se agregó el inóculo de 400 mL proveniente del matraz bajo condiciones de asepsia. Se tomó una muestra antes de inocular el biorreactor para usarla como blanco en las mediciones; otra muestra después de la inoculación y una cada cuatro horas de cultivo. Se analizó la densidad óptica a 600 nm para verificar la cinética de crecimiento del cultivo y se siguió analizando hasta el final del mismo, aproximadamente por 72 horas.

Se incubó el cultivo a condiciones controladas de TOD (tensión de oxígeno disuelto) a 30% (con respecto al valor de saturación en aire) con incrementos automáticos de velocidad de agitación; Temperatura a $30^{\circ}\text{C} \pm 1$; Agitación a RPM (revoluciones por minuto) entre 250 – 550 y pH de 7.4 ± 1 . Para mantener la temperatura del cultivo, los biorreactores se mantuvieron en baño maría.

El medio FBSM contiene glicerol como fuente de carbono para *P. pastoris*, se incubó el cultivo hasta que se consumió el glicerol, monitoreando la TOD como indicador de actividad metabólica; este aumenta al 100% cuando se disminuye la demanda del cultivo. En esta primera fase de crecimiento, se considera que un peso húmedo de 90 a 150 g/L es adecuado para continuar con el cultivo. A esta fase de la fermentación se le denomina fase de crecimiento en lote.

Se procedió a la segunda fase de cultivo o fase alimentación de glicerol 50%, esta fase permite el aumento de la biomasa previo a la inducción. Se inició una primera alimentación de glicerol a un flujo de 0.8 mL/min y se agregaron 12 mL de sales PTM₁ por cada litro de glicerol alimentado. La alimentación se llevó a cabo por 4 horas,. Se monitoreó la TOD del cultivo, y en caso de ser necesario se realizó el cambio de alimentación de aire por alimentación de oxígeno puro, según la demanda del cultivo. Se monitoreó el crecimiento cada cuatro horas, a la espera de obtener un peso húmedo de 180 a 300 g/mL.

La tercera fase del cultivo consistió en alimentaciones de metanol a una concentración final del 2%. Se realizaron tres alimentaciones de 30 minutos con un flujo de 0.8ml/min y se agregaron 15 mL de sales PTM₁; después, se aplicaron

dos alimentaciones de 1 hora cada una con flujo constante de 0.8 mL/min y se agregaron 15 mL de sales PTM1; las últimas dos alimentaciones, fueron a un flujo de 1.1 mL/min por el resto de la inducción (32 horas) y se agregaron 15 mL de sales PTM1. Se trató de mantener la TOD al 20% con la alimentación de oxígeno puro. El peso húmedo esperado en esta fase esta alrededor de 350 a 450 g/L.

IV.2.9 Obtención y purificación de anticuerpo T43ch producido en biorreactor.

El cultivo fue centrifugado (Sorvall RC BIOS Centrifuge) a 10,000 rpm y 4° C por 30 minutos en lotes de 400 mL. Se conservó el sobrenadante y precipitó el exceso de sales ajustando a pH 8 con hidróxido de amonio. Se centrifugaron de nuevo las alícuotas y se tomó el sobrenadante. Se dializó contra PBS1X por 12 h a 4° C y agitación constante. Se realizaron dos recambios de 2 horas cada uno y un cambio final de 12 h. El sobrenadante dializado fue purificado por gravedad empleando 4 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN) conforme a las recomendaciones del fabricante, pero incrementando cuatro veces los volúmenes de buffer de lavado y de elusión recomendados. Las fracciones fueron eluidas en 4 mL cada una y finalmente se juntaron todas las eluciones.

IV.2.10 Análisis de la producción del anticuerpo quimérico.

IV.2.10.1 Preparación de muestras y cuantificación.

Para la cuantificación se empleó el kit Micro BCA Protein Assay siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la preparación de muestras para los geles de poliacrilamida, a 1 mL del sobrenadante del cultivo se le agregaron 150 µL de ácido tricloroacético (TCA 100%) para precipitar las proteínas totales. Se incubó por 12 h a 4° C, posteriormente se centrifugó a 4° C y 14,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se lavó el paquete con 1 mL de acetona fría, se centrifugó de nuevo y el paquete se secó a temperatura ambiente. Finalmente fue resuspendido en 20 µL de buffer de carga 2x. Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C por 10 min.

IV.2.10.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (Glicina-SDS-PAGE).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo a lo descrito previamente (Sambrook y Russell, 2001). Las condiciones de corrida fueron de 50 mA con un voltaje constante de 150 Volts, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Los geles fueron teñidos toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante empleando azul de Coomassie. Se destiñó el gel utilizando una solución de desteñido (40% etanol, 10% ácido acético) hasta obtener el contraste deseado. Los geles se secaron empleando un desecador Gel Dryer (BioRad) a 80° C por 1 hora. Se fotodocumentaron digitalmente.

IV.2.10.3 Inmunodetección de T43ch producido en biorreactor (Western blot).

Se realizó la electrotransferencia en condiciones semi-secas, en membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 µm (Biorad) y el sistema Semi-Dry Electroblotter (CLP). Se humedecieron en buffer Towbin 1x (Tris Base 250 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) por 10 minutos, 6 papeles filtro, el gel de poliacrilamida al 12% y la membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo por 1 h a 200 mA constante manteniendo el voltaje por debajo de los 20 V.

La membrana fue incubada por 2 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche 5%-PBS1X-Tween 0.05%). Se descartó la solución y se agregó el anticuerpo anti-cMyc (Roche) a una dilución 1:1500 en leche descremada 3%-PBS1x-Tween 0.05%. Se incubó toda la noche a 4° C con agitación constante. Se lavó la membrana tres veces de cinco minutos cada uno de los lavados empleando PBS1X-Tween 0.05% a temperatura ambiente. Para el revelado se empleó el kit Enhanced Chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences) y placas de fotografía (Kodak). Se foto-documentó el resultado digitalmente.

IV.2.11 ELISA de reconocimiento de $\text{TNF}\alpha$ usando medio de cultivo obtenido durante el bioproceso.

Se colocaron 250 ng/pozo de la citocina $\text{TNF}\alpha$ (Peprotech). Se incubó la placa 2 horas a 37° C. Se descartó el sobrenadante y se bloqueó la placa con 150 μL de BSA 3%-PBS1X por 1 h a 37° C. Se descartó la solución y se agregó a cada pozo 50 μL de proteína T43ch purificada y dializada. Se incubó por 2 h a 37° C. Se lavaron los pozos tres veces con solución PBS 1X-Tween20 al 0.05% y se agregaron 50 μL de anticuerpo de gallina anti-vNAR diluido 1:1000 en solución de BSA 1%-PBS1X y se incubó la placa por 2 h a 37° C. Se lavaron de nuevo los pozos tres veces y se agregaron 50 μL de anticuerpo secundario anti-gallina acoplado a peroxidasa y diluido 1:5000 en BSA 1%-PBS1x. Se incubó por 2 horas a 37° C. se decantó y lavó la placa tres veces. Finalmente, se agregaron 50 μL de solución de revelado TMB ELISA Reagent, (Thermo Scientific), se incubó a 37° C por 10 minutos y se analizó en espectrofotómetro Benchmark Microplate Reader (BioRad) a 405 nm. Se uso BSA 1% como control negativo de reconocimiento.

IV.2.12 Bioensayos de neutralización *in vitro* empleando el anticuerpo quimérico T43ch.

IV.2.12a Ensayos de citotoxicidad de $\text{TNF}\alpha$ en células L929.

Con la finalidad de determinar la dosis letal media (DL_{50}) del lote de citocina rh $\text{TNF}\alpha$ (Peprotech), se emplearon células L929 (ATCC). Se descongelaron dos crioviales de células y se crecieron en botellas de 75 cm^2 usando medio modificado de Dulbecco (Hypoclone) suplementado con 10% de SFB (suero fetal de caballo) (Hypoclone) y se incubaron a 37° C, 5% de CO_2 y atmósfera húmeda. Al obtener una confluencia del 90%, se lavaron las células con 2 mL de PBS 1X sin Mg^{2+} y Ca^{2+} . Se desprendieron las células agregando 2 mL de Tripsina 0.05%-EDTA 1 mM (Gibco) en PBS 1X con 3 minutos de incubación. Se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante por aspiración y se

resuspendió el botón celular en 10 mL de medio de cultivo. Se estimó el número celular con azul tripano al 0.4%, en una cámara de Neubauer.

En una placa de 96 pozos (Corning), se depositaron por triplicado 24,000 células L929/pozo con medio modificado de Dulbecco adicionado con 10% de suero de bovino (Gibco), incubándose por 6 horas en condiciones a 37° C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Se aspiró el medio de cultivo y fue reemplazado. Posteriormente, se agregaron 100 µL de medio de cultivo conteniendo: una concentración final de Actinomicina D de 1 µg/mL y las diluciones seriales de TNF α de 10; 3.3; 1.1; 0.37; 0.12; 0.04; 0.013; 0.0045; 0.0015; 0.0005; 0.00016 ng/mL respectivamente y por triplicado. Se incubaron 18 horas con 5% de CO₂ a 37° C y atmósfera húmeda. Para determinar la viabilidad celular, se agregaron 20 µL del reactivo Cell Titer One (Promega), y se incubó la placa con a 37° C, 5% de CO₂ por 4 horas. La lectura de la actividad metabólica se realizó en un lector de placas (Molecular Devices) a 490 nm. Como control positivo de supervivencia, se cultivaron por triplicado el mismo número de células pero sin TNF α .

IV.2.12b Ensayos de neutralización de TNF α con el anticuerpo quimérico T43ch empleando células L929.

Para determinar la dosis inhibitoria media (DI₅₀) del anticuerpo quimérico T43ch anti-TNF α , se emplearon células de fibrosarcoma de ratón L929 en presencia de cinco dosis letales medias (3DL₅₀) de esta citocina. El ensayo se realizó por triplicado para cada clona. Se colocaron en placas de 96 pozos 24,000 células L929/pozo, en un volumen de 100 µL de medio modificado de Dulbecco suplementado con 10% de suero de caballo y se incubaron por 6 horas con 5% de CO₂, 37° C y atmósfera húmeda. Como ya se conocía la dosis letal media determinada por el ensayo de citotoxicidad, se agregaron 3 dosis letales medias (3DL₅₀) de TNF α , con diferentes diluciones seriales 1:3 de la proteína quimérica T43ch; 750; 250; 83.8; 27.7; 9.25; 3; 1; 0.34; 0.11; 0.034; 0.012 µg/mL, más 1

$\mu\text{g/mL}$ de actinomicina D. Se incubó por 18 horas con 5% de CO_2 , 37°C y atmósfera húmeda.

Para determinar la supervivencia celular, se agregaron 20 μL /pozo del reactivo Cell Titer One. Se incubó 4 horas y se leyó la absorbancia a 490 nm. Como control positivo de neutralización, se empleó un F(ab)_2 de caballo anti- $\text{TNF}\alpha$ desarrollado por Instituto Bioclon S.A. de C.V. (Empresa Grupo Silanes). Las concentraciones empleadas fueron las siguientes: 100; 33.3; 11.1; 3.1; 1.23; 0.41; 0.13; 0.045; 0.015; 0.005; 0.0016 $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo de muerte celular, se emplearon células en ausencia de anticuerpos que bloqueen el efecto biológico de la citocina $\text{TNF}\alpha$.

V.1 RESULTADOS

V.1.1 Resultados publicados

"Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: A potential therapeutic use"

Volume 5, Issue 1 January/February 2013

Keywords: *Heterodontus francisci*, IgNAR, neutralization, rhTNF α , shark, single domain antibodies, vNAR

Authors: Tanya Camacho-Villegas, Teresa Mata-González, Jorge Paniagua, Edna Sánchez and Alexei Licea

Abstract:

The therapeutic use of single domain antibodies (sdAbs) is a promising new approach because these small antibodies maintain antigen recognition and neutralization capacity, have thermal and chemical stability and have good solubility. In this study, using phage display technology, we isolated a variable domain of a IgNAR (vNAR) from a *Heterodontus francisci* shark immunized against the recombinant human cytokine TNF α (rhTNF α). One clone T43, which expresses the vNAR protein in the periplasmic space, was isolated from the fourth round of panning. T43 had the capacity to recognize rhTNF and neutralize it in vitro, indicating that T43 has potential as a therapeutic that can be used for diseases in which this pro-inflammatory cytokine needs to be controlled.

Provisional Full-Text corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions containing any author galley corrections will be made available soon. When Provisional Full Text is displayed, it will always be open access.

Introduction

Conventional antibodies have many important features, including high affinity and selectivity for a specific target, and low inherent toxicity, that make them suitable as therapeutic agents. In addition to these benefits, single domain antibodies, such as the V_HH (obtained from camels) and the vNAR (obtained from sharks), have other technological and biophysical advantages.¹⁻³ Single domain antibodies are the smallest naturally occurring antibodies domain with antigen recognition capacity and, in contrast to single chain Fv (scFv), these domains do not undergo spontaneous dimerization. Furthermore, they retain binding capacity under

conditions of extreme pH and temperature and also in the presence of proteases and chaotropic agents.⁴

The vNAR domains display two complementarity-determining region (CDR) loops compared with conventional antibodies, which have a VH and VL domain format where the binding capacity depends on the interaction of six CDR loops.⁵ Differences in the length, amino acid composition and the distribution of non-canonical cysteine residues of CDR3 were observed in these molecules.^{6,7} Antigen binding is primarily mediated by an extended CDR3 loop, with stabilizing disulfide bonds connecting to either the less variable CDR1 region or to adjacent framework residues.^{8,9}

Using phage display technology, a range of clinically important target molecules, such as cytokines, can be selected against a large repertoire, and selection of high-affinity recombinant antibodies is also possible. The IgNAR response, which has previously been analyzed in nurse (*Ginglymostoma cirratum*) and wobbegong (*Orectolobus maculatus*) sharks, is antigen driven, and both immune and naïve molecular libraries of IgNAR variable domains have been constructed and successfully screened for molecules with antigen specificity.^{4,7,10}

Our group has analyzed the IgNAR antibodies from the horn shark *Heterodontus francisci*. The small size and the sedentary behavior of this shark make it a good model system for raising vNAR domains.¹¹ TNF α , a pro-inflammatory cytokine, was selected as the target because it is implicated in diseases such as rheumatoid arthritis and psoriasis. In addition, numerous other formats of monoclonal antibodies targeting TNF have been developed.¹² In this report, we isolated one vNAR domain from an immunized horn shark using phage display technology. This vNAR can neutralize recombinant human TNF α in vitro. Several pharmaceutical companies are developing variable domains to neutralize TNF α , e.g., scFV (DLX105; Delenex), minibodies with a VL fused with Fc region,¹³ single domain VHH fragments¹⁴ and nanobodies (ATN-103, ATN-192; Ablynx). The shark vNAR platform, however, has the advantage that sharks can recognize epitopes that the immune systems of mammals cannot recognize, thereby offering opportunities to isolate novel antibodies, potentially with high affinities, that could not otherwise be produced.

Results

Isolation of vNAR fragments

Total RNA was purified from the spleen of one immunized shark and 1.5 mg of total RNA was isolated. PCR reactions were performed to obtain the quantity of vNAR gene required for digestion and ligation of the amplified 350 bp fragment. The size of the obtained immune library was 1.2×10^9 cfu. After each round of

panning and compared with skim milk, the phage pool with binding capacity against TNF α was increased during the selection steps (Fig. 1). Round 4 was used to search for positive PCR clones. After panning and clone selection, four different vNAR were found.

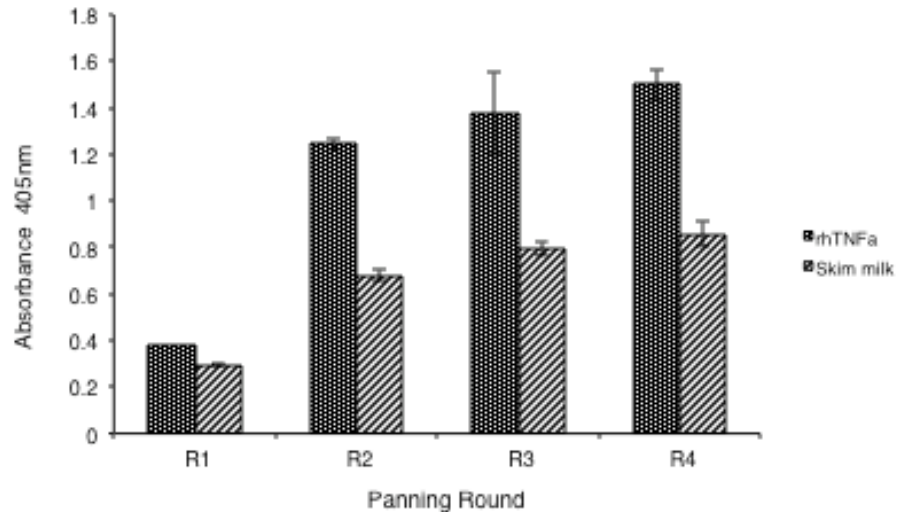


Figure 1. Increase of recognition during the panning. The phage pool with vNAR from *Heterodontus francisci* against rhTNF α , increase the recognition level during the four rounds of panning. The specific recognition is compared against skim milk as a negative control.

Expression and recognition ELISA assays

After the analysis of the four different clones, we selected clone T43 based on expression and recognition ELISAs. The sequence of T43 clone is show in Figure 2. The vNAR protein was expressed in the periplasmic space of TOP10F' *E. coli* cells in low yield (700 μ g/L). After expression and periplasmic extraction, metal affinity chromatography was performed, and protein expression was detected by ELISA (Fig. 3A). Recognition of the vNAR against BSA was detected, but recognition of the specific antigen was higher ($p < 0.05\%$); Figure 3B). The purified vNAR T43 protein (Fig. 4) had a molecular weight of ~14 kDa and could be detected with anti-HA-HRP antibody in a western blot assay. Most of the protein is eluted in fraction 2 during the purification procedure. vNAR T43 was used for thermostability assays, which demonstrate conservation of the ability of boiled vNAR to recognize antigen. An ELISA assay with the purified and boiled vNAR showed only a 15% decrease in recognition of rhTNF α compared with the non-boiled vNAR at different time points (Fig. 5).

FR1 CDR1 FR2 HV2 FR3
 T43 ASLDQTLRTA TRETGESLTV **NC**VLV DAIYG LYS TSWYRNN PGS **TDREHITG** GRYVESV
 HV4 FR3 CDR3 FR4
 T43 **NKGAK**SFSLQI KDMTFEDSGT **YY****KA** **RATSGYTP** HDGSGTVLTV N

Figure 2. vNAR T43 protein sequence. Different portions of the vNAR are marked; the CDR3 sequence is in bold and the canonical cysteine residues are gray shadow. The CDR3 has 10 residues long for this anti-TNF variable domain.

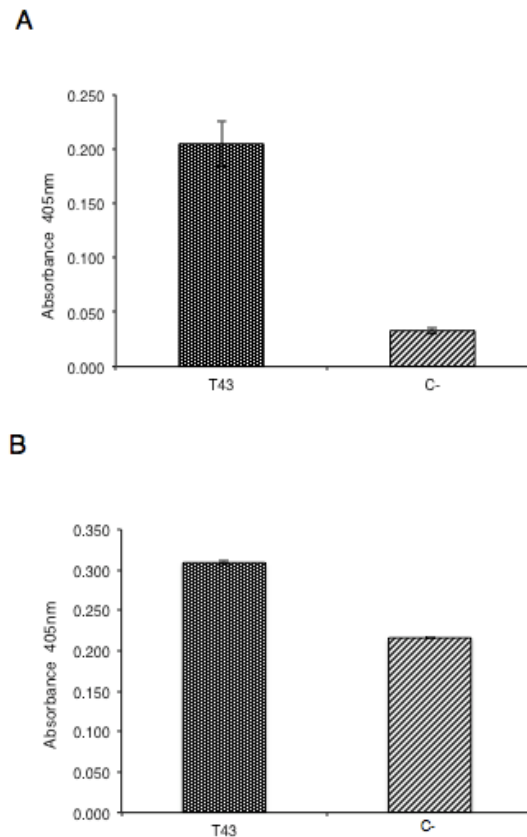


Figure 3. Expression and recognition assays. **(A)** Expression ELISA, the vNAR T43 protein used as antigen was successfully expressed into *E. coli* periplasmic space, it was recognized by means of an anti-HA antibody, a non-transformed *E. coli* extract was used as a negative control **(B)**. Recognition ELISA assays, rhTNF α cytokine was used as antigen. The vNAR T43 has the capacity to recognize the cytokine when it was compared with BSA as a negative control.

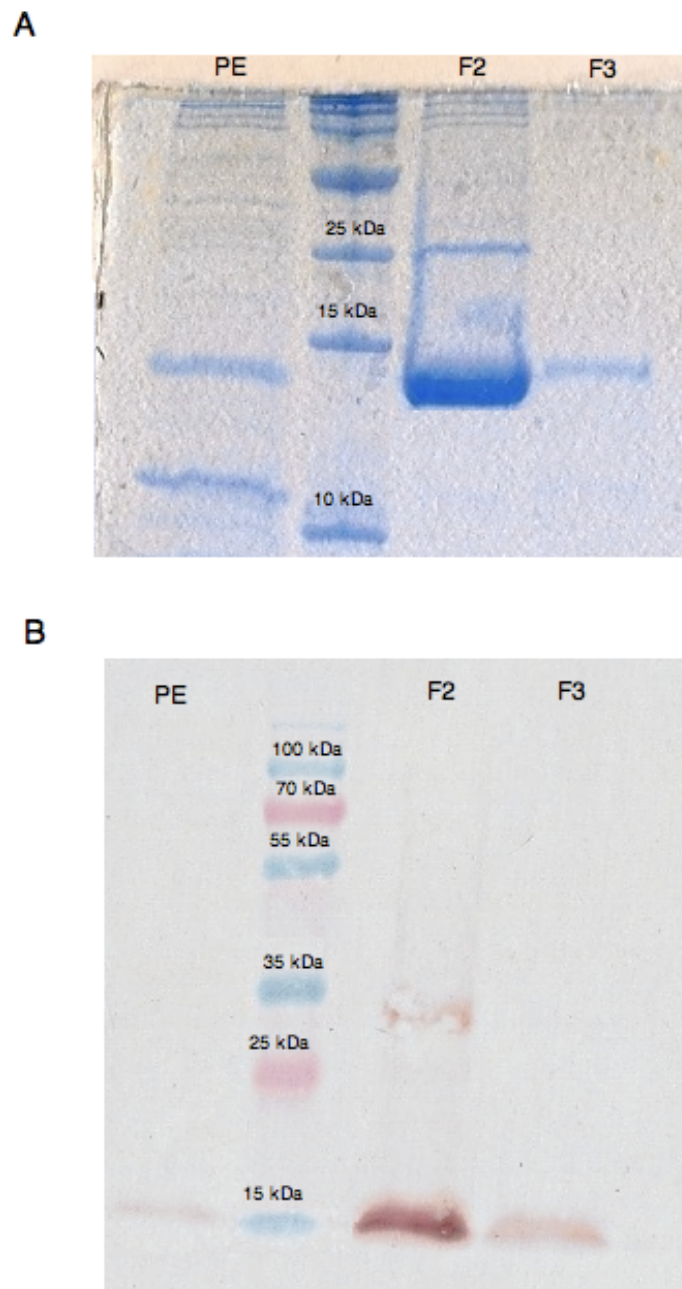


Figure 4. 12% tricine SDS-PAGE and western blot analysis. **(A)** Row one shows a 15kDa standard, row two indicates that most of the purified protein can be obtained on fraction 2 (F2) and row three shows the remnant protein during purification steps, **(B)** A commercial anti-HA antibody was used for the western blot detection, indicating the presence of the recombinant protein with a molecular weight ~15 kDa for the T43 vNAR.

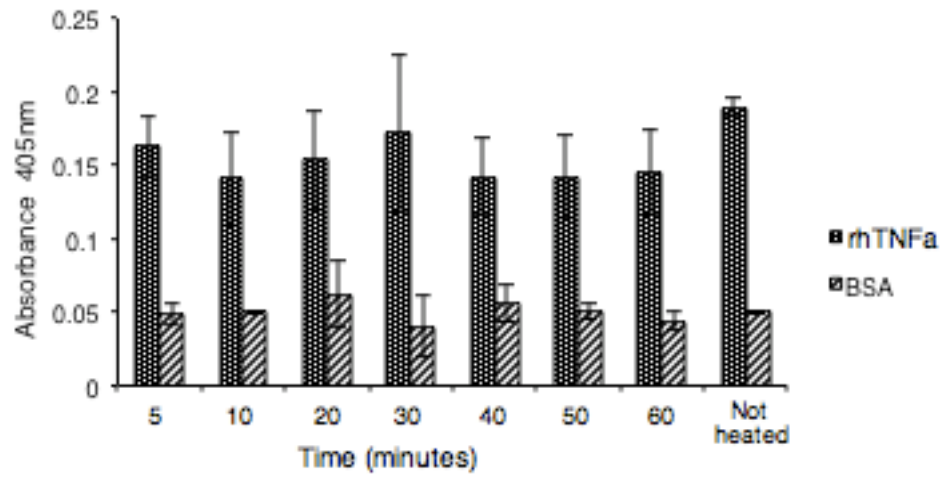


Figure 5. Thermostability ELISA assays. The purified protein vNAR T43 can maintain an 85% capacity of recognition of TNF α cytokine after being heated at 95°C for 60 min, BSA was used as negative antigen control and a non-heated vNAR T43 was used as a positive control.

In vitro neutralization assays

The cytotoxicity assay in L929 cells is a rapid and accurate bioassay with high sensitivity and reproducibility. The LD₅₀ detected in this assay for rhTNF α was 0.250 ng/mL. Accordingly, we used 5LD₅₀ (1.25 ng/mL or 0.07 nM) of rhTNF α for the inhibition assays. The IC₅₀ detected for the vNAR T43 was 9.78 μ g/mL (650 nM). However, the IC₅₀ for the F(ab')₂ was 1.62 μ g/mL (16 nM) (Fig. 6)

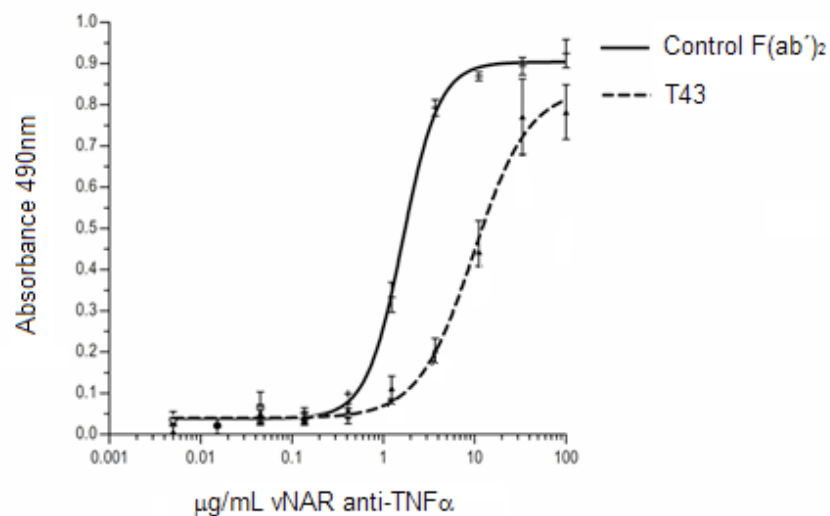


Figure 6. In vitro neutralization assays. The vNAR T43 has the capacity to neutralize the action of 5LD₅₀ (1.25 ng/mL) of the TNF α cytokine in L929 cells. The positive control was a horse F(ab')₂ previously isolated for Instituto BIOCLON, the assays were done in triplicate. Analysis was done with the GraphPad Prism v 4.02 program (GraphPad Inc.).

Discussion

Several immunotherapies based in conventional, i.e., full-length, formats have been developed as treatments for Crohn disease, rheumatoid arthritis, spondylosis and other diseases where the TNF cytokine needs to be controlled. Nevertheless, secondary effects were observed, e.g., anti-drug antibody production,¹⁵ renal and liver damage, and susceptibility to opportunistic infection.¹⁶ Many of these side effects are caused by the size of the immunotherapeutic and its immunogenicity, which can be due to non-human sequence source and the presence of the Fc region.^{12,17} Single domain antibodies (sdAbs) were proposed as an attractive alternative for therapeutics and diagnostics applications because of the small size and tissue penetration; high solubility; capacity to block the enzyme active site and the nanomolar affinity of the molecules.^{12,18}

In this report, vNAR T43, obtained using a phage display technique with an immune library from the horn shark *Heterodontus francisci*, shows a capacity for recognition and in vitro neutralization of the human TNF α cytokine. In addition, the vNAR T43 preserved 85% of its capacity of recognition in a thermostability assay after being heated over one hour. This feature can represent a pharmaceutical advantage over commercially available immunotherapeutic because freezing may not be necessary to conserve its integrity and functionality.

Because the expression level of the vNAR T43 protein using an *E. coli* TOP10F' system was low (700 μ g/L), analysis and experimentation with diverse variables that can affect the protein production, e.g., the preferential codon use, the high GC content of the vNAR DNA sequence, the stability of the mRNA, the protein extraction process and the host expression cells will be necessary.¹⁹

In the TNF α neutralization assay, we demonstrated the effectiveness of this single domain antibody in comparison with the F(ab')₂ at the same doses. It is important to consider that the F(ab')₂ fragment has two antigen recognition domains that can be translated in a double capture of the TNF α cytokine per molecule in comparison with the vNAR T43.

In this work, we made evident the efficacy of vNAR antibodies obtained using an immune library from a horn shark to recognize and neutralize the human TNF α cytokine in in vitro assays. The vNAR T43 protein also demonstrated a high thermostability, which can make it easier to handle and preserve compared with full-length of Fab antibody therapeutics. Furthermore, the vNAR T43 showed neutralization capacity of the human TNF α cytokine in comparison with a conventional antibody fragment, which has two binding sites per molecule. If we analyze the molar ratio between our T43 and the TNF α , it is clear that we need more than 9,000 molecules of T43 to neutralize 1 molecule of TNF α in an in vitro assay. For drug development, however, the molecule with the highest binding capacity is not always the best candidate, especially when the target is a cytokine

with pleiotropic effects. To demonstrate the utility of vNAR T43 as a therapeutic, it will be necessary to understand and define the pharmacokinetics and pharmacodynamics, toxicity and immunogenicity of the molecule. The preliminary results reported here encourage us to test the vNAR T43 protein in different in vivo TNF α models that can demonstrate the potential use as a treatment in autoimmune, allergic, and infectious diseases in which TNF α overproduction is mainly involved, e.g., septic shock.

Materials and Methods

Selection of vNAR fragments from an immune library

A male *Heterodontus francisci* shark was immunized with an emulsion of 200 μ L of a 1:1 mixture of complete Freund adjuvant (CFA) and of rhTNF α 1 μ g/mL (PEPROTECH, 300–01A) by intramuscular injection. The entire immunization protocol was performed over 20 weeks. Only the first immunization was performed with CFA. The boosts were administered every 15 d using incomplete Freund adjuvant (IFA). Seven days after the final immunization, the spleen was dissected, and total RNA was isolated using TRI reagent (SIGMA, T9424) and BCP reagent (SIGMA, B9673). The RNA concentration and purity were measured by optical density at 260 nm and 280 nm, respectively, and total RNA was stored at -80°C. Reverse transcription reactions were performed using Access RT-PCR System kit (PROMEGA, A1250) with 1 μ g of total RNA and a specific antisense primer (under IP protection). Hot start polymerase was used for PCR amplification of the vNAR fragments (Go Taq Hot Start Polymerase, PROMEGA, M5001). All primers used for cloning had the *Sfi*I restriction site. vNAR fragments were cleaned, and quantified. The enzymatic digestion was performed with 5U of *Sfi*I enzyme (PROMEGA, R4394) per μ g of DNA. Target DNA was incubated for 5 h at 50°C for digestion, the enzyme was heat inactivated at 65°C for 15 min, and DNA was stored at -80°C. vNAR fragments were cloned into the pCOMb3X vector (previously digested with *Sfi*I), using the T4 DNA ligase (10 U/mL, PROMEGA, M1804) at 1:1 molar equivalent (vector:insert). Positive and negative controls were digested vector with and without insert, respectively. The library was purified and transformed into *E. coli* ER2537 cells.

Immune library generation

Three hundred μ L of *E. coli* ER2537 cells was transformed and then washed with 1 mL of SOC medium (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.05% NaCl, 20 mM glucose). This method was performed two more times with 2 mL of SOC medium. The 5 mL culture was incubated at 37°C and shaken at 250 rpm for 1 h. Then, 10 mL of fresh SB medium and 3 μ L of 100 mg/mL carbenicillin were added. For

calculation of the transformed bacteria, 1 μ L and 100 μ L of cultured cells were plated on LB-Agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.2% agar) with carbenicillin at final concentration of 100 μ g/mL and incubated overnight at 37°C. The 15 mL culture was incubated for 1 h at 250 rpm. Then, 4.5 μ L of 100 mg/mL carbenicillin was added, and the culture was incubated for another hour at 37°C and 250 rpm.

After the last incubation step, the culture was infected with 2 mL of VCSM13 helper phage (STRATAGENE, 200251) for 15 min at room temperature. Then, 183 mL of SB medium and 92.5 μ L of 100 mg/mL carbenicillin were added. The culture was incubated for two hours at 37°C and 250 rpm. After this, 280 μ L of 50 mg/mL kanamycin was added, and the culture was incubated overnight at 37°C with constant agitation at 300 rpm. The following day, the culture was centrifugated at 3,000 g for 15 min at 4°C. The re-amplified phages that were present in the supernatant were precipitated by adding 8 g of PEG-8000 and 6 g of NaCl and were then incubated on ice for 30 min. The phages were pelleted at 15,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet containing the phages was resuspended in 2 mL of 1% BSA-1XPBS and filtered through a 0.2 μ m membrane.

Panning was performed according to Barbas.²⁰ Four panning rounds against 50 ng/well of rhTNF α were performed. In the first round, 5 washing steps were performed. Ten washing steps were performed in the second round, 15 washing steps were performed in the third, and 20 washing steps were performed in the fourth panning round.

vNAR expression and purification

Several isolated clones from the fourth panning round were analyzed by PCR reactions using the Ompseq (5'AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCAG 3') and Gback (5'GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC 3') primers at Tm 56°C.²⁰ The plasmids of PCR positive clones were isolated using commercial plasmid extraction kits (QIAGEN, 27104). The recombinant plasmids were electroporated into TOP10F' cells. For vNAR protein induction, a single colony was placed in 3 mL of SB medium with 100 μ g/mL carbenicillin. The culture was shaken at 37°C and 250 rpm overnight. The 3 mL of culture was then added to 47 mL of fresh medium with the same concentration of antibiotic and under the same culture conditions. After 4 h, the entire culture volume (50 mL) was added to 450 mL of fresh medium SB enriched with antibiotic. Once the 500 mL culture reached an optical density of 0.7 at 600 nm, 1 mL of 0.5 M IPTG (SIGMA, I5502) was added. The culture was induced for 12 h at 37°C and 300 rpm. This procedure was performed for each positive clone.

The cultures were centrifuged, and a periplasmic extraction was performed by osmotic shock according to Minsky.²¹ Supernatant was filtered with a 0.2 μ m cutoff

membrane and purified with metal affinity chromatography using HisTrap columns (ROCHE, 17-5247-01). The column was equilibrated with wash buffer (50 mM NaPO₄, 40 mM imidazole, 0.3 M NaCl, pH 8.0), and the periplasmic extract was loaded using a syringe at 1 mL/min constant flux. After sample loading was complete, 10 mL of wash buffer was added. The sample was eluted by adding 5 mL of elution buffer (50 mM NaPO₄, 500 mM imidazole, 0.3 M NaCl, pH 8.0), which was collected in 1 mL fractions. The second fraction, which contained the vNAR protein, was extensively dialyzed against 1X PBS before proceeding with the in vitro assay. This fraction was analyzed by ELISA with anti-HA-HRP antibody (ROCHE, 12013819001) and quantified using the Micro BCA kit (THERMO SCIENTIFIC, 23235).

ELISA assays

Three wells of an ELISA plate were coated with 50 µL of the second eluted fraction and incubated for 2 h at 37°C. After decanting and washing twice with 1X PBS-0.05% Tween (PBST), the wells were blocked with 150 µL of 3% BSA-1X PBS for 1 h at 37°C. The wells were decanted and washed 3 times with PBST, and 50 µL of anti-HA-HRP (ROCHE) diluted 1:1000 in 1% BSA-1X PBS was added and incubated for 1 h at 37°C. The plate was washed 3 times, and 50 µL of peroxidase substrate (20 mg/mL ABTS, 1X citrate buffer, 0.3% H₂O₂) was added to each well. The plate was incubated in the dark, and optical density was measured at 405 nm after 15 min. To determine whether the vNAR recognizes the antigen, a recognition ELISA was performed. For this assay, 250 ng/well of rhTNFα was added to an ELISA plate and incubated overnight at 4°C. After blocking with BSA and 3 washing steps with PBST, 100 µL of the second fraction of each clone was added and incubated for 2 h at 37°C. Three washing steps were performed, and 50 µL of anti-HA-HRP diluted 1:1,000 in 1% BSA-1X PBS was added and incubated for 1 h at 37°C. The antibody solution was discarded, and 3 final washing steps were performed. Then, 50 µL of ABTS substrate was added, and the plate was incubated in the dark until the color developed. The change of color was read at 405 nm in a Benchmark Microplate Reader (BIORAD, 170-6850).

SDS-PAGE and western blot

For precipitation, 1 mL of the purified vNAR was mixed with 250 µL of 100% TCA (SIGMA, T6399) and the tube was incubated overnight at 4°C. The sample was then centrifuged and washed with 1 mL of cold acetone. The pellet was resuspended in 30 µL of 2X loading buffer, boiled for 10 min at 95°C and then placed on ice. A 12% tricine SDS-PAGE was run at 50 mA for 2 h and stained with Coomassie brilliant blue, the gel was dehydrated using Gel Dryer model 583 (BIORAD, 1651745). Broad range protein molecular marker was used (BIORAD, V8491). For the western blot, the 12% tricine gel was transferred to a nitrocellulose membrane (BIORAD, 162-0115) for 1 h at 100 mA using a Trans Blot Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD, 170-3,940). The membrane was blocked

with 3% BSA-PBST for 1 h at room temperature with constant agitation. The blocking solution was discarded, and anti-HA-HRP diluted 1:1,000 in 1% BSA-PBST was added (ROCHE, 12013819001). The reaction was incubated for 1 h at 37°C with agitation. The antibody solution was discarded, and the membrane was washed three times with PBST for 2 min each. A page ruler plus prestained was used (Fermentas, SM1811). The membrane was incubated in a DAB solution (PIERCE, 34001) enhanced with NiSO_4 (1 mg/mL DAB dissolved in 50 mM Tris pH 7.2, 3% H_2O_2 , 0.08% NiSO_4) until color developed.

Thermostability of the vNAR

To demonstrate the thermostability of the vNAR, we added 50 μL per well of 1 $\mu\text{g/mL}$ rhTNF α to an ELISA plate in triplicate. The plate was incubated for 1 h at 37°C. Then, 150 μL per well of blocking solution was added and incubated for 1 h at 37°C. The blocking solution was decanted, and the plate was washed 3 times with PBST. Previously, the purified vNAR clone T43 was heated at 95°C for 5, 10, 20, 30, 40, 50 or 60 min. After heating, tubes were placed on ice. Fifty μL of heated protein was added per well and incubated for 1 h at 37°C. To determine whether the vNAR retained its antigen recognition capacity, we used 1% BSA as a negative control in each boiled sample. The solution was decanted, and washed 3 times with PBST, and 50 μL of anti-HA-HRP antibody diluted 1:1,000 in 1% BSA-1X PBS was added to each well. The plate was incubated for 1 h at 37°C. The solution was removed, and the wells were washed 3 times with PBST. Fifty μL of ABTS substrate per well was then added and incubated for 30 min at 37°C. The result was analyzed at 405 nm.

In vitro neutralization assays

To establish the neutralizing dose (ND_{50}) for each positive clone, the mouse L929 (ATCC, CCL-1) fibrosarcoma cell line was grown in Dulbecco modified eagle medium (GIBCO) supplemented with 10% horse serum and 1 $\mu\text{g/mL}$ actinomycin D. For each vNAR clone 24,000 cells per well were incubated in 96-well plate in triplicate for 6 h with 5% CO_2 and humidity. 5LD_{50} (1.25 ng/mL) of rhTNF α was added to each well, combined with serial dilutions of purified vNAR protein were used as follow: 100, 33.3, 11.1, 3.7, 1.2, 0.41, 0.13, 0.04, 0.015 $\mu\text{g/mL}$. The assay was incubated for 18 h with 5% CO_2 at 37°C. To measure cell survival, 20 μL /well of Cell Titer One (PROMEGA, G3582) was added and incubated at 30°C for 4 h, and the absorbance was read at 490 nm. An F(ab)_2 anti-TNF α (BIOCLON) previously proved was used to construct a reference curve for neutralization using the same concentration as the vNAR protein. The negative control was cells without vNAR antibodies. GraphPad Prism version 4.02 was used (GraphPad Inc.) for data analysis.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This research was supported by grants from SILANES S.A. de C.V. The content of this work is protected by the Application Patent Number 61/258,118 (SKGF Ref; 2099.0150000). CONACYT fellowship was given to Tanya Camacho.

References

1. Deffar K, Shi H, Li L, Wang X, Zhu X. Nanobodies: the new concept in antibody engineering. *Afr J Biotechnol* 2009; 8:2645-52.
2. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 2009; 198:157-74; PMID: [19529959](#); DOI: [10.1007/s00430-009-0116-7](#).
3. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med* 2003; 9:129-34; PMID: [12514726](#); DOI: [10.1038/nm0103-129](#).
4. Dooley H, Flajnik MF, Porter AJ. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Mol Immunol* 2003; 40:25-33; PMID: [12909128](#); DOI: [10.1016/S0161-5890\(03\)00084-1](#).
5. Roux KH, Greenberg AS, Greene L, Strelets L, Avila D, McKinney EC, et al. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11804-9; PMID: [9751746](#); DOI: [10.1073/pnas.95.20.11804](#).
6. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 1995; 374:168-73; PMID: [7877689](#); DOI: [10.1038/374168a0](#).
7. Nuttall SD, Krishnan UV, Hattarki M, De Gori R, Irving RA, Hudson PJ. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Mol Immunol* 2001; 38:313-26; PMID: [11566324](#); DOI: [10.1016/S0161-5890\(01\)00057-8](#).

8. Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF, Wilson IA. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science* 2004; 305:1770-3; PMID: [15319492](#); DOI: [10.1126/science.1101148](#).
9. Simmons DP, Streltsov VA, Dolezal O, Hudson PJ, Coley AM, Foley M, et al. Shark IgNAR antibody mimotopes target a murine immunoglobulin through extended CDR3 loop structures. *Proteins* 2008; 71:119-30; PMID: [17932913](#); DOI: [10.1002/prot.21663](#).
10. Nuttall SD, Krishnan UV, Doughty L, Nathanielsz A, Ally N, Pike RN, et al. A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Lett* 2002; 516:80-6; PMID: [11959108](#); DOI: [10.1016/S0014-5793\(02\)02506-1](#).
11. Juarez K, Dubberke G, Lugo P, Koch-Nolte F, Buck F, Haag F, et al. Monoclonal antibodies for the identification and purification of vNAR domains and IgNAR immunoglobulins from the horn shark *Heterodontus francisci*. *Hybridoma (Larchmt)* 2011; 30:323-9; PMID: [21851231](#); DOI: [10.1089/hyb.2011.0010](#).
12. Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10:1212-24; PMID: [19876789](#).
13. Gay RD, Clarke AW, Elgundi Z, Domagala T, Simpson RJ, Le NB, et al. Anti-TNF α domain antibody construct CEP-37247: Full antibody functionality at half the size. *MAbs* 2010; 2:625-38; PMID: [20930515](#); DOI: [10.4161/mabs.2.6.13493](#).
14. Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, et al. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1856-66; PMID: [16736523](#); DOI: [10.1002/art.21827](#).
15. Ducourau E, Mulleman D, Paintaud G, Miow Lin DC, Lauféron F, Ternant D, et al. Antibodies toward infliximab are associated with low infliximab concentration at treatment initiation and poor infliximab maintenance in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2011; 13:R105; PMID: [21708018](#); DOI: [10.1186/ar3386](#).
16. Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011; 25:549-67; PMID: [22137924](#); DOI: [10.1016/j.berh.2011.10.004](#).
17. Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* 2005; 20:17-29; PMID: [16258237](#).

18. Fennell BJ, Darmanin-Sheehan A, Hufton SE, Calabro V, Wu L, Müller MR, et al. Dissection of the IgNAR V domain: molecular scanning and orthologue database mining define novel IgNAR hallmarks and affinity maturation mechanisms. *J Mol Biol* 2010; 400:155-70; PMID: [20450918](#); DOI: [10.1016/j.jmb.2010.04.061](#).
19. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci* 2009; 18:936-48; PMID: [19384993](#); DOI: [10.1002/pro.102](#).
20. Barbas CF, Burton DR, Scott JK. Phage Display: A Laboratory Manual. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2001.
21. Minsky A, Summers RG, Knowles JR. Secretion of beta-lactamase into the periplasm of *Escherichia coli*: evidence for a distinct release step associated with a conformational change. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4180-4; PMID: [3520569](#); DOI: [10.1073/pnas.83.12.4180](#).

V.1.2 Optimización del uso de condones del gen *t43* para *P. pastoris*.

En la Figura 10, se muestra una comparación de los genes T43 que corresponde a la secuencia original de fragmento de anticuerpo vNAR tal como fue aislado del tiburón y del mismo gen pero con el uso de codón optimizado para *P. pastoris*. En rojo, se muestran las bases que fueron modificadas en el gen optimizado el cual fue denominado T43P. Se modificó aproximadamente el 60% de la secuencia genética. El gen nativo contenía un 43.12% en GC, además de contener repeticiones de codones raros que reducen la eficiencia de traducción y que podrían separar la maquinaria de traducción. La disminución del alto contenido en GC permite aumentar el tiempo de vida media del mRNA; además, la eliminación de estructuras tipo "loop", permiten una mejor unión del ribosoma así como la estabilidad del mRNA.

T43P	1	GCTTCACTTGACCAGACTTTGAGAACCGCCACCAGAGAGACCGGAGAATCCTTGACCGTT
T43	1	GCAAGCCTGGACCAACACTAAGAACGGCAACGAGAGAGACAGGCGAATCCCTGACCGTT
T43P	61	AATGCGTCCTTGTGCGAIGCCAACTATGGTTTGTACTCTACATCCGTTATAGAAACAAT
T43	61	AACTGCGTCCTCGTTGATGCTAACTATGGTTTGTACAGCACATCTTGGTACCGCAATAAT
T43P	121	CCAGGATCTACTGATAGAGAACATATTACAATCGGTGGAAGATACGTTGAGTCCGTC AAC
T43	121	CCGGGTTCAACAGACAGGGAACACATAACGATTGGCGGACGATATGTTGAATCAGTCAAC
T43P	181	AAGGGTGCTAAGTCTTTTCTCTTCAAATTAAGGATATGACCGTTGAAGACTCTGGA ACT
T43	181	AAAGGAGCAAAGTCATTTTCTCTGCAAATCAAGGACATGACAGTTGAAGACAGTGGCACC
T43P	241	TACTATTGTAAA GCCAGAGCCACTTCTGGTTACACTCCTCACGACGGTGCTGGAACAGTT
T43	241	TATTACTGCAAAGCGCGAGCTACATCTGGGTATACCCCCACGACGGAGCTGGCACCGTG
T43P	301	TTGACAGTTAATAGTCTT
T43	301	CTGACTGTGAACTCTCTA

Figura 10. Comparación entre las secuencias de los genes T43 (vNAR nativo) y T43P (vNAR con codones optimizados para *P. pastoris*).

V.1.3 Diseño del gen T43ch

Se analizaron las secuencias publicadas en Kabat (1991) y en el banco de genes del NCBI (National Center of Biotechnology Information), para obtener la secuencia de la región bisagra y la región CH2 de la fracción cristizable de la inmunoglobulina IgG1, ambas secuencias de humano. En la Figura 11, se muestra la secuencia de la proteína T43ch. En negro se subraya la secuencia correspondiente al vNAR, en amarillo la secuencia de la región bisagra de humano y en azul, la región CH2 de humano. La región bisagra tiene cisteínas que permiten la formación de enlaces disulfuro entre dos cadenas T43P-B-CH2, permitiendo la formación de dímeros del anticuerpo quimérico si existe un correcto plegamiento después de la expresión. El gen T43ch fue obtenido por síntesis química.

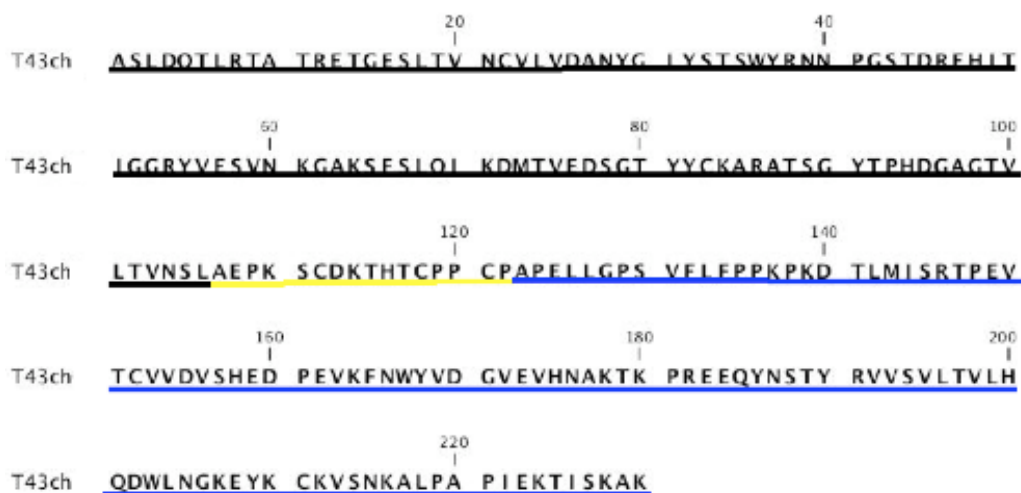


Figura 11. Secuencia de proteína del anticuerpo quimérico T43ch. vNAR anti-TNF α : Subrayado en negro, región bisagra: subrayada en amarillo, región CH2: subrayada en azul.

V.1.4 Clonación del gen *t43ch* en el vector pPICZ α A.

Empleando el gen sintético *t43ch*, se procedió a realizar las PCR bajo las condiciones mencionadas en la Tabla II para agregar a la secuencia los sitios de corte de las enzimas XbaI y XhoI. En la Figura 12a, se muestra la imagen de un gel de agarosa al 1.8% con la amplificación por PCR del fragmento *t43ch*, de aproximadamente 660 pb (carril 2). La Figura 12b, corresponde a un gel de agarosa al 1%, en el carril 1 se muestra el vector sin digerir, en el carril 2, el vector pPICZ digerido y limpio; en 12c, se muestra el plásmido extraído pPICZ α A de cuatro colonias al azar después de la transformación. Finalmente en 12d, se muestra el vector pPICZ α A antes y después de su linealización con liticasa.

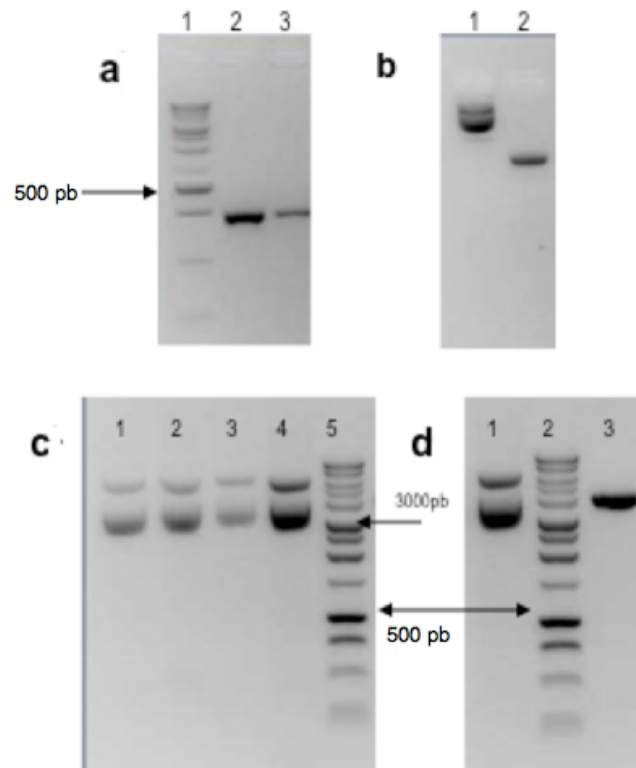


Figura 12. Amplificación de fragmentos y digestión para clonar en pPICZ α A. **a:** Geles de agarosa 1.8%. En el carril 1 escalera de 100pb; carril 2 y 3, fragmentos *t43ch* y *t43ch* digeridos y limpios. **b:** Gel 1%. En el carril 1 vector pPICZ α A sin digerir; carril 2, pPICZ α A 3 μ l de vector digerido y limpio. **c:** Carriles 1 a 4; plásmido pPICZ α A purificado por lisis alcalina de las colonias positivas por PCR; carril 5 escalera de 1kb. **d:** Plásmidos pPICZ α A linealizado. Carril 1: pPICZ α A sin linealizar; carril 2: escalera de 1kb; carril 3 y 4: pPICZ α A linealizado para *t43ch*.

De las colonias de *P. pastoris* positivas, se obtuvo la secuencia génica y ésta se tradujo en el software CLC DNA Workbench 5. En la Figura 13, se encuentra el alineamiento entre la proteína T43ch teórica y la secuencia obtenida de la clona 10. En el caso de la colonia 10 se puede observar que la secuencia está clonada en correcto marco de lectura, desde el inicio de la secuencia señal y la secuencia de la proteína no tiene sustituciones de aminoácidos.

Una vez obtenida la secuencia se procedió a la producción del anticuerpo quimérico T43ch en fermentaciones en lote agitado, para producir una mayor cantidad de proteína y emplearla en ensayos *in vitro*.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
T43chOpt	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----ASLDQ
Tch-10	MRFFKFLLLF	IRSILRISCS	SQHYNRKMKR	HKFRAEAVIG	YSDLEGDFDV	AVLPFSNSTN	NGLLFINTTI	ASIAAKEEGV	SLEKRASLDQ
consensus	MRFFKFLLLF	IRSILRISCS	SQHYNRKMKR	HKFRAEAVIG	YSDLEGDFDV	AVLPFSNSTN	NGLLFINTTI	ASIAAKEEGV	SLEKRASLDQ
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
T43chOpt	TLRTATRETG	ESLTVNCVLV	DANYGLYSTS	WYRNPPGSTD	REHITIGGRY	VESVNGGAKS	FSLQIKDMTV	EDSGTYCYCA	RATSGYTPHD
Tch-10	TLRTATRETG	ESLTVNCVLV	DANYGLYSTS	WYRNPPGSTD	REHITIGGRY	VESVNGGAKS	FSLQIKDMTV	EDSGTYCYCA	RATSGYTPHD
consensus	TLRTATRETG	ESLTVNCVLV	DANYGLYSTS	WYRNPPGSTD	REHITIGGRY	VESVNGGAKS	FSLQIKDMTV	EDSGTYCYCA	RATSGYTPHD
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
T43chOpt	GAGTVLTVNS	LAEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	LLGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ
Tch-10	GAGTVLTVNS	LAEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	LLGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ
consensus	GAGTVLTVNS	LAEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	LLGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ
	280	290	300	310	320	330	340		
T43chOpt	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAK-----	-----	-----		
Tch-10	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKSLEQK	LISEEDLNSA	VDHHHHHH*		
consensus	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKSLEQK	LISEEDLNSA	VDHHHHHH		

Figura 13. Alineamiento de proteína teórica y de la colonia positiva a inserto. vNAR T43: subrayado en negro; región bisagra: subrayado en amarillo; CH2: subrayado en azul.

V.1.5 Bioproceso de producción del anticuerpo quimérico T43ch en lote agitado.

Se inocularon 7 L de medio mínimo (Fermentation Basal Salts Medium) suplementado con sales traza (PTM1 Trace salts) según las condiciones del manual Pichia Fermentation Process Guidelines (Invitrogen).

Se monitoreó el crecimiento celular midiendo la densidad óptica a 600 nm y el peso húmedo durante un total de 72 horas totales. Como se observa en la Figura 14, a lo largo del cultivo hubo crecimiento celular, el cual depende de la administración de una fuente de carbono (las primeras 32 horas se empleó glicerol y las 40 horas siguientes se aplicó metanol); esto indica que las células fueron capaces de utilizar los componentes del medio para suplir sus necesidades fisiológicas. La biomasa final generada fue de 450 g/L.

En la Figura 15, se muestran las gráficas de pH, TOD (tensión de oxígeno disuelto), temperatura y RPM que se controlaron a lo largo del cultivo. Como se observa, fue posible controlar el pH en un rango de 5.0 ± 0.3 y la temperatura en $30 \pm 4^\circ \text{C}$. Sin embargo, fue más difícil controlar las RPM y la TOD, debido a que el crecimiento celular demandó una gran cantidad de oxígeno. Una forma de aumentar el porcentaje de oxígeno disuelto es aumentando las RPM, por esta razón se observan oscilaciones de 600 a 350 rpm en las primeras 48 horas de crecimiento (cuando el cultivo está creciendo usando glicerol como fuente de carbono) y de 500 a 700 rpm cuando el cultivo se estaba alimentando con metanol.

En la Figura 15b, correspondiente al oxígeno disuelto, se observan 7 picos principales que representan cada uno de los pulsos de metanol que se aplicaron al cultivo con la finalidad de permitirle adaptarse a esta nueva fuente de carbono. Estos picos observados son usados como señal de que el cultivo ha agotado la primer cantidad de metanol aplicada, y que la actividad metabólica ha disminuido por falta de fuente de carbono, por lo tanto, al aplicar otros pulsos de metanol se permite a la célula seguir con sus actividades metabólicas. Es importante mencionar que la aplicación de los pulsos fue la siguiente: tres alimentaciones de

30 minutos con un flujo de 0.8 mL/min y se agregaron 15 mL de sales PTM₁; después, se aplicaron dos alimentaciones de 1 hora cada una con flujo constante de 0.8 mL/min y se agregaron 15 mL de sales PTM₁; las últimas dos alimentaciones, fueron a un flujo de 1.1 mL/min por el resto de la inducción (32 horas) y se agregaron 15 mL de sales PTM₁, por lo tanto se observan en la gráfica de oxígeno disuelto siete picos, cada uno correspondiente a las alimentaciones antes mencionadas.

Al finalizar el cultivo, las células fueron centrifugadas y el sobrenadante se separó en alícuotas que se congelaron para su purificación.

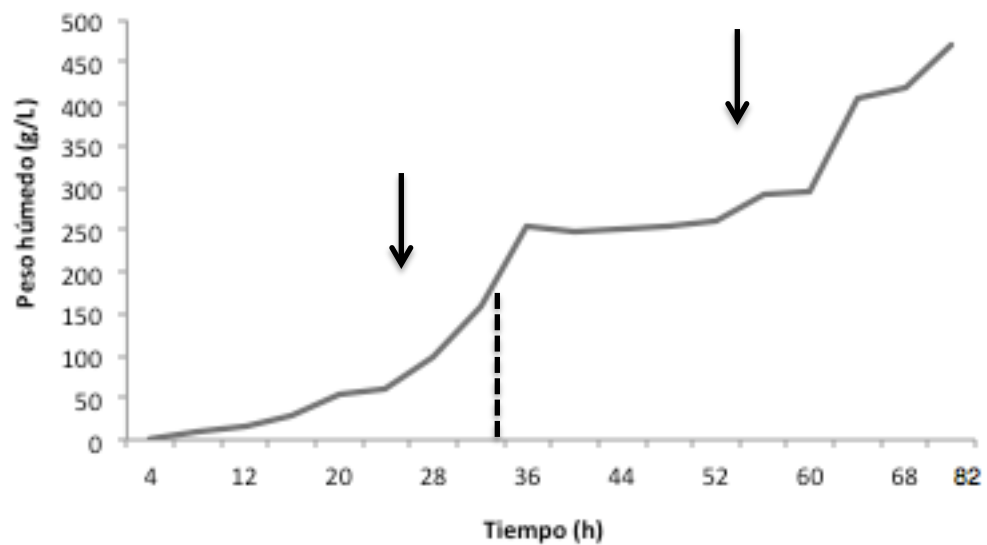


Figura 14. Curva de crecimiento inducción 7 L *Pichia pastoris*. Representada en peso húmedo. Como se puede observar existen dos fases de crecimiento, la primera al crecer el cultivo en glicerol como fuente de carbono (primeras 32 horas) y la segunda cuando se aplicó metanol como inductor (últimas 40 horas).

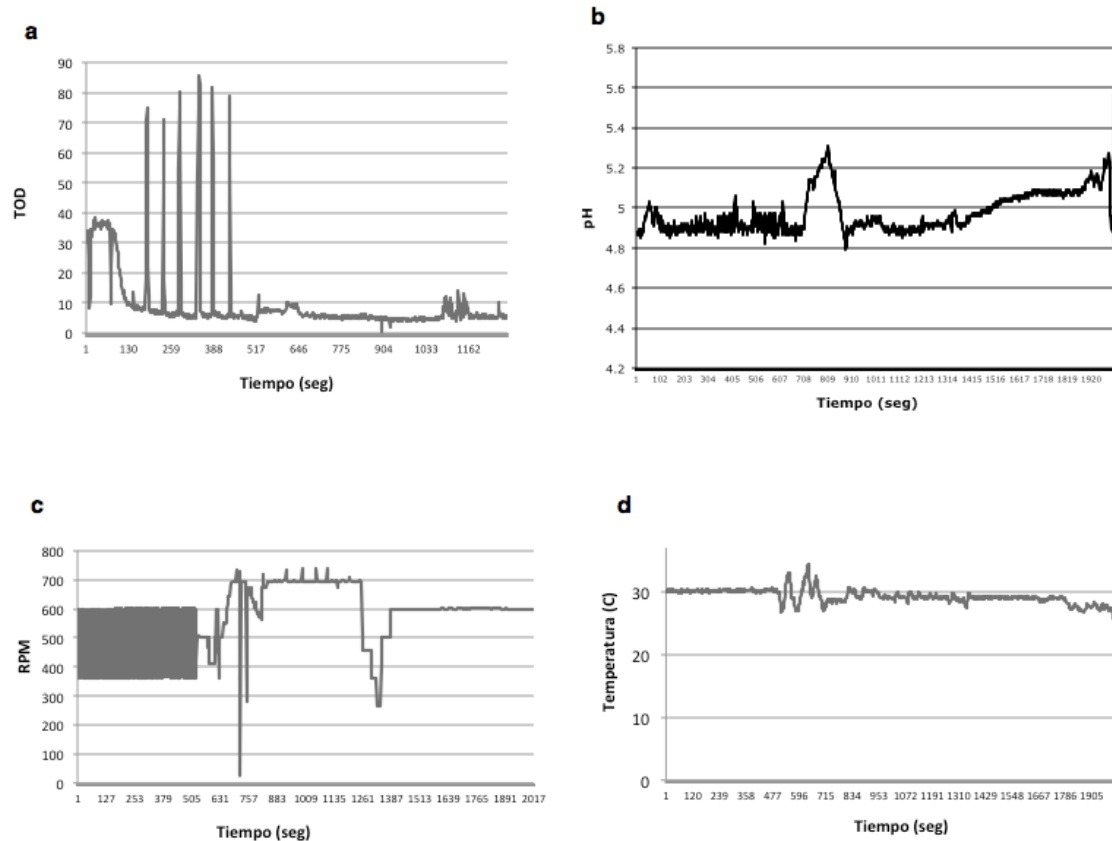


Figura 15. Gráficas de monitoreo de las condiciones físicas en la inducción de 10L *Pichia pastoris*. **a:** gráfica de pH, se mantuvo en $5.0 \pm .5$. **b:** Gráfica de oxígeno disuelto, se muestran los siete picos correspondientes a las alimentaciones con metanol. **c:** grafica de temperatura se mantuvo en $30 \pm 4^\circ \text{C}$. **d:** grafica de RPM, se mantuvieron entre 600 a 350rpm en las primeras 48 horas y entre 500 a 700rpm el resto de la inducción.

V.1.6 Geles desnaturizante de poliacrilamida SDS-PAGE.

En la Figura 14, se muestra un gel 12% glicina-SDS-PAGE, en el cual se cargaron 20 μL por pozo de cada una de las eluciones (previo a la precipitación de 1 mL como se indica en el apartado (II.2.10.1). Como se puede observar, existen tres bandas que corresponden respectivamente al anticuerpo quimérico $\sim 56 \text{ kDa}$, una banda de $\sim 28 \text{ kDa}$ al anticuerpo de forma monomérica y una banda mayoritaria de $\sim 14 \text{ kDa}$ que corresponde al anticuerpo desnaturizado, que

pueden ser resultado del empleo de agentes desnaturizantes (β -mercaptoetanol) empleados en este gel. En el primer carril, marcado como S/P, se cargó el medio de cultivo sin purificar.

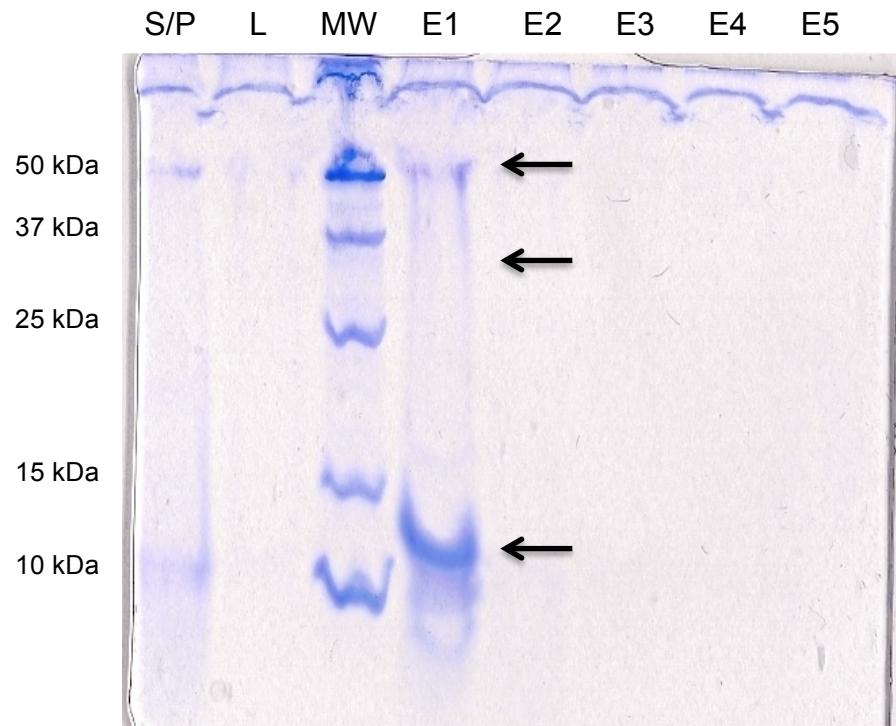


Figura 16. SDS-PAGE proteína T43ch. S/P: medio de cultivo sin purificar; L: lavado; MW: marcado de peso molecular; E1: fracción 1; E2: fracción 2; E3: fracción 3; E4: fracción 4; E5: fracción 5. Se obtuvieron al menos tres proteínas mayoritarias de ~56, ~28 y ~14 kDa. En la elusión 1 se observa una mayor concentración de proteína.

V.1.7 Inmunodetección por Western blot y cuantificación de proteína.

En la Figura 15, se muestra un Western Blot donde se analizaron 75 μ L y 150 μ L de la fracción E2 analizada en el gel de poliacrilamida en una membrana de nitrocelulosa usando un anticuerpo anti-cMyc (Roche). En el Western blot, existen al menos tres bandas que corresponden respectivamente al anticuerpo quimérico

~56 kDa, una banda de ~ 28 kDa al anticuerpo de forma monomérica y una banda mayoritaria de ~14 kDa que corresponde al anticuerpo desnaturalizado. Debido a que se observaron estos formatos del anticuerpo quimérico, se decidió analizar muestras de sobrenadante obtenido directamente del biorreactor para verificar la presencia del anticuerpo en su forma funcional.

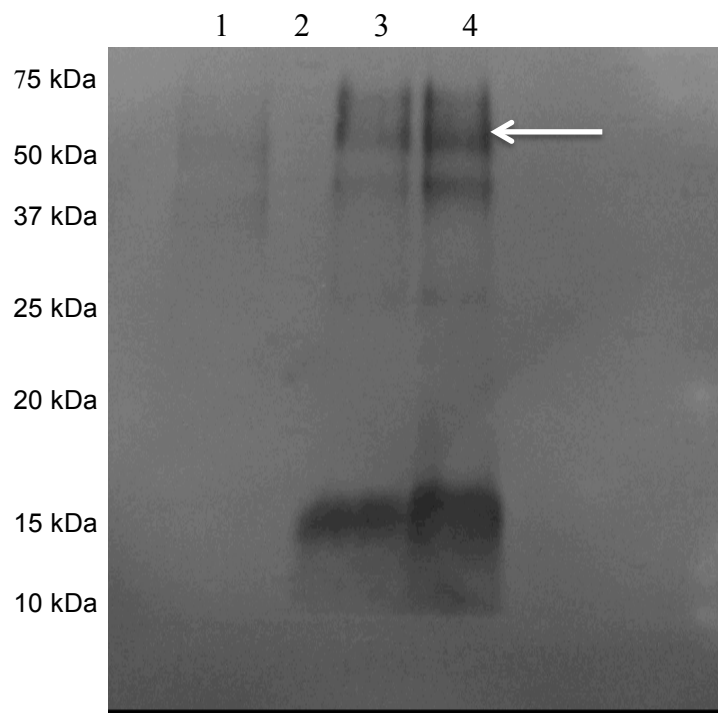


Figura 17. Western blot anticuerpo T43ch purificado. En el carril 1: Proteína sin purificar; carril 3: 75 µL de proteína purificada (E2) ; carril 4: 150 µL de proteína purificada (E2).

V.1.8 ELISA de sobrenadante durante el bioproceso.

La Figura 16, corresponde al resultado de la ELISA de reconocimiento del anticuerpo T43ch contra $\text{TNF}\alpha$. Se probaron muestras obtenidas cada 4 horas a partir de las 28 horas de cultivo. A las 32 horas se iniciaron las alimentaciones con metanol, por lo tanto, se esperaba observar un aumento sostenido en el reconocimiento del anticuerpo, sin embargo, se observa que cuando se alimenta el metanol aumenta el valor de absorbancia, por lo tanto se puede suponer que existe mayor cantidad de anticuerpo T43ch que reconoce a la citocina, y después de los pulsos disminuye la absorbancia. Esto puede deberse a la alimentación en pulsos empleada y a la evaporación del metanol en el reactor. La fermentación se detuvo a las 72 horas, que es cuando se tiene una mayor absorbancia, por lo tanto se decidió realizar los ensayos de neutralización.

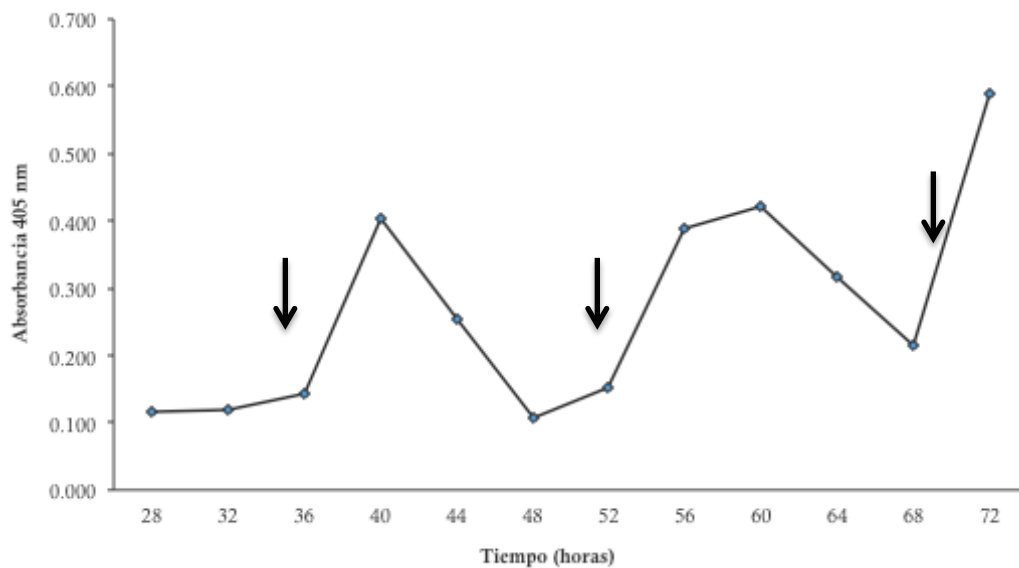


Figura 18. ELISA de reconocimiento contra $\text{TNF}\alpha$ usando medio de cultivo tomado del biorreactor. Se analizaron desde las 28 horas de inducción hasta las 72 horas de inducción. Con flechas se señalan las horas en las cuales se realizaron los pulsos de metanol.

V.1.9 Ensayo de citotoxicidad de $\text{TNF}\alpha$ en células L929.

Se probó en un ensayo de citotoxicidad un lote de $\text{TNF}\alpha$ a emplear en el ensayo de neutralización, con el objetivo de asegurar el efecto de la citocina en las células L929. En la Figura 16, se muestra la curva de citotoxicidad. La dosis efectiva media determinada fue de 0.6 ng/mL. El coeficiente de correlación fue de 0.97. Se emplearon 3ED_{50} para el ensayo de neutralización.

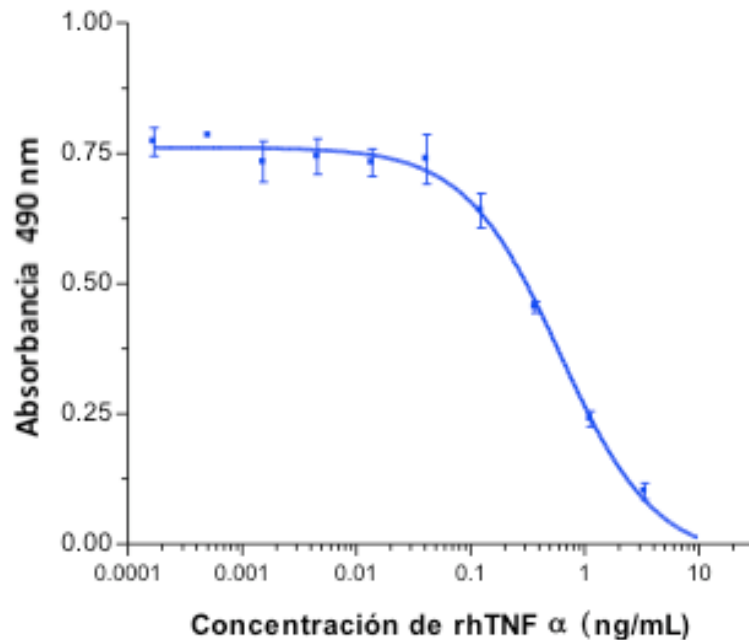


Figura 19. Curva de citotoxicidad de $\text{TNF}\alpha$ en células L929. Se determinó la dosis efectiva media de 0.6 ng/mL. Los datos fueron analizados con el programa Graph-Pad Prism versión 6.

V.1.10 Ensayo de neutralización de $\text{TNF}\alpha$ empleando el anticuerpo T43ch.

Para el ensayo de neutralización se emplearon 3ED_{50} de la citocina $\text{TNF}\alpha$ en células L929 y diluciones seriadas del anticuerpo quimérico T43ch. Como control positivo se empleó el anticuerpo $\text{F(ab}')_2$ de caballo (Bioclon). La dosis neutralizante media para el anticuerpo T43ch es de $24.94 \mu\text{g/mL}$ y para el $\text{F(ab}')_2$ es de $0.092 \mu\text{g/mL}$, por lo tanto se necesitan aproximadamente 270 veces más anticuerpo T43ch que $\text{F(ab}')_2$. El coeficiente de correlación para este ensayo fue de 0.98.

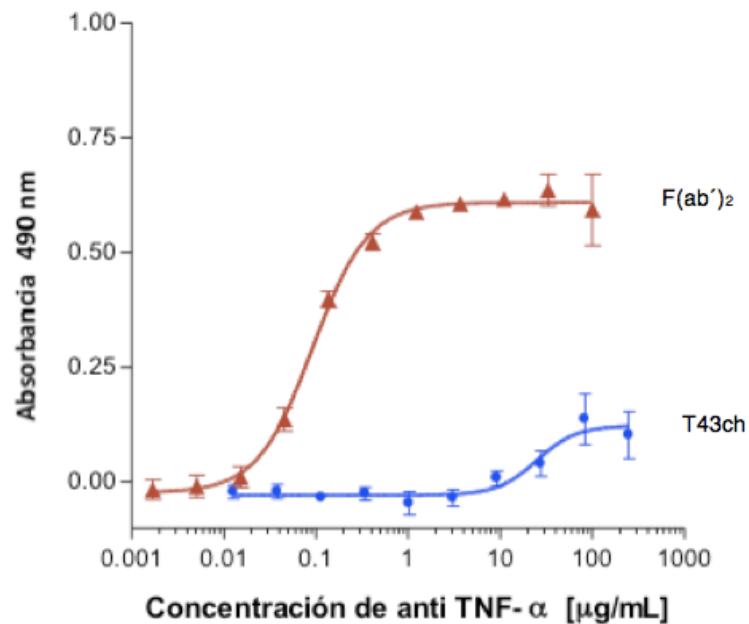


Figura 20. Curva de neutralización de 3ED_{50} (1.8 ng/mL) de $\text{rhTNF}\alpha$ en células L929. En rojo: $\text{F(ab}')_2$; en azul: T43ch. Ensayo realizado por triplicado. Graph-Pad Prism versión 6.

VI.1 DISCUSION

Se ha reportado que la optimización de codones dependiendo del hospedero, puede mejorar la cantidad de proteína producida. Asimismo, disminuir el alto contenido en GC y una disminución en la formación de estructuras tipo "loop" que impiden la conservación de la burbuja de transcripción, pueden aumentar el tiempo de vida media del ARNm y por lo tanto la cantidad de proteína producida (Sivashanmugam et al. 2009). En el caso de la secuencia del gen *t43* nativo, existía un alto contenido de GC, por lo tanto, se modificó el 60% de la secuencia total para el uso preferencial de codones en *Pichia pastoris*.

Con el gen *t43* optimizado, se diseñó el anticuerpo quimérico, compuesto por el gen *t43* optimizado, la región bisagra y la región CH2 de la IgG1 humana. La construcción se realizó por síntesis y el sentido es de amino a carboxilo, para dejar los fragmentos vNAR libres y que tenga su capacidad de reconocimiento del antígeno. El gen quimérico *t43ch* se clonó en el vector de expresión pPICZ α A y se electroporó en *P. pastoris* X-33. La cepa utilizada se clasifica como Mut⁺ es decir, que tiene la capacidad de crecer en metanol debido a que cuenta con las enzimas alcohol oxidasa. Se verificó la correcta integración del gen en la levadura, considerando desde la secuencia señal.

Se realizaron fermentaciones en lote agitado con volumen final de 7 L y el medio mínimo rico en sales (FSBM). En la Figura 12, se muestra la curva de crecimiento del cultivo durante las 72 horas que duró la fermentación. Generalmente, las fermentaciones usando *Pichia* constan de tres fases: la primer fase en que las levaduras utilizan el glicerol contenido en el medio FSBM que dura aproximadamente 24 horas; la segunda fase donde se alimenta glicerol (por aproximadamente 4 horas), que permite el incremento de biomasa del cultivo hasta 200 g/L de peso húmedo; la tercera fase, es la de inducción, donde se cambia la fuente de carbono por metanol. La gran biomasa generada en la fase dos del cultivo, emplea las enzimas AOX1 para utilizar el metanol y esto promueve la producción del anticuerpo T43ch. En este trabajo, la inducción con metanol se realizó en pulsos que aumentaban tanto en el flujo de metanol aplicado como en

el tiempo. Las primeras 32 horas el cultivo creció usando como única fuente de carbono el glicerol y la inducción de metanol se llevó a cabo por 40 horas.

En la Figura 13, se muestran las condiciones físicas que se regularon a lo largo de la fermentación. El pH y la temperatura fueron regulados correctamente y las variaciones fueron mínimas, en cambio, la tensión de oxígeno disuelto, fue difícil de controlar debido a la alta demanda metabólica. Después de la segunda fase de crecimiento, se inició la alimentación con oxígeno puro, sin embargo, por la demanda metabólica y por el tiempo de respuesta del sensor de oxígeno, la administración de oxígeno directo se terminó después de 24 horas de cultivo, manteniendo las siguientes horas sólo la oxigenación del medio de cultivo únicamente por la agitación. Como se observa en la figura 13c, existen 7 picos en la TOD, estos son empleados como monitoreo de que el cultivo se ha aclimatado a los pulsos de metanol que se le aplican. En este caso, se hicieron siete alimentaciones de metanol por lo tanto hay siete picos en la TOD.

El anticuerpo T43ch se centrifugó y purificó del medio de cultivo. En la Figura 14, se muestra un gel de poliacrilamida donde se corrieron muestras correspondientes a la purificación del anticuerpo T43ch. Se pueden observar en el gel, al menos dos bandas una de 58 kDa y otra de 14 kDa, que corresponden al anticuerpo quimérico en su forma dimérica y su forma hidrolizada. Se debe mejorar la calidad del gel de poliacrilamida, así como realizar un gel en condiciones no desnaturizantes.

En el Western blot (Figura 15), que fue revelado con el anticuerpo anti-cMyc se pueden observar tres bandas: de 58 kDa, 28 kDa y 14 kDa, que corresponderían a las formas diméricas, monoméricas y desnaturizadas del anticuerpo T43ch. La banda de 14 kDa correspondería al CH2 que mantiene el epítipo cMyc, por eso es detectado en el western blot, esto indicaría que existe hidrólisis del anticuerpo. Se realizó un western blot utilizando un anticuerpo con capacidad de reconocer vNAR's (no mostrado) y se detectó el fragmento de 14 kDa que correspondería al dominio sencillo vNAR T43.

Para verificar que se estaba produciendo anticuerpo quimérico en el transcurso de la fermentación, se realizó un ELISA de reconocimiento a $\text{TNF}\alpha$. El resultado se muestra en la Figura 16. Se analizaron de la hora 28 a la 72, se señalan con flechas el inicio de los pulsos de metanol que se aplicaron al cultivo. Después de la aplicación de metanol se observa un aumento en la absorbancia que significa que existe anticuerpo T43ch en el medio de cultivo con capacidad de reconocer a la citocina, cuando se deja descansar el cultivo y no se aplica metanol, hay una disminución en las absorbancias lo cual puede indicar que existe degradación del anticuerpo, lo cual es apoyado por los resultados mostrados en el gel de poliacrilamida y el Western blot. La cepa X-33, contiene las proteasas vacuolares de forma natural: Proteasa A: (codificada por el gen *pep4*) aspartil proteasa tipo Pepsina; Proteasa B: (codificada por el gen *prb1*) serin proteasa; Carboxipeptidasa Y: serin exopeptidasa que funcionan a pH óptimo de 4.5 – 6, la fermentación se realizó a pH de 5, lo cual favorece la acción de estas enzimas. La Proteasa A, que actúa tipo pepsina podría hidrolizar los enlaces que se encuentran en la región bisagra y por lo tanto desnaturalizar el anticuerpo quimérico disminuyendo su potencia. Como opción se pueden emplear cepas de *P. pastoris* que tienen eliminados los genes codificantes de estas proteasas, por ejemplo, la cepa SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), SMD1165 (*his4 prb1*), o SMD1168 (*his4 pep4*). También, es posible agregar en el medio de cultivo inhibidor de proteasas o casamino aminoácidos, sin embargo, el empleo de estos últimos puede representar un aumento en los costos de producción (Cregg et al. 1989; Cereghino y Gregg, 2000).

Previamente, en expresiones en lote en matraces utilizando *P. pastoris* con el gen *t43* nativo (es decir sin optimización de codones) se obtuvo un rendimiento aproximado de 8 mg/L; usando un sistema de expresión bacteriano se obtuvieron 700 $\mu\text{g/L}$, por lo tanto era necesario mejorar la expresión de estos genes. El rendimiento obtenido después de la fermentación en lote agitado para el anticuerpo quimérico fue de 3.3 mg/L. Este bajo rendimiento puede ser causado por el efecto de las proteasas mencionadas, además, la transcripción y traducción

de genes heterólogos en *P. pastoris*, en altos niveles superan la capacidad de secreción del anticuerpo, favoreciendo la acumulación del anticuerpo mal plegamiento y llevando a estrés y pérdida del producto (Gasser y Mattanovich, 2007).

En el ensayo de citotoxicidad, se trabajo con las células L929 y a diferentes concentraciones de la citocina $\text{TNF}\alpha$. Se determinó la dosis efectiva media siendo de 0.6 ng/mL. Se neutralizaron tres dosis efectivas (1.8 ng/mL) con diluciones seriadas del anticuerpo T43ch y se empleó como control un F(ab')_2 previamente descrito. Se determinó una dosis neutralizante de 24.94 $\mu\text{g/mL}$ para el anticuerpo quimérico T43ch; de 0.092 $\mu\text{g/mL}$ para el F(ab') y de 9.78 $\mu\text{g/mL}$ para el dominio sencillo T43 para neutralizar 5DL_{50} (Camacho-Villegas, *en prensa*).

Si comparamos estos resultados, es evidente que se necesita más anticuerpo T43ch para neutralizar la misma dosis, sin embargo, hay que considerar que con el anticuerpo purificado con el cual se trabajo (fracción E2), existe una mezcla de formatos de anticuerpo, y sólo cerca del 25% corresponde al formato dimérico. Por lo tanto, es importante mejorar las condiciones de purificación y de inducción en biorreactor, de forma que se obtenga el formato quimérico puro y concentrado. Para lograr este objetivo, se puede emplear una cepa mutante de *P. pastoris* sin proteasas vacuolares, modificar las condiciones de inducción con metanol en el biorreactor y el método de purificación. También se debe determinar la afinidad y la aidez del anticuerpo quimérico contra la citocina, como posible estrategia de optimización.

CAPITULO III

Obtención de anticuerpos de dominio sencillo neutralizantes de la citocina humana TGF β

VII. 1 Introducción

VII.1.1 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)

El TGF β es una proteína homodimérica multifuncional de 25 kDa (Figura 19), producida por un amplio rango de células que incluyen macrófagos, células asesinas naturales (NK), células T, células B, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales (Letterio y Roberts, 1998).

Controla la proliferación celular y la diferenciación, el desarrollo embrionario, la respuesta inmune y reparación de tejido. Tienen distintos patrones de expresión y sus funciones son mediadas por los mismos receptores.

Existen tres isoformas de TGF β en mamíferos 1, 2 y 3; se localizan en diferentes tejidos, plaquetas y hueso donde estos factores son más abundantes. Los TGF β 4 y 5 se aislaron en aves y anfibios respectivamente. Existe una homología de 70% en la secuencia de aminoácidos entre los TGF β 1 y TGF β 2, y de 79% entre los TGF β 2 y TGF β 3 (Massagué et al 1987).

Esta citocina es un importante regulador de la inflamación, ya que posee propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, lo cual dependerá tanto del ambiente en que se encuentre como de su concentración. Cuando el TGF- β es liberado en concentraciones bajas, tiene propiedades proinflamatorias (respuesta tipo Th1) que incluyen su capacidad para reclutar monocitos, células T y neutrófilos al sitio de inflamación durante una infección, a través de la modulación de la expresión de moléculas de adhesión celular. Sin embargo, a altas concentraciones es antiinflamatorio (respuesta tipo Th2), suprimiendo la

producción del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y del óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos, inhibe la producción de interferón-gamma (IFN- γ) y TNF α en las células asesinas naturales (NK) e indirectamente disminuye la expresión de antígenos clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) los cuales son estimulados por IFN γ .

El TGF β 1 puede ser considerado como el prototipo de una citocina multifuncional, debido a los efectos que tiene sobre los diferentes blancos celulares. Es el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varios tipos de células malignas. Sin embargo, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales, de células no epiteliales y ciertos tipos de células mesenquimales (Sporn y Roberts, 1992). Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC) por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales, además de aumentar la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de MEC (Massagué, 1998).

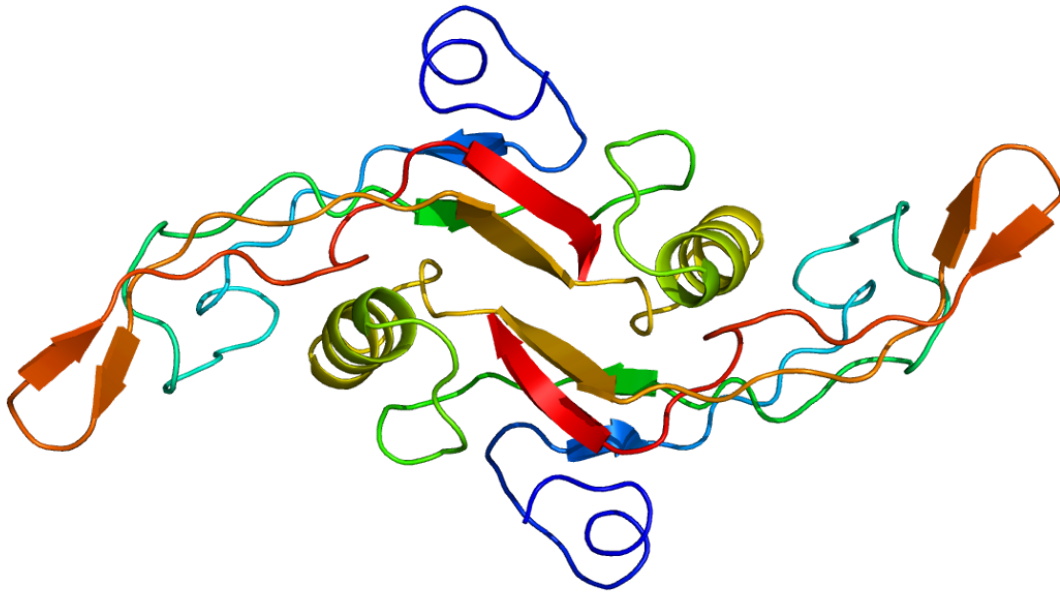


Figura 21. Representación de la citocina TGF β 1. Homodímero de 112 aminoácidos compuesto por hojas plegadas β unido por enlaces disulfuro.

Estos factores poseen receptores de tres tipos. El de tipo I, se denomina

TGF β RI, el de tipo II se conoce como TGF β RII, dentro de los de tipo III el betaglucaño es el más importante. Cuando el receptor tipo II se une al ligando, activa al receptor tipo I (por fosforilación), y éste último inicia la cascada de reacciones celulares originadas por el factor. En esta cascada, es fundamental la activación por fosforilación de las proteínas MAD (SMAD de *Drosophila*) que inician una serie de pasos que culmina con la regulación de la expresión de genes relacionados con el ciclo celular como Myc, Rb y p53 (Jones et al. 2001)

VII.1.2 Ruta de señalización

Normalmente, el TGF- β es almacenado en forma latente dentro de la célula como un homodímero, el cual se encuentra unido en forma no covalente con la proteína asociada a latencia (LAP) y a la proteína de unión al TGF β (LTBP). La unión de la citocina a su receptor requiere la remoción de LAP, proceso que es catalizado *in vivo* por plasmina o trombospondina e *in vitro* puede ser inducida por cambios en el pH o la temperatura (Chin et al. 2004).

El TGF β también regula la diferenciación celular, especialmente de las células del sistema inmune, por ejemplo se sabe que es un fuerte inhibidor de la activación de las células T y de la secreción de anticuerpos por las células B. Dentro de otras de sus acciones, se incluyen la habilidad para controlar la diferenciación celular, la apoptosis y la producción de matriz extracelular (MEC); así como la estimulación de la quimiotaxis de células como fibroblastos, linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Sporn et al. 1992).

El betaglucaño (receptor tipo III), es un proteoglucaño de membrana que sirve como co-receptor de diversos miembros de la superfamilia del TGF. Los betaglucaños tienen una selectividad mayor por TGF β 2 y la Inhibina A que por TGF β 1, y cuando se desarrollan complejos ligando-receptor con diversos receptores del tipo II tienen diferentes funciones biológicas, variando de regulación positiva del efecto y función de TGF β , haciendo débil la unión a su receptor así como regulando negativamente sobre todo cuando se forma un complejo del receptor Activina tipo II, inhibina A y betaglucaño, donde se pierde la función

biológica del TGF β 2 (Vilchis-Landeros et al. 2001).

El betaglucano se puede definir como un potente neutralizador de las acciones del TGF β en el organismo, resaltándolo como un posible agente terapéutico en cáncer, inflamación crónica, xenotransplantes que es cuando el TGF β juega un rol central en la fisiopatología de estas situaciones (Vilchis-Landeros et al. 2001); en enfermedades como fibrosis, cicatrización anormal, enfermedades autoinmunes, enfermedades parasitarias y cáncer (Barnard et al. 1990).

En tuberculosis, se ha demostrado que TGF β regula la respuesta mediada por células bloqueando la proliferación de CD4 $^{+}$, disminuyendo la producción de IL-2, suprimiendo la expresión de receptor de IFN y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II). Además, induce la producción de colágeno promoviendo la fibrosis observada en tuberculosis pulmonar avanzada (Toossi et al. 1994; Toossi et al. 1998;). En ensayos *in vivo* con ratones infectados en etapa tardía y progresiva de infección con *M. tuberculosis* (segundo y tercer mes post-infección), se empleó β glucano y se observó que la disminución de TGF β permite el incremento de TNF α , IFN γ , IL-2, iNOS y una menor expresión de IL-4, lo que disminuye la fibrosis en pulmón y la cuenta bacilar, sin embargo, se observó inflamación y se propuso el empleo combinado de ciclooxigenasa 2, produciendo un efecto sinérgico en la eliminación bacilar y evitando la inflamación excesiva (Hernández-Pando et al. 2006).

El hecho que muchos de estos eventos puedan ser bloqueados por la administración de agentes neutralizantes de TGF β no solo confirma la relevancia de las citocinas en las patologías, sino que plantea la necesidad de agentes terapéuticos neutralizantes de esta citocina. En el caso de tuberculosis, el empleo combinado de antimicrobianos e inmunoterapia podrían resultar en un tratamiento óptimo para humanos (Hernández-Pando et al. 2006).

VII.2 MATERIALES Y METODO

Previamente, en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, se generó una biblioteca no inmune procedente de un tiburón macho *Heterodontus francisci*, la cual fue empleada en este trabajo para la selección de anticuerpos de dominio sencillo vNAR que tuvieran capacidad de reconocimiento y neutralización de la citocina humana TGF β . A continuación, se describen los métodos utilizados para cumplir este objetivo.

VII.2.1 Re-amplificación de la Biblioteca No Inmune.

Se incubó un cultivo de 2 mL de medio SB conteniendo 2 μ L de células ER2537 electrocompetentes sin antibiótico y se incubaron en agitación a 250 rpm hasta que la densidad óptica del cultivo a 600nm fue de 1. Las células se infectaron con 10 μ L de fagos de la biblioteca no inmune y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la infección. Se agregaron 10 μ L de ampicilina (100 mg/mL).

Para calcular el tamaño de la biblioteca expresada en unidades formadoras de colonia, se sembraron 1 μ L y 10 μ L de una dilución 10^{-4} del cultivo anterior de 2 mL, en placas de LB agar con ampicilina (20 μ g/mL). Se incubaron durante toda la noche a 37° C. Para calcular el número de transformantes se multiplicó el número de colonias por el volumen de cultivo y se dividió entre el volumen de siembra. El cultivo se incubó 1 hora a 37° C y 300 rpm, después se agregaron 15 μ L de ampicilina (100 mg/mL) y se incubó con agitación durante 1 hora.

Se agregaron 2 mL de fago ayudador VCSM13 y 148 mL de medio SB precalentado conteniendo 75 μ L de ampicilina (100 mg/mL). Se agitó por 2 horas a 300 rpm y 37° C y se añadieron 280 μ L de kanamicina (SIGMA) y se continuó

agitando toda la noche a 300 rpm y 37° C. Para precipitar los fagos amplificados, se centrifugó el cultivo a 4,500 rpm por 20 minutos a 4° C, el sobrenadante se decantó y se transfirió a tubos limpios que contienen 8 gr de polietilenglicol-8000 (PEG-8000) y 6 gr de NaCl, se agitó a 300 rpm por 5 minutos para disolver los sólidos, posteriormente se incubó en hielo 30 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm por 30 minutos, una vez precipitados, se decantó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 2 mL de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS 1X. Se transfirió a tubos de 2 mL y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se filtró en condiciones de asepsia y con una membrana de poro 0.2 μm .

VII.2.2 Rondas de selección contra la citocina TGF β empleando una biblioteca no inmune.

Los fagos obtenidos después de la re-amplificación de la biblioteca (apartado III.2.1), se pusieron en contacto con 50 μL de citocina TGF β inmovilizada (5 $\mu\text{g/mL}$ concentración inicial) en dos pozos de una placa de ELISA (COSTAR), previamente incubada 1 hora a 37° C y bloqueada por 1 hora a 37° C con 150 μL de BSA 3%-PBS 1X. Se incubaron 50 μL de fagos a 37° C por 1 hora. Posteriormente, se iniciaron los lavados astringentes en el siguiente orden: 7 lavados para la ronda 1; 14 lavados para la ronda 2 y 21 lavados para la ronda 3. Dichos lavados implican subir y bajar 150 μL de Tween 0.05%-PBS 1X por pozo, cinco veces y se dejó reposar 5 minutos entre cada lavado. Este proceso se repitió en cada una de las rondas el número de veces anteriormente mencionado.

Después de las rondas de lavados correspondientes, se agregaron 50 μL de tripsina 10 $\mu\text{g/mL}$ (DIFCO) en BSA 1% y se incubó 30 minutos a 37° C. Se lavó esta solución subiendo y bajando el volumen vigorosamente 10 veces y con estos fagos se infectó un cultivo de 2 mL de células *E. coli* cepa ER2537 que se encontraban a una densidad óptica de 1 a 600 nm. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la infección de las bacterias por los fagos

seleccionados. El cultivo se transfirió a un tubo de 50 mL conteniendo 6 mL de medio SB y 1.6 μ L de carbencilina (100 mg/mL), y se incubó 1 h a 37° C agitándose a 250 rpm. Para calcular la cantidad de clonas que fueron infectadas por los fagos seleccionados (titulación de salida), se creció un cultivo de 2 mL de células ER2537 a una densidad óptica de 1, se tomaron de este cultivo, se tomaron 50 μ L (previo a la incubación) y fueron infectados con 1 μ L de una dilución 10^{-8} de fagos obtenidos después de las rondas de lavados astringentes. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se sembraron en placas de LB agar con carbencilina (100 μ g/mL). Las placas se incubaron toda la noche a 37° C. Para hacer la "titulación de entrada", se diluyeron 2 μ L los fagos precipitados después de cada amplificación y 200 μ L de medio SB, y se sembraron 100 μ L y 10 μ L de esta dilución en placas de medio LB con carbencilina toda la noche a 37° C. El cultivo se incubó 1 hora a 37° C agitándose a 250 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 2 μ L de carbencilina (100 mg/mL) y se incubó otra hora. Este cultivo fue transferido a un matraz de 500 mL y se le añadió 1 mL de fago ayudador VCSM13, 91 mL de medio SB y 46 μ L de carbencilina (100 mg/mL). Se incubó por 2 horas a 37° C y 250 rpm. Se agregaron 140 μ L de kanamicina (50 mg/mL-SIGMA) y se incubó toda la noche. Este proceso se repitió en cada una de las rondas de selección, sólo que, para las siguientes rondas, se empleó un pozo de la placa de ELISA conteniendo el antígeno inmovilizado y se fueron aumentando los lavados astringentes. De colonias aisladas es posible hacer PCR de colonia para seleccionar clonas que tengan inserto.

VII.2.3 Búsqueda de clonas positivas por PCR al fragmento de dominio sencillo vNAR.

VII.2.3.1 PCR de colonia.

De las colonias aisladas de la última ronda de selección (denominada R3), se hicieron aislaron 32 colonias y se realizaron reacciones de PCR empleando

oligonucleótidos que amplifican un fragmento de aproximadamente 600 pb (Tabla III) a una concentración final de 0.8 μ M. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la Tabla IV.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (5 mg/mL). De las clonas con inserto, se incubó un cultivo de 6 mL de medio SB con 6 μ L de carbencilina (100 μ g/mL), con la finalidad de aislar plásmido pCOMb3X y poder transformar células de *E. coli* cepa BL21(DE3), dado que esta cepa es capaz de producir proteína de forma soluble.

Tabla III. Oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos vNAR clonados en el vector pCOMb3X.

Nombre	Sentido	Secuencia
Ompseq	5' $\rightarrow$ 3'	AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G
Gback	3' $\rightarrow$ 5'	GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC

Tabla IV. Condiciones de PCR para amplificar fragmentos vNAR de colonia.

Numero de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	94	7 minutos
30	94	45 segundos
	56	45 segundos
	72	45 segundos

1

72

10 minutos

VII.2.3.2 Aislamiento de plásmido.

Se empleó el método de lisis alcalina (Sambrook y Russel, 2001). Los plásmidos fueron suspendidos en agua libre de nucleasas y cuantificados en espectrofotómetro NanoVue (GE, Healthcare Life Sciences). Se almacenaron hasta su uso a -20° C.

VII.2.3.3 Secuenciación de plásmidos

Para verificar que los plásmidos procedentes de las colonias seleccionadas contienen el inserto de dominio sencillo vNAR se enviaron a secuenciar a la empresa SeqXcel (San Diego, California). Las secuencias se analizaron para comprobar que mantenían las características previamente reportadas para los vNAR (Nuttall et al. 2002), un correcto marco de lectura sin codones de paro a lo largo de la secuencia y que fueran novedosas a las previamente aisladas en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas dle CICESE.

VII.2.4 Expresión de fragmentos de dominio sencillo vNAR.

Los plásmidos de colonias positivas a fragmento y con secuencias no reportadas anteriormente, se electroporaron en 50 µL de células electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) y 500 ng aproximadamente de plásmido previamente enfriado por 1 min en un tubo de 1.5 mL. Se electroporó empleando una celda de 0.2 cm previamente enfriada se electroporó bajo las siguientes condiciones: 2.0 kv, 25 µF, 200 omhs 5 ms. Las células transformadas fueron recuperadas en 3 mL de medio de cultivo SOC (ver Anexo II) e incubadas a 37 °C, 300 rpm por 1 h. Se tomaron 600 µL del cultivo anterior y se incubaron en 6 mL de medio SB con 6 µL de carbencilina (100 µg/mL) y se incubó toda la noche a 37° C y 250 rpm. De este preinóculo, se inoculó a una proporción de 1/100 y se

incubaron los cultivos de 50 mL de medio SB con 20 mM de $MgCl_2$ y 50 μ L de carbencilina (100 μ g/mL), a una densidad óptica de 0.7 - 0.9 a 600 nm. Para inducir la producción de proteína, se agregó el inductor IPTG (Promega) a una concentración final de 1 mM y se incubó por 5 horas a 37° C y 300 rpm.

VII.2.5 Extracción periplásmica de proteína vNAR.

Para obtener la proteína vNAR, se centrifugaron los cultivos y el paquete celular fue resuspendido en 1/40 de volumen en solución de choque osmótico PPB (Tris-HCl 30 mM pH 8, sacarosa 20%), se agregó lentamente EDTA a concentración final de 0.1 mM en agitación constante y en frío, se continuó con la agitación bajo las mismas condiciones por 20 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos para concentrar las células. El sobrenadante, que contiene proteínas, fue transferido a un tubo limpio. Al paquete celular, se le agregó 1/40 de $MgSO_4$ 5 mM frío y se resuspendió, después se incubó por 20 minutos en hielo bajo agitación constante. Para concentrar las células, se centrifugó a 5,000 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se mezcló con el primer sobrenadante colectado.

VII.2.6 ELISA de expresión.

Se pusieron por triplicado, 50 μ L de la proteína obtenida por choque osmótico en pozos de ELISA y se incubó 1 hora a 37° C. Posteriormente, se descartó la solución y se bloquearon los pozos con 150 μ L de BSA 3%-PBS 1X incubando 1 hora a 37° C. Se lavaron los pozos con Tween 0.05%-PBS 1X tres veces. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo anti-HA (ROCHE) diluido 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X, y se incubó 1 hora a 37° C. Se lavó tres veces con Tween 0.05%-PBS 1X y se añadieron 50 μ L de sustrato para peroxidasa (ABTS 20 mg/mL, buffer de citratos 1X, H_2O_2 0.3%). La placa fue leída después de 20 minutos a 405 nm en un lector de ELISA (BioRad).

VII.2.7 ELISA de reconocimiento citocina - vNAR.

Se inmovilizaron por triplicado 50 μ L de cada una de las citocinas (5 μ g/mL) en una placa de ELISA y para cada clona, y se incubó la placa durante 1 hora a 37° C. Se descartó el sobrenadante y se bloqueó la placa con 150 μ L de BSA 3%-PBS 1X, incubando 1 hora a 37° C. Se lavaron los pozos con Tween 0.05%-PBS 1X tres veces. Se agregaron 50 μ L de la extracción periplásmica de las clonas positivas y se incubó 1 hora a 37° C. Se decantó y lavó tres veces. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo anti-HA (ROCHE) diluido 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X y se incubó 1 hora a 37° C. Se lavó tres veces y se añadieron 50 μ L de sustrato para peroxidasa. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

VII.2.8 Purificación de anticuerpo vNAR por cromatografía de afinidad a metales.

Una vez seleccionadas las clonas que expresan proteínas vNAR y que reconocen a la citocina, se indujo un volumen de expresión de 500 mL y se purificó el extracto celular mediante cromatografía de afinidad a metales, empleando 1 mL de la resina Ni-NTA SuperFlow (Qiagen).

Fue necesario preparar la muestra ajustando la concentración de imidazol hasta una concentración final de 20 mM. La muestra se filtró en una membrana de 0.20 μ m. Se lavó la columna con 5 mL de agua destilada y se equilibró pasando 5 volúmenes de buffer de unión (de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM, pH 7.4) a un flujo de 1 mL/min. El volumen que pasó por la columna se leyó a una longitud de onda de 280 nm hasta obtener valores de cero. Se aplicó la muestra pre-tratada con imidazol (20 mM) a un flujo de 1 mL/min. Se lavó la columna con buffer de lavado hasta que la absorbancia estuvo en una línea basal (generalmente después de 10-15 mL).

Para eluir, se empleó buffer de elución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 250 mM, pH 7.4), generalmente fueron suficientes 10 mL para que la proteína fuera eluida, la muestra se colectó en alícuotas de 1 mL. Se leyó cada mililitro del eluido a 280 nm en espectrofotómetro. Para limpiar la columna se lavó

con buffer de unión hasta que la absorbancia fue de cero (aproximadamente 20 volúmenes), para almacenarla se agregó etanol al 20%.

VII.2.9 Análisis de proteína recombinante vNAR expresada en *E. coli* BL21(DE3).

VII.2.9.1 Preparación de las muestras.

De las muestras obtenidas en la purificación, se precipitaron 500 μ L fueron precipitados empleando 75 μ L de ácido tricloroacético (TCA 100%). Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C y se centrifugó a 13, 000 rpm por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el paquete precipitado se lavó con 1 mL de acetona fría. Se centrifugó bajo las mismas condiciones y se decantó el sobrenadante. El pellet se seco a temperatura ambiente. Se resuspendió en buffer Laemmli 2x (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004 %). Finalmente, se incubaron las muestras por 10 min a 90° C, se incubaron en hielo.

VII.2.9.2 Geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo a lo previamente descrito por Schägger (2006). Las condiciones de corrida fueron de 50 mA con un voltaje constante de 150 Volts, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Los geles fueron teñidos toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante empleando azul de Coomassie. Se destiñó el gel hasta obtener el contraste deseado utilizando una solución de desteñido (etanol 40%, ácido acético 10%). Los geles se secaron empleando un desecador Gel Dryer (BioRad) a 80° C por 1 hora.

VII.2.9.3 Cuantificación de anticuerpo empleando ácido bicinconínico.

Se empleó el kit de cuantificación de proteína Micro BCA protein assay (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante usando BSA como estándar de comparación y cuantificando a 562 nm. Se empleó el protocolo para placa de ELISA.

Una vez que se seleccionó la clona que expresa un vNAR que tiene capacidad de reconocer in vitro a la citocina TGF β , se realizaron fermentaciones de 10 L para producir una mayor cantidad de proteína como se describe en el siguiente apartado .

VII.2.10 Bioproceso de producción en lote agitado de un dominio sencillo de tiburón neutralizante de la citocina humana TGF β , expresado en *Escherichia coli*.

Una vez, determinada la capacidad de expresión y reconocimiento de las clonas seleccionadas, se decidió producir una mayor cantidad de proteína empleando biorreactores de jarra de vidrio con capacidad de 15 L.

VII.2.10.1 Desarrollo de inóculos

Partiendo de una colonia aislada, se inocularon tres matraces de 1 L conteniendo 200 mL de medio SB y 100 μ g/mL de carbencilina concentración final cada uno. Se incubaron toda la noche a 37° C y 250 rpm. Al día siguiente, se verificó la densidad óptica a 600 nm (aproximadamente 2.5) y se seleccionó un cultivo para inocular el biorreactor. Se tomaron muestras antes y después de la inoculación.

VII.2.10.2 Descripción del Biorreactor

En este caso, se trabajo con una jarra de fermentación, con volumen nominal de 15 L, con un volumen de trabajo mínimo de 5 L y máximo de 12 L. El sistema de agitación esta constituido por dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas planas cada una y un motor de velocidad variable (rango de velocidad de 0-800

rpm), cuenta con dispersor de aire de orificio, la temperatura se controló mediante baño maría. Los sensores empleados fueron; sensor de pH (rango de 0-14), sensor de oxígeno disuelto (rango de 0-500%) y sensor de temperatura (rango de 0-150° C). La espuma fue controlada mediante adiciones manuales de 5 mL de silicón grado alimenticio al 10%.

VII.2.10.3 Biocontrolador.

Lleva a cabo la medición y control de las variables durante el proceso de fermentación, es decir, monitorea y controla la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la adición de anti-espumante y la velocidad de agitación. Este funciona mediante un control tipo Proporcional-Integral-Derivativo (PID). El biocontrolador empleado en este trabajo es un diseño especialmente fabricado para suplir las necesidades de la Planta Piloto del IIB de la UNAM.

VII.2.10.4 Bioconsola.

La bioconsola recibe las señales del biocontrolador para llevar a cabo el control de las variables del bioproceso. Esta equipada, con una bomba de adición para ácido y otra para adición de base, que operan de forma automática.

Un rotámetro, con el cual se regula de forma manual el flujo de aire; dos válvulas solenoides para controlar la entrada de agua al sistema de control de temperatura por baño maría.

VII.2.10.5 Sistema de cómputo.

Los datos se obtuvieron con el programa LabView Signal Express, cada 2 minutos. Este sistema permite llevar a cabo el monitoreo en tiempo real y el control remoto del sistema de fermentación. Así como, el registro de los datos y el gráfico del comportamiento de cada uno de los parámetros del cultivo.

VII.2.10.6 Preparación del biorreactor e instalación.

Se esterilizaron en autoclave vertical (marca Yamato, SM510), 10 L de medio SB a pH 7.4, con calor húmedo y 120° C por 20 minutos. Los electrodos de oxígeno disuelto (calibrado al 100% de saturación de aire); pH (calibrado a dos puntos) y termómetro fueron calibrados y se esterilizaron montados en el biorreactor.

Se dejó polarizando el electrodo de oxígeno toda la noche, una vez que el medio de cultivo del biorreactor se enfrió, el medio de cultivo se aireó con agitación a 400 rpm y presión positiva de aire para asegurar que las lecturas realizadas fueran las adecuadas.

También se adaptó una toma de gas LP para la instalación de un mechero Bunsen que permitió mantener estéril el área durante la inoculación y la toma de muestra.

VII.2.10.7 Condiciones de cultivo en biorreactor.

Al día siguiente, se agregó bajo condiciones de asepsia el antibiótico carbencilina (100 µg/mL) y MgCl₂ 1mM, así como el inóculo de 200 mL procedente del matraz. Se tomó una muestra antes de inocular el biorreactor para usarla como blanco en las mediciones; otra muestra después de la inoculación y una muestra cada dos horas de cultivo. Se analizó la densidad óptica a 600 nm para verificar la cinética de crecimiento del cultivo y se siguió analizando hasta el final del mismo, después de aproximadamente 18 horas.

Se creció el cultivo a condiciones controladas de TOD (tensión de oxígeno disuelto) a 30% ± 10 (con respecto al valor de saturación en aire) con incrementos automáticos de velocidad de agitación; temperatura a 37° C ± 1; agitación a RPM (revoluciones por minuto) entre 250 – 550 y pH de 7.4 ± 1. Para mantener la temperatura del cultivo, los biorreactores se mantuvieron en baño maría.

Se indujo el cultivo cuando la densidad óptica leída a 600 nm fue de 0.5, que es cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial, empleando el inductor IPTG a una concentración final de 0.5 mM. La inducción se llevó a cabo a una

temperatura de 30° C por 12 horas, manteniendo el resto de las condiciones controladas.

VII.2.11 Obtención y purificación de anticuerpo vNAR producido en biorreactor.

El cultivo fue centrifugado empleando una centrifuga Sorvall RC BIOS Centrifuge a 10,000 rpm a 4° C durante por 20 minutos en lotes de 400 mL. El pellet se conservó a -20° C y se procedió a la extracción periplásmica en lotes de 1 L cada uno. Se procedió conforme a lo descrito en el apartado II.2.5. El extracto final (conteniendo la mezcla de PPB y MgSO₄) se centrifugó a 10, 000 rpm por 30 minutos para eliminar bacterias y se purificó por gravedad empleando 4 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN) conforme a lo descrito en el apartado VII.2.8, incrementando cuatro veces los volúmenes de buffer de lavado y de elusión anteriormente mencionados. Las fracciones fueron eluidas en 4 mL cada una y finalmente se juntaron todas las eluciones.

VII.2.12 Análisis de anticuerpo de dominio sencillo vNAR producido en biorreactor.

VII.2.12.1 Geles desnaturalizantes de poliacrilamida de anticuerpo T-1 producido en biorreactor de lote agitado y diálisis.

Se realizaron geles de poliacrilamida empleando las fracciones de proteína eluida después de la purificación (como se describe en los apartados III.2.9)

VII.2.12.2 Cuantificación de anticuerpo T-1 producido en biorreactores.

La fracción eluida que contenía la mayor cantidad de proteína, se dializó extensivamente contra un volumen aproximadamente 200 veces mayor de PBS 1X, haciendo un cambio de amortiguador cada dos horas y un cambio final toda la noche a 4° C con agitación constante.

La proteína dializada fue cuantificada empleando el método de Micro BCA Protein Assay, (Pierce) usando albumina de suero bovino como referencia. La

proteína fue almacenada a -20° C hasta su posterior uso (apartado XX ensayo luciferasa).

VII.2.12.3 Electrotransferencia (western blot) de anticuerpo vNAR anti-TGF β expresado en biorreactor.

Se realizó un gel de poliacrilamida usando 10 μ L de la escalera Rainbow Biorad como referencia y fue utilizado para la electrotransferencia.

Se empleo una membrana de PVDF Transfer Membrane (Amersham) que previamente fue activada con 2 mL de metanol 100% incubándola durante 10 segundos en agitación constante. Se enjuagó con agua desionizada y bidestilada por 2 min con agitación constante. Se humedecieron el gel de poliacrilamida, seis cuadros de papel filtro y la membrana en buffer de electrotransferencia semiseca (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3), por al menos 5 minutos en agitación constante. Se colocaron en una cámara Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell (Biorad) en el siguiente orden del cátodo al ánodo; tres papeles filtro, el gel de poliacrilamida; la membrana PVDF terminando con tres papeles filtro, eliminando el exceso de buffer y las burbujas que se puedan generar. La transferencia se llevó a cabo por 20 minutos a 15 V constantes. Al finalizar la transferencia, se colocó la membrana en solución de bloqueo BSA 3%-PBS1X y se agitó por 2 horas a 37° C bajo agitación constante. Se eliminó esta solución, y se agregó el anticuerpo de detección anti-HA diluido 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X, se incubó toda la noche a 4° C con agitación constante. Al otro día, se lavó la membrana tres veces, con solución de PBS 1X-Tween20 0.05% de dos minutos cada vez y con agitación constante. Se eliminó el exceso de solución y se agregó solución de revelado AEC Staining kit (Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor, y se incubó a temperatura ambiente en obscuridad hasta que se visualizaran las bandas con el contraste deseado.

VII.2.12.4 ELISA de reconocimiento del anticuerpo vNAR contra las isoformas de la citocina TGF β .

Se emplearon las isoformas TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 en un inmunoensayo ligado a enzima para determinar si son reconocidas por el anticuerpo de dominio sencillo de tiburón. Se colocaron 250 ng/pozo de las citocinas TGF β 1 y TGF β 2, en el caso de TGF β 3, se usaron 125 ng/pozo, debido a la concentración del stock inicial. El volumen para todas las citocinas fue de 50 μ L. Todas las citocinas de la casa comercial Peprotech. Se incubaron 2 horas a 37° C. Se descartó y se bloqueó con 150 μ L de BSA 3%-PBS 1X por 1 h a 37° C. Se descartó la solución y se agregó a cada pozo 250 ng de proteína vNAR purificada y dializada. Se incubó por 2 h a 37° C. Se lavaron los pozos tres veces con solución PBS 1X-tween20 al 0.05% y se agregaron 50 μ L de anticuerpo anti-HA diluido 1:1000 en solución de BSA 1%-PBS1X y se incubó la placa por 2 h a 37° C. Se lavaron los pozos tres veces y se agregaron 50 μ L de solución de revelado TMB ELISA Reagent, (Thermo Scientific), se incubó a 37° C por 10 minutos y se analizó en espectrofotómetro Benchmark Microplate Reader (BioRad) a 405 nm. Se usó BSA 1% como control negativo de reconocimiento.

VII.2.13 Ensayos de neutralización *in vitro* de las isoformas TGF β 1 y TGF β 2, empleando el vNAR purificado.

Debido a la similitud en secuencia y conformación de las isoformas de la citocina TGF β , se decidió emplear TGF β 1 y TGF β 2 para los ensayos *in vitro* y determinar si el anticuerpo vNAR aislado tiene capacidad de neutralización de las diferentes isoformas.

VII.2.13.1 Ensayo del gen reportero luciferasa.

Se empleó la línea celular MvILu (ATCC CCL-64), células de pulmón de nutria adherentes en medio Dulbecco's modificado con alto contenido de glucosa (DMEM-HG) adicionado con 20% de suero fetal bovino (SFB) y 1X de solución de antibiótico-antimicótico.

Las células criopreservadas fueron resuspendidas en 10 mL de medio suplementado y se colocaron 5 mL en cajas petri de 10 cm. Se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ disuelto, por 24 - 48 horas, hasta que la confluencia fuera de alrededor de 75%.

VII.2.13.2 Transfección por el método DEAE-Dextran

Se eliminó el medio de cultivo a las cajas petri con confluencia de 75-80% y se adicionaron 5 mL de medio DMEM con 1X de antibiótico-antimicótico, pero sin SFB. Para la transfección se preparó medio de cultivo conteniendo: 50 µL de cloroquina (100 mM), empleado para incrementar la eficiencia de transfección y se agregaron 10 µL de plásmido 3TPLux (1.1 µg/mL) y 0.2 mL de DEAE-Dextrán (dietilaminoetil-dextran) y se agitó vigorosamente.

Se succionó el medio de cultivo de las células y se lavó dos veces con 10 mL de medio de cultivo suplementado con antibiótico, pero sin suero. Se agregó el medio de cultivo que contiene cloroquina-plásmido-DEAE-Dextrán. Se incubó por tres horas a 37° C, 5% de CO₂. Al finalizar el periodo de incubación, se succionó el medio de cultivo y se agregaron 5 mL de DMSO 10% diluido en PBS 1X durante 2 minutos a temperatura ambiente, se succionó la solución de DMSO y se enjuagaron las placas con 10 mL de medio de cultivo – antibiótico – sin suero. Se succiona esta solución y se finalmente se agregan 10 mL de medio de cultivo-antibiótico-suero. Las cajas se incubaron durante 12 horas a 37° C 5% CO₂.

VII.2.13.3 Ensayo de luciferasa

A las células Mv1Lu previamente transfectadas, se le agregó 1 mL de solución tripsina 0.25% - EDTA 0.53 mM y se incubó durante 3 minutos a 37° C y 5% de CO₂. Se agregaron 4 mL de medio suplementado y las células se colocaron en un tubo de 50 mL, se centrifugaron por 5 minutos a 2,000 rpm. El

pellet fue resuspendido en 10 mL de medio suplementado y se cuantificó el número de células en cuatro campos de una cámara de Neubauer, empleando una dilución 1:5 (20 μ L células: 80 μ L azul tripano).

Una vez cuantificadas las células, se colocaron 50,000 células por pozo en placas de 24 pozos (COSTAR). Se incubaron las placas 24 horas a 37° C, 5% de CO₂. En hielo, se realizaron las diluciones de cada una de las citocinas TGF β 1 y TGF β 2, a una concentración final de 20 pM en 200 μ L de medio de cultivo con antibiótico y 0.2% de SFB.

Se empleó como control betaglucono, previamente expresado en células de insecto y purificado (Vilchis-Landeros *et al.*, 2001). La concentración empleada de betaglucono para la citocinas TGF β 1 y TGF β 2 fue de 2.5 nM; 5 nM; 25 nM; 100 nM, por triplicado.

En el caso del anticuerpo vNAR anti-TGF β , se emplearon las siguientes concentraciones finales: 0.1 mM; 0.053 mM; 0.266 mM; 1.3 mM y 6.6 mM, en un volumen final de 200 μ L.

Se emplearon como controles para cada una de las placas a probar, un control negativo que consistió en células Mv1Lu en medio de cultivo suplementado sin estímulo de la citocina. Como control positivo de proliferación, se emplearon células con 20 pM de cada una de TGF β 1 y TGF β 2.

Debido a la concentración del anticuerpo vNAR y el volumen empleado en la máxima concentración de vNAR se incluyó un control que consistió en células con medio de cultivo y 200 μ L de PBS 1X, esto con la finalidad de determinar si el PBS no afectaba la actividad de la citocina o la capacidad de neutralización del anticuerpo vNAR.

Una vez preparados los ligandos, los pozos conteniendo las células fueron lavados dos veces con 500 μ L de PBS 1X y se colocaron las soluciones correspondientes. Las placas se incubaron 20 horas a 37° C y 5% de CO₂.

Al siguiente día, se lavaron los pozos dos veces con 500 μ L de PBS 1X. Se succionó lo máximo de PBS y se agregaron 100 μ L de buffer de lisis CCLR (buffer

de lisis de células de cultivo de luciferasa) y se incubó en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se colocaron en hielo para disminuir la posible evaporación y empleando una punta de micropipeta se homogenizó subiendo y bajando el volumen y transfiriéndolo a un tubo limpio de 600 μ L. Las muestras se centrifugaron por 2 minutos a 4° C y 14,000 rpm. Las muestras se mantuvieron en hielo para proceder al ensayo de luciferasa.

Para el ensayo de luciferasa, se empleó el kit Luciferase Assay System (Promega) agregando 100 μ L de reactivo y 10 μ L del buffer de lisis procedente de los pozos analizados. Las muestras se resuspendieron y fueron analizadas en un luminómetro marca Lumat LB9501 Berthold. Como controles, se emplearon 6 pozos conteniendo células pero sin ningún tratamiento. Se incluyó un control con PBS 1X, para verificar que este amortiguador en el cual esta resuspendido el anticuerpo no afecta a las células empleadas en el ensayo. Los resultados se normalizaron al 100% usando el control de células tratadas con citocina y sin tratamiento de β glucano o anticuerpo.

VII.2.14 Ensayos preliminares de toxicidad del anticuerpo vNAR neutralizante de TGF β .

VII.2.14.1 Inyección de ratones *Wt* con anticuerpo de dominio sencillo vNAR

Se inyectaron ratones *Wt* con 20 $\pm$ 3 gramos de peso, vía intraperitoneal con 10 μ g de anticuerpo vNAR anti-TGF β , por 3 meses, con alimentación y bebida *ad libitum*. Las inmunizaciones se realizaron una vez cada dos semanas. Se tomaron muestras de sangre de cada uno de los ratones antes de la primera inyección (suero pre-inyección) y entre las mismas. Al finalizar el tratamiento, se sangró a los ratones y los sangrados se obtuvieron de la punta de la cola del organismo. La sangre se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos y se centrifugó a 5,000 rpm por 5 minutos. Se tomó el suero de cada muestra y se transfirió a tubos limpios.

Los grupos que se analizaron fueron: Grupo 1) 4 ratones fueron inyectados con 100 μ L de PBS 1X, como grupo control de inyección; Grupo 2) 4 ratones fueron inyectados con 100 μ L conteniendo 10 μ g de anticuerpo vNAR anti-TGF β .

VII.2.14.2 ELISA de reconocimiento empleando el vNAR anti-TGF β como antígeno con los sueros de ratones *Wt*.

Se colocaron por triplicado, 250 ng de anticuerpo de dominio sencillo vNAR anti-TGF β en una placa de ELISA. Se incubó durante toda la noche a 4° C. Se bloquearon los pozos con BSA 3%- PBS 1X por 1 hora a 37° C. Se descartó la solución y se agregaron los sueros de cada uno de los ratones, previamente se diluyeron 1:50 en PBS 1X. Los sueros se incubaron durante 2 horas a 37° C. Se descartó el líquido y se lavaron los pozos tres veces con PBS 1X- Tween20 0.05%. Se descartó y se agregaron 50 μ L de anticuerpo de cabra anti-ratón (SIGMA) diluido 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X, se incubó por 2 horas a 37° C. Se lavó la placa tres veces y se agregaron 50 μ L de solución de revelado de ABTS. Se incubó por 30 minutos y se leyó a 405 nm.

VII.2.14.3 Ensayo de citotoxicidad empleando cultivos primarios de hepatocitos

Se eutanizaron 4 ratones *Wt* y se limpió el abdomen con etanol. Se trabajó en una campana de seguridad tipo II (Labconco Purifier Calss II BioSafety Cabinet Delta Series). Se realizó una incisión en el abdomen en forma de "V", y se localizó el hígado y se extrajo el órgano. Se lavó en 10 mL de solución Hank's sin Ca²⁺ y Mg²⁺. Para disgregar las células, se agregó una solución de colagenasa tipo I a una concentración final de 5U por gramo de ratón, se mezcló con agitación manual por 3 minutos, se incubó a 37 C por 15 minutos sin agitación. Usando el embolo de una jeringa nueva y estéril, se macero ligeramente el órgano. Se

centrifugó por 5 minutos a 4,000 rpm en una centrifuga Heareus a temperatura ambiente. Se generó un botón celular que corresponde a las células disgregadas y en el sobrenadante se encontraba el tejido conectivo. Se decantó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con solución Hank's sin Ca^{2+} y Mg^{2+} suplementado con 10% de SFB. Se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante y al paquete celular se le agregó medio RPMI suplementado con SFB al 10% y solución de antibiótico-antimicótico al 1X. Se cuantificó el número total de células aisladas usando el equipo Automated Cell Counter (TC10, Biorad) siguiendo las especificaciones del proveedor usando azul tripano. Se colocaron 35,000 células por pozo y por triplicado, en un volumen final de 100 μL con medio RPMI suplementado con 10% de SFB (Difco), 1X de solución de antibiótico-antimicótico (Difco). Se incubó la placa por 12 horas a 37° C y 5% de CO_2 . Al otro día, se agregaron diferentes concentraciones de anticuerpo vNAR anti-TGF β y se incubó la placa por 24 horas a 37° C y 5% de CO_2 en atmósfera húmeda. Se cuantificó la supervivencia celular usando 20 μL por pozo del reactivo Cell Titer (Promega) e incubando 4 horas, después de incubar durante 24 y 48 horas con el anticuerpo. Se leyó la absorbancia a 495 nm. Se empleó como control pozos con células sin anticuerpo vNAR. Las cantidades del anticuerpo anti-TGF empleadas fueron: 0, 10, 25, 35, 50, 65, 75, 85 y 100 μg .

VII.3 RESULTADOS

VII.3.1 Selección de vNAR específicos contra la citocina TGF β 1.

Se empleó una biblioteca no inmune previamente generada en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE. Empleando la técnica de despliegue en fagos se realizaron 3 rondas de selección contra la citocina, obteniendo títulos finales de 4.5×10^8 ufc en *E. coli* ER2537. Como se observa en la Figura 20, existe un decremento en la R1 donde se aplicaron 7

lavados astringentes, lo cual implica que la mayoría de los anticuerpos vNAR fueron eliminados porque no eran específicos a la citocina o porque su afinidad era pequeña. En las rondas 2 y 3 se observa un incremento en los títulos, lo cual indica que se amplificaron exitosamente fagos que despliegan en su superficie vNAR con capacidad de unión a la citocina.

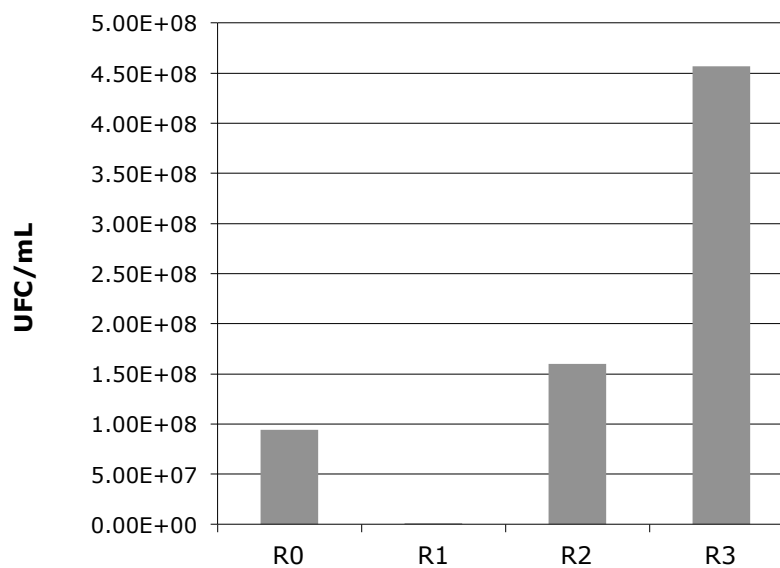


Figura 22. Rondas de selección empleando despliegue en fagos usando una biblioteca no inmune del tiburón *Heterodontus francisci*. Se observa un incremento en los títulos después de la primera ronda de selección, siendo mayor el título correspondiente a la ronda 3.

VII.3.2 Búsqueda de colonias positivas a inserto por PCR

Empleando los oligonucleótidos ompseq y gback (Tabla III), se analizaron al azar 32 colonias aisladas procedentes de la ronda 3 de selección. Empleando éstos oligonucleótidos, el fragmento esperado es de aproximadamente 600 pb.

Las colonias positivas al fragmento de 600pb corresponden a los carriles marcados en la Figura 21 como: 1, 3, 8, 9, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 29, 30, 31, 32. Aproximadamente, el 56% de las colonias seleccionadas contienen un fragmento que podría corresponder a un fragmento de dominio sencillo vNAR. Se incubó una asada de cada una de las colonias positivas en medio SB toda la noche con carbencilina a concentración final de 100µg/mL, para obtener los plásmidos empleando lisis alcalina. Se procedió a obtener las secuencias de los plásmidos para verificar la presencia del fragmento amplificado por PCR.

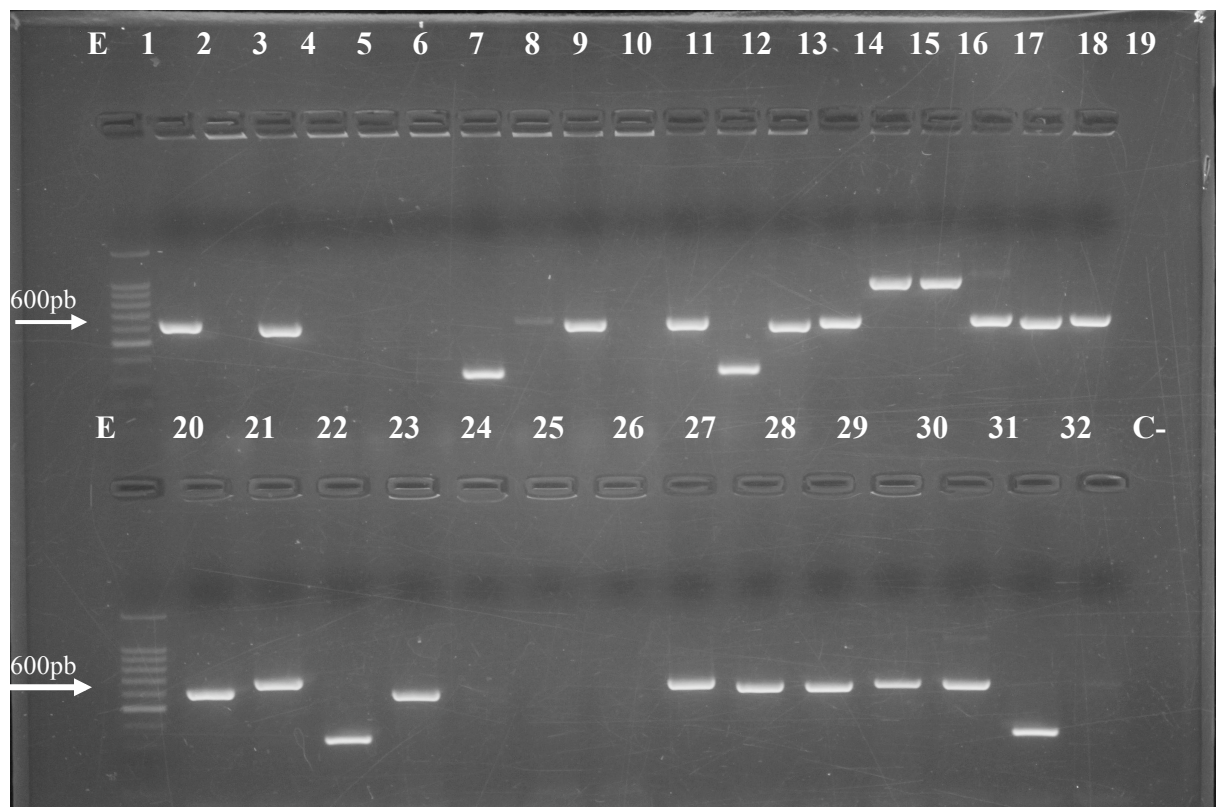


Figura 23. PCR de colonia, Gel agarosa 1.8% teñido con bromuro de etidio. Se analizaron 32 colonias aisladas. E= corresponden a la escalera de 100-1000 pb. Se señala la banda correspondiente a 600pb. Las colonias positivas a inserto amplifican un fragmento de aproximadamente 600 pb.

VII.3.3 Análisis de secuencias proteicas procedentes de colonias aisladas de la ronda 3.

Como se muestra en la Figura 22, se obtuvieron tres secuencias que cumplen las siguientes características: son diferentes a las previamente aisladas en el laboratorio, que no contienen codones de paro y poseen un marco de lectura correcto.

Se denominaron a las clonas como T-1 de 142 aminoácidos desde el inicio del vNAR hasta las etiquetas de seis histidinas (empleadas para la purificación) y la etiqueta de hemaglutinina (empleada para la detección por ELISA y WB). La clona T-20 tiene 136 aminoácidos y la clona T-28 tiene 133 aminoácidos. Se empleó la secuencia de una clona previamente aislada denominada G4 (Beltrán, 2007) como referencia.

La secuencia correspondiente al CDR3, que es donde se concentra principalmente el sitio de unión al antígeno en los anticuerpos tipo vNAR, es diferente entre las clonas aisladas y en la clona T-1 tiene una longitud de 24 aminoácidos, para T-20 es de 16 aminoácidos y para T-28 es de 13 aminoácidos. Los anticuerpos aislados corresponden al Tipo II de vNAR, que se considera el tipo de anticuerpo más predominante (Greenberg, 1995),

	FR1		20	CDR1		40	HVR2		60
T-1	ASLDQTPRTA	TRETGESLSI	NCVLTDTSHI	LFGTKWFWNN	PGSTDWESIT	IGGRYVESVN	60		
T-20	ARVDQTPRTA	TRETGESLTI	NCILTDTRCG	LYGTSWFRNN	PGSTDWERIT	IGGRYVESVN	60		
T-28	ARVDQTPRTA	TRETGESLTI	TCILGTGICD	LSGTSWFRNN	PASTDWEDIT	IGGRYVESVN	60		
G4	ASLDQTPRTA	TRETGESLTI	NCVLTDNSQN	LFSTKWFWHA	PSSTDWKSIT	IGGRYVESKN	60		
	HVR4		FR3	80	CDR3		100	FR4	120
T-1	NQAKSFSLQI	KDLTVEDSGT	YYCKAQTIGR	RKRGPLASLA	AMMGSSDY-	-GAGTVLTVN	118		
T-20	KGAKSFSLQI	KDLTVEDSVT	YYCNALIDRY	YM-----	ALDGCSSYYY	DGAGTVLTVN	112		
T-28	KEAKSFSLQI	KDLTVEDSVT	YYCKAQTGGY	GR-----	CPD--NYYY	DGAGTVLTVN	109		
G4	KQSKSFSLQV	KDLTLEDST	YYCKAKTIGK	RRP-----	HLIGGVMSRY	DGAGTVLTVN	114		
	Sfil		6xHis	HA ¹⁴⁰					
T-1	GQAGQHSHHHH	HGAYPYDVDP	YAS	142					
T-20	GQAGQHSHHHH	HGAYPYDVDP	YAS	136					
T-28	GQAGQHSHHHH	HGAYPYDVDP	YAS	133					
G4	-----	-----	---	114					

Figura 24. Alineamiento de secuencias de proteína vNAR aisladas contra la citocina TGF β 1. Del aminoácido número 111 al 131, se encuentra la región del CDR3 que permite el reconocimiento contra la citocina TGF β 1. En el caso de la clona T-1 el CDR3 consta de 24 aminoácidos. Para T-20 es de 16 aminoácidos y para T-28 es de 13 aminoácidos. Con flechas se apuntan los residuos de cisteínas.

VII.3.4 ELISA de expresión de anticuerpo vNAR anti-TGF β

Los plásmidos de las clonas T-1, T-20 y T-28, se transformaron en células de *E. coli* BL21(DE3) y se emplearon para hacer una inducción para producir, a pequeña escala (50 mL) proteína soluble vNAR anti-TGF β y determinar por medio de una ELISA si tienen capacidad de expresión y capacidad de reconocimiento contra TGF β .

En la Figura 23, se muestra el resultado de la ELISA de expresión de proteína soluble. Se observa, que la clona denominada T-1 tiene una expresión aproximadamente 3.5 veces mayor que las otras dos clonas aisladas.

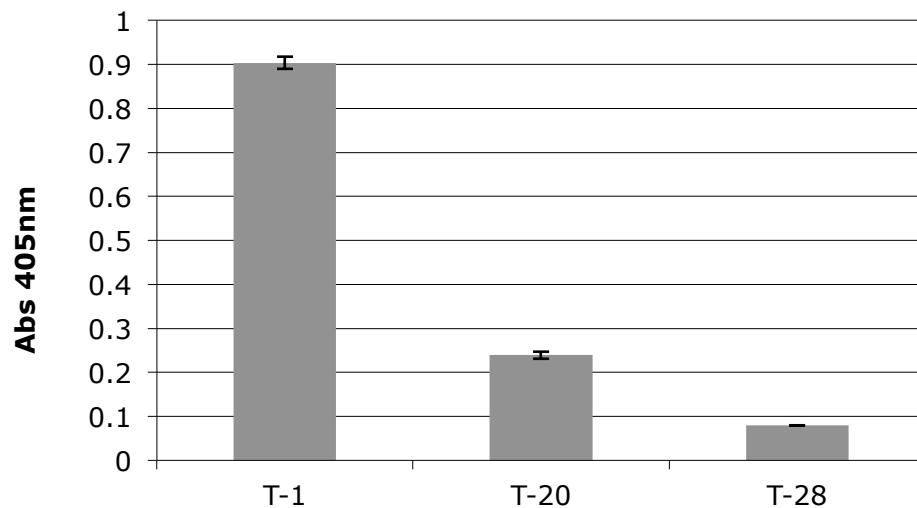


Figura 25. ELISA de expresión de las clonas T-1, T-20 y T-28. Ensayo por triplicado, se muestra la desviación estándar. La clona T-1 muestra una expresión aproximadamente 3.5 veces mayor que la clona T-20.

VII.3.5 ELISA de reconocimiento.

Para el ELISA de reconocimiento, se usó la citocina TGF β 1 como antígeno en el pozo, y el extracto periplásmico de las tres clonas. Se usó como control negativo al BSA 3%, con la finalidad de determinar si el anticuerpo vNAR soluble no se unía a la albúmina dado que es usada en el paso de bloqueo de los pozos de ELISA y que por lo tanto existiera un falso positivo.

Como se puede observar en la Figura 24, la clona T-1 tiene reconocimiento a BSA, sin embargo existe diferencia significativa $p > 0.05$ entre el reconocimiento a la citocina y el BSA 3%. Se consideró que la clona T-1, tiene mejor reconocimiento a la citocina TGF β 1 que las clonas T-20 y T-28. Por lo tanto, se empleó solamente la clona T-1 para expresar el anticuerpo empleando biorreactores de 10 L.

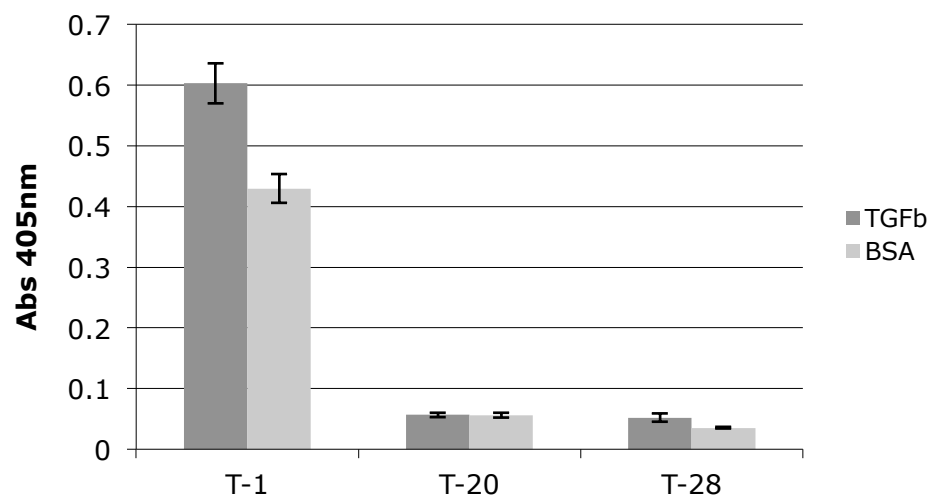


Figura 26. ELISA de reconocimiento TGF β . La clona denominada T-1 muestra mejor reconocimiento a la citocina TGF β que al BSA. Las clonas T-20 y T-28 no tienen diferencia entre los reconocimientos.

VII.3.6 Purificación de anticuerpo vNAR T-1.

La producción a pequeña escala de la clona T-1, se purificó con base al protocolo descrito por el fabricante de la resina Ni-NTA. Se analizó mediante geles de poliacrilamida, y se incluyó el lavado de la resina y las eluciones denominadas: E0, que corresponde al volumen desplazado por el buffer de elusión; E1 que corresponde la primer volumen de buffer de elusión que pasa por la resina y así sucesivamente.

VII.3.7 Análisis del anticuerpo vNAR T-1.

VII.3.7.1 Análisis en gel de SDS-PAGE al 12% del anticuerpo T-1 purificado.

En la Figura 25, se muestra el resultado de un gel de poliacrilamida al 12% del análisis de la purificación basada en la cola de seis histidinas incluida en la secuencia de la clona T-1. Como se puede observar, existe en el extracto periplásmico (EP) proteína T-1 de aproximadamente 16 kDa antes de purificar y en la fracción E2 después de la purificación. En cuanto al lavado no se observa pérdida de proteína. Existen bandas accesorias de aproximadamente 25 kDa y de 50 kDa, sin embargo no representan más del 25% de la proteína purificada.

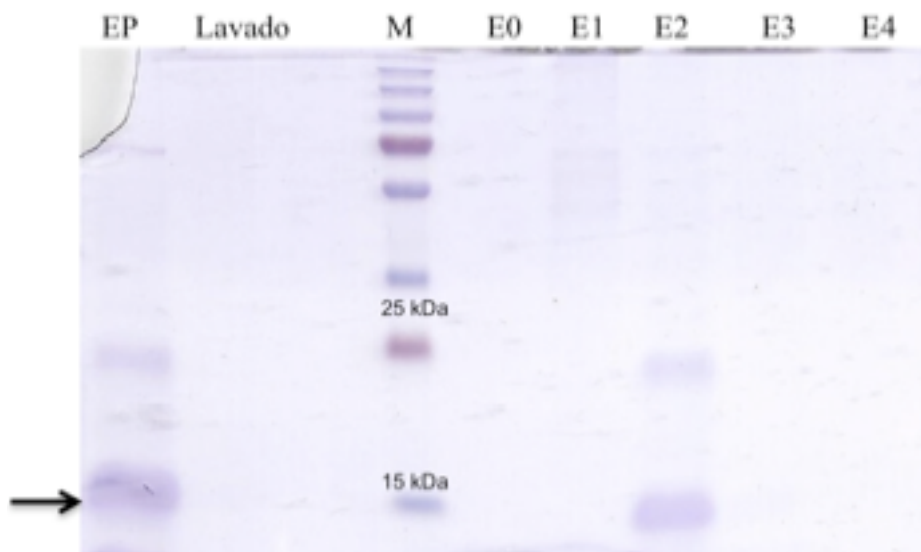


Figura 27. Gel desnaturalizante de poliacrilamida 12%, purificación de anticuerpo T-1. EP: extracto periplásmico; Lavado: buffer de lavado; M: marcador de peso molecular; E0: elusión cero; E1: fracción 1; E2: fracción 2; E3: fracción 3; E4: fracción 4.

VII.3.7.2 Cuantificación de proteína, expresión pequeña escala.

El valor obtenido mediante la cuantificación por Micro BCA de la proteína purificada en E2 fue de 1 mg/mL. Con la finalidad de obtener una mayor cantidad de proteína se procedió a realizar la producción de anticuerpo en un sistema de biorreactores en lote agitado.

VII.3.8 Bioproceso de producción de anticuerpo T-1 en lote agitado de 15 L.

VII.3.8.1 Cinética de crecimiento *E. coli* BL21(DE3) que expresa el anticuerpo T-1.

Se usó como blanco medio de cultivo no inoculado para las mediciones de densidad óptica. Se tomaron muestras de 10 mL cada dos horas y se analizaron en un espectrofotómetro. Como se muestra en la Figura 26, la cinética de crecimiento de *E. coli* cepa BL21(DE3) se presenta como una curva tipo. Se observa que el tiempo de duplicación de *E. coli* en biorreactor es de aproximadamente 2 horas, a diferencia del tiempo de duplicación reportado en matraz de aproximadamente 20 minutos.

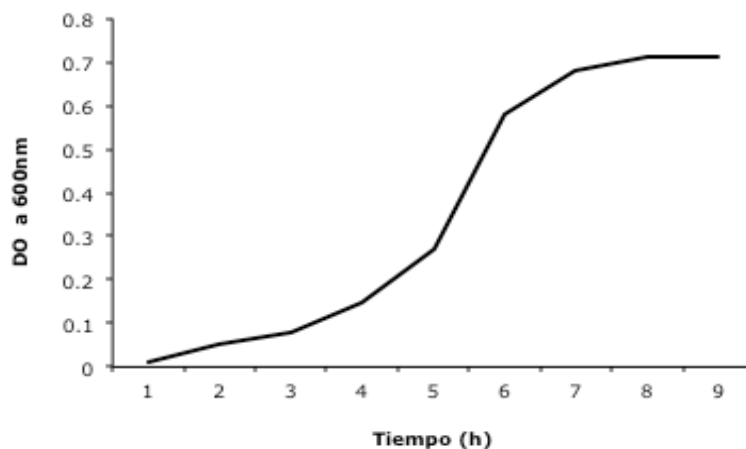


Figura 28. Curva de crecimiento de *E. coli* BL21(DE3), en biorreactor de lote agitado. El tiempo de replicación de la bacteria fue de 2 horas aproximadamente. Se grafican sólo las primeras 9 horas de cultivo.

En la Figura 27, se graficaron las condiciones físicas de aproximadamente 18 horas de inducción (4 horas antes de la inducción y 14 horas de inducción). El oxígeno disuelto se modificó al aumentar la demanda metabólica del cultivo (mitad de la fase exponencial de crecimiento, cuando se aplicó el inductor), en ese momento, las RPM aumentaron para controlar dicha demanda. Como se puede

observar, el pH y temperatura se mantuvieron constantes, dado que la variación fue de ± 0.5 para cada uno de los parámetros.

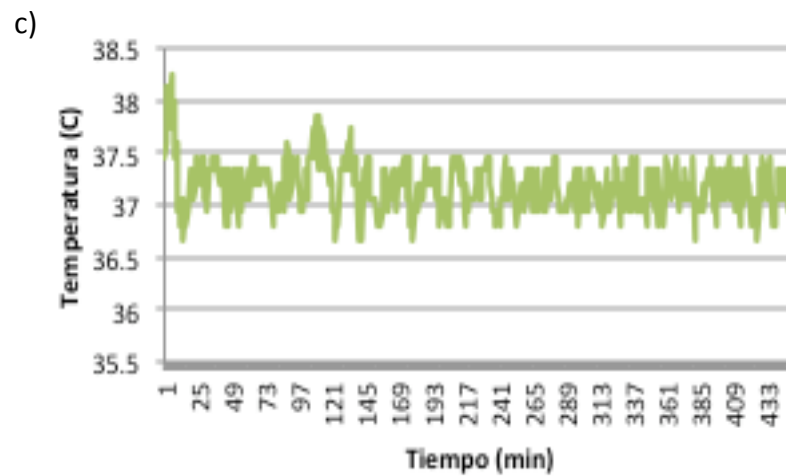
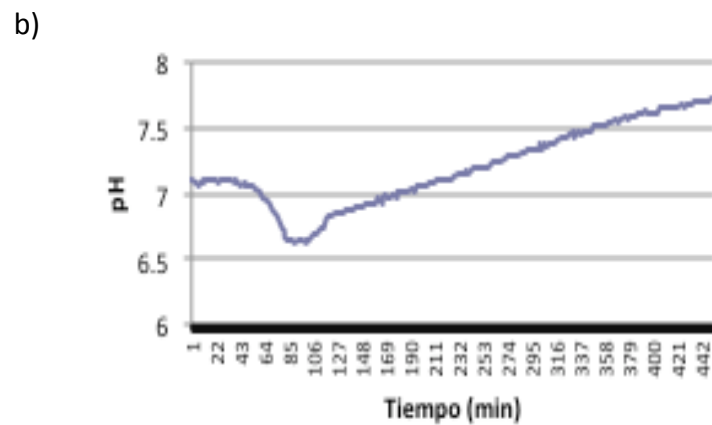
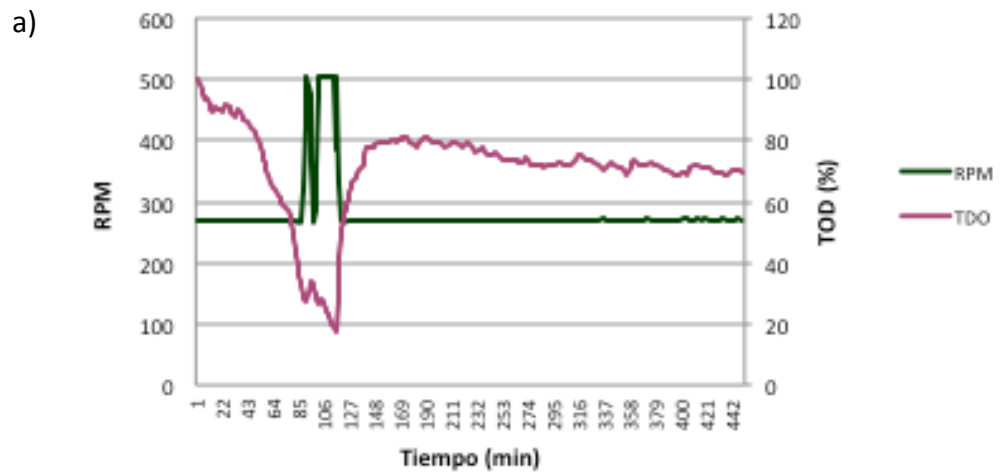


Figura 29. Condiciones físicas del biorreactor. Inducción de 10L, medio SB cepa BL21 (DE3) productora de T-1. a) Se observan variaciones de la TOD (tensión de Oxígeno Disuelto) debido a la demanda metabólica del cultivo. La regulación de TOD se realizó por medio de la agitación, por lo tanto al aumentar la demanda de DO aumentan las RPM. b) La temperatura y; c) el pH se mantuvieron constantes, con variaciones de sólo ± 0.5 .

VII.3.9 Análisis de anticuerpo de dominio sencillo vNAR producido en biorreactor.

VII.3.9.1 Purificación del anticuerpo T-1 producido en biorreactor.

Después de la inducción, se centrifugaron lotes de 400 mL de cultivo y dado que la proteína vNAR se mantiene en el espacio periplásmico, se pesó el paquete celular y se empleó el extrajo usando PPB. La proteína fue purificada por medio de afinidad a níquel. Las eluciones fueron de 4 mL cada una. Para verificar la purificación de proteína, se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y teñido con Coomasie. Existen bandas accesorias en E1 y E2, esto se había visto en la Figura 28, las cuales pueden representar aproximadamente el 50% de la proteína total.

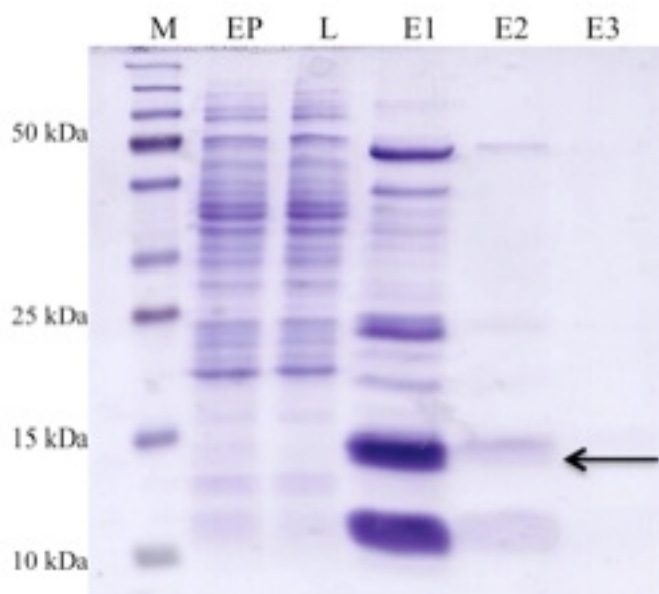


Figura 30. Gel 12% SDS-PAGE. Anticuerpo vNAR T-1 producido en biorreactor. Se cargaron 20 μ L de proteína purificada. **M:** marcador de peso molecular; **EP:** extracto periplásmico sin

purificar; **L**: buffer de lavado; **E1**: fracción 1; **E2**: fracción 2; **E3**: fracción 3. La mayor concentración de proteína corresponde a la fracción 1.

VII.3.9.2 Western blot de T-1.

En la Figura 29, se muestra el western blot de la proteína T-1 purificada, el tamaño aproximado del vNAR es de aproximadamente 16 kDa. La detección se realizó con el anticuerpo anti-HA. Como control, se usó el extracto periplásmico (Ext) en el cual no se ha purificado el anticuerpo. Se detectó el anticuerpo en las eluciones E1 y E2.

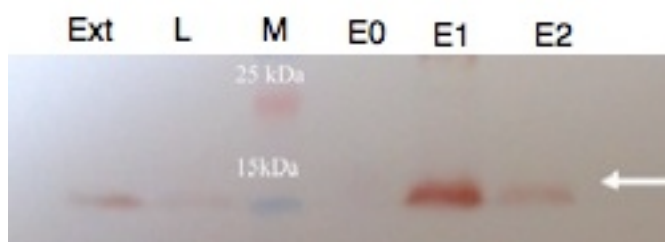


Figura 31. Western blot. vNAR purificado y extraído de la clona T-1. Inducción de 10L. Se empleó el anticuerpo anti-HA y el sustrato AEC staining kit . **Ext**: extracto periplásmico; **L**: lavado; **M**: marcado de peso molecular; **E0**: fracción 0, que contiene buffer de lavado; **E1**: fracción 1; **E2**: fracción 2.

VII.3.9.3 Cuantificación de proteína T-1 purificada producida en biorreactor.

Se procedió a la cuantificación de la proteína usando el método Micro BCA, y usando BSA como proteína para hacer la curva estándar. Empleando la ecuación de la recta, se calculó la concentración de proteína, siendo de 4 mg/mL. Por lo tanto, el rendimiento obtenido en la producción del biorreactor fue de 10 mg/L. Al comparar el rendimiento obtenido en la purificación a pequeña escala (1 mg/mL) con el obtenido en la producción en biorreactor, se puede observar un incremento de un orden de magnitud al emplear el biorreactor en lote agitado.

VII.3.9.4 ELISA de reconocimiento a las isoformas de TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 por el vNAR T-1.

En la Figura 30, se muestra la gráfica del resultado del inmunoensayo ligado a enzima, donde se observa que existe diferencia entre el reconocimiento del vNAR T-1 contra TGF β 1 ($p < 0.005$ vs TGF β 2 y TGF β 3). No existe diferencia entre el reconocimiento del vNAR entre las isoformas β 2 y β 3. Sin embargo, con esta ELISA se demuestra que el vNAR T-1 tiene capacidad de reconocer efectivamente a las tres isoformas. Se considera que existe una similitud del 90% entre las mismas y similar efecto biológico. Con base en este resultado de reconocimiento, se decidió probar la capacidad del vNAR T-1 para neutralizar en un modelo *in vitro* el efecto de al menos las isoformas TGF β 1 y TGF β 2.

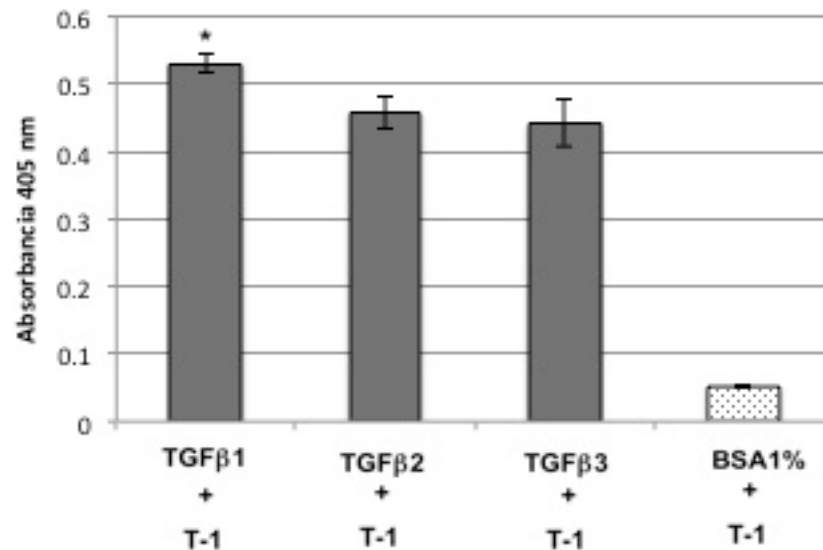


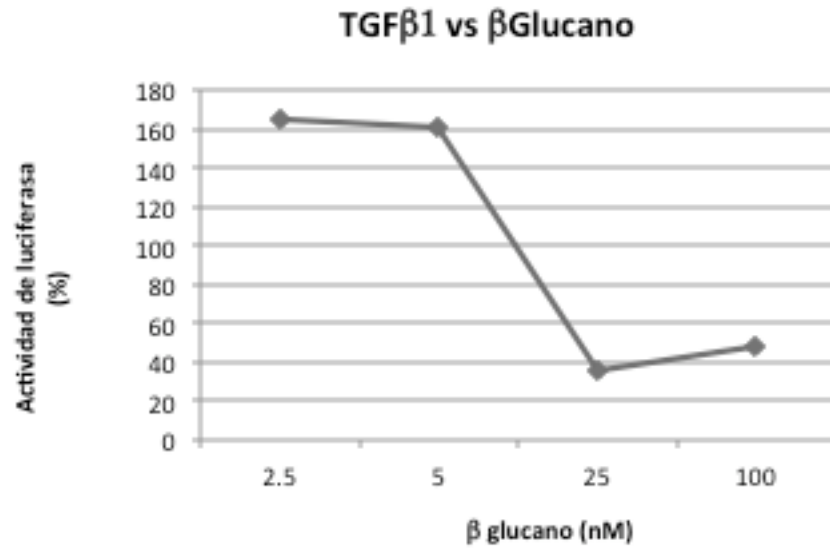
Figura 32. ELISA de reconocimiento vNAR T-1 con las isoformas de TGF β . Ensayo realizado por triplicado.

VII.3.10 Ensayo de neutralización *in vitro* de las isoformas TGF β 1 y TGF β 2 empleando el anticuerpo T-1.

Como se puede observar en el caso del betaglucano, la concentración necesaria para neutralizar el efecto de la citocina TGF β 1, se encuentra cercano a 20 nM, conforme a lo anteriormente reportado (Vilchis-Laderos *et al* 2001) (Figura 31a).

En la Figura 31b, se observa neutralización del efecto TGF β 1 en las células Mv1Lu, cuando se emplea el anticuerpo T-1 a la máxima concentración (6.6 mM),. Para poder conocer a que concentración el anticuerpo T-1 es capaz de neutralizar en un 50% el efecto de la citocina, es necesario repetir el ensayo agregando más concentraciones que se encuentren entre 1.3 mM y 6.6 mM.

a)



b)

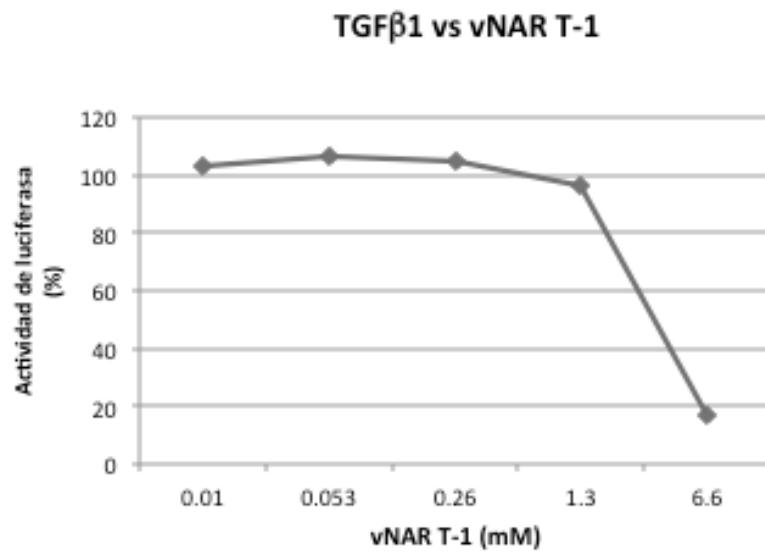
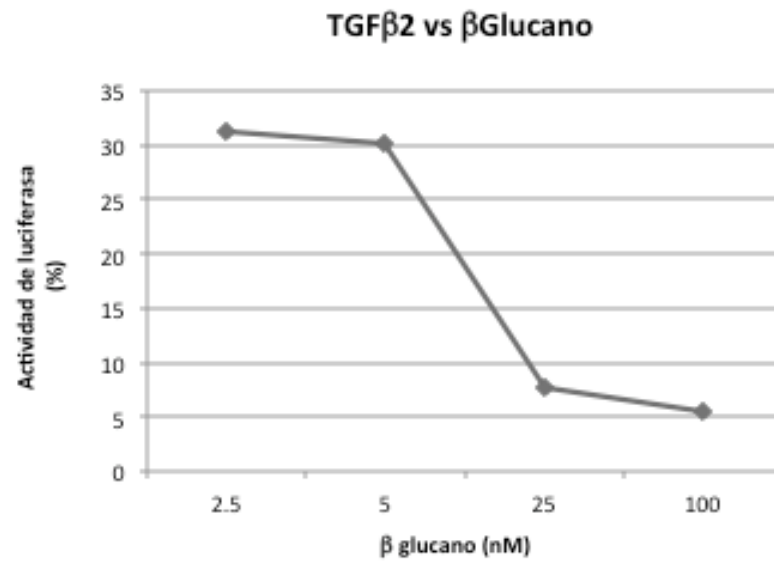


Figura 33. Ensayo de luciferasa TGF β 1. En **a)** TGF β 1 vs β glucano, existe inhibición usando 20 nM de β glucano. **b)** TGF β 1 vs vNAR T-1. Existe neutralización de la citocina TGF β 1 usando 6.6 mM de vNAR T-1.

En la Figura 32a, se grafica la neutralización de la citocina TGF β 2 usando β glucano. Como se puede observar, al emplear 2.5 nM de glucano hay una inhibición del 70% de la citocina y al aumentar a 25 nM, la inhibición es aproximadamente del 92%. Vilchis-Landeros y colaboradores en 2001, reportan una CE₅₀ (concentración efectiva 50) de aproximadamente 2 nM para esta citocina. Demostrando que el β glucano tiene una mayor capacidad de neutralizar la isoforma 2 preferentemente a la isoforma 1.

En la Figura 32b, se inhibe el 97% del efecto de TGF β 2 en las células Mv1Lu al emplear la máxima concentración de vNAR T-1 (6.6 mM). Al usar 0.053 mM de T-1, es posible inhibir el 38% de la acción biológica de la citocina. Este resultado sugiere que el anticuerpo T-1 tiene capacidad de neutralizar preferentemente la isoforma 2, sin embargo, es necesario repetir este ensayo incluyendo más concentraciones.

a)



b)

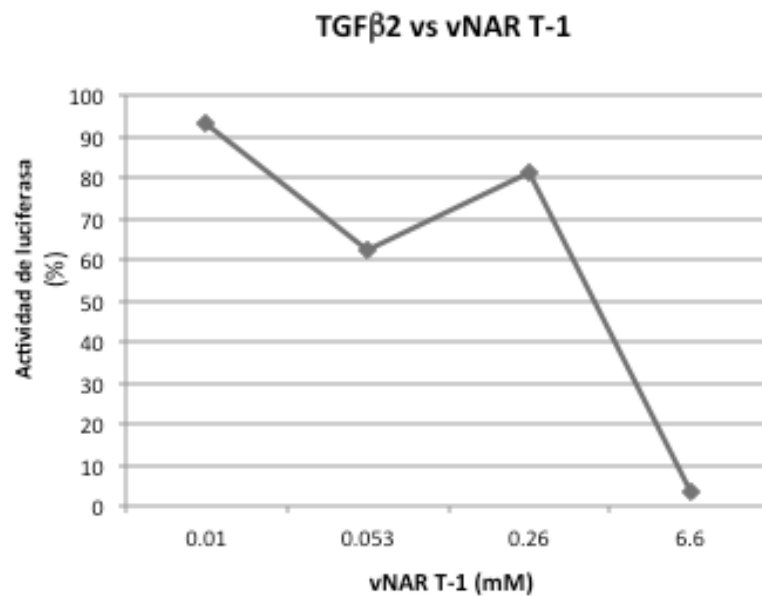


Figura 34. Ensayo de luciferasa TGF β 2. a) TGF β 2 vs β glucano, existe inhibición usando 2.5 nM de β glucano. b) TGF β 2 vs vNAR T-1. Existe neutralización de la citocina TGF β 2 usando 0.053 nM y 6.6 mM de vNAR T-1.

VII.3.11 Ensayo preliminar de toxicidad de T-1 en ratones *Wt*.

Se emplearon ratones silvestres que fueron inyectados por tres meses con 10 µg de anticuerpo T-1 intraperitonealmente. Con los sueros se realizó una ELISA donde se colocó al anticuerpo T-1 como antígeno y se incubó con los sueros de los ratones, para verificar si el vNAR induce una respuesta inmune en los ratones.

Como se puede observar en la Figura 33, al comparar el grupo control inyectado con PBS1X y el grupo inyectado con T-1, no existe diferencia significativa entre ellos.

La media aritmética del grupo control fue de 0.044 mientras que para el grupo inyectado con T-1 fue de 0.027, sin embargo la desviación estándar del grupo control fue de 0.057, por lo tanto no existe diferencia significativa entre ambos grupos después de tres meses de inyección y a la concentración de vNAR inyectado.

Es importante mencionar que durante el transcurso del experimento, no se observaron signos de intoxicación en los ratones después de cada inyección del vNAR, como por ejemplo hipersalivación, excitabilidad, parálisis, disfagia, convulsiones o muerte. Al tratarse de organismos silvestres, no se seleccionaron organismos de un sólo sexo, sólo se seleccionaron por su peso (20 ± 2 g). Después de los tres meses de inyección, se eutinizaron los organismos y en condiciones asépticas, se hizo una exploración abdominal y no se observó de manera macroscópica algún daño tisular en órganos principales (hígado, páncreas, riñón y bazo).

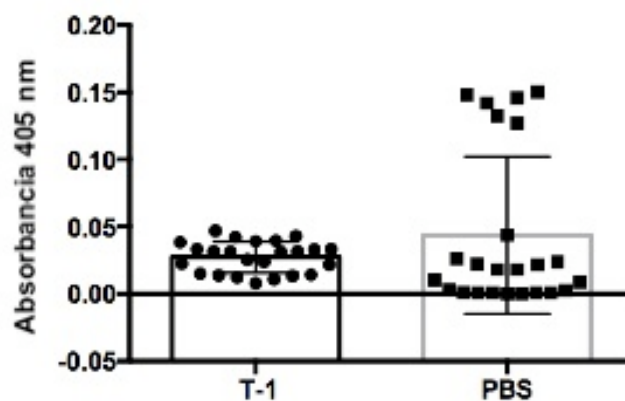


Figura 35. Ensayo preliminar de toxicidad del vNAR T-1 en ratones silvestres. No existe diferencia entre el grupo inyectado con PBS 1X y el grupo inyectado con T-1. Se graficó la media de cada grupo y su desviación estándar. Los datos se analizaron con el paquete Prism 6.

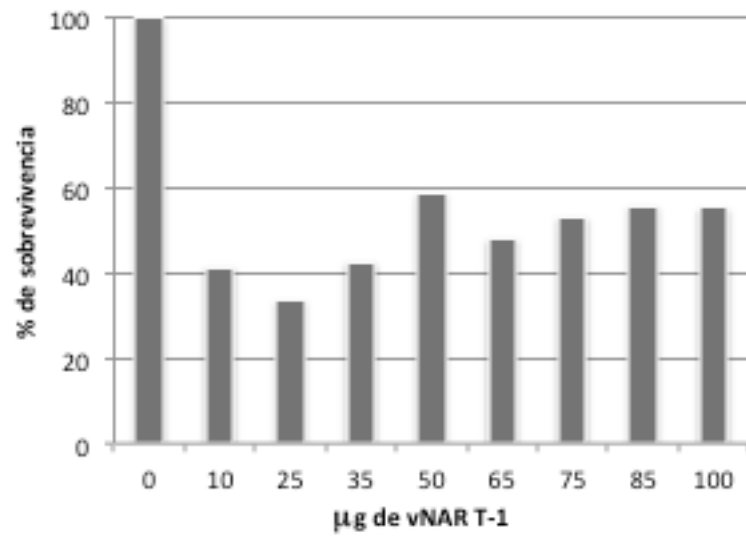
VII.3.12 Ensayo preliminar de citotoxicidad de T-1 *in vitro* empleando cultivo primario de hígado aislados de ratones *Wt*.

En la Figura 34a, se muestra el porcentaje de supervivencia a las 24 horas de incubación de las células con diferentes cantidades del anticuerpo T-1. Los datos se normalizaron al 100% de supervivencia comparando con células que no contenían en su medio de cultivo al anticuerpo T-1. Existe una disminución del 60% entre 10 μ g de T-1 y el control sin anticuerpo. Sin embargo, no existe diferencia en la supervivencia celular entre el aumento de las concentraciones de anticuerpo empleadas en este trabajo.

Al comparar entre las concentraciones empleadas en la Figura 34b (después de 48 horas de incubación con el anticuerpo T-1), no existe diferencia entre ellas.

Estos resultados preliminares, pueden indicar que con las cantidades de T-1 empleadas en este trabajo no existe efecto de muerte celular en hepatocitos, lo cual puede significar que el anticuerpo T-1 no daña las células de este órgano principal en el cual en un organismo vivo serían procesadas para su eliminación.

a)



b)

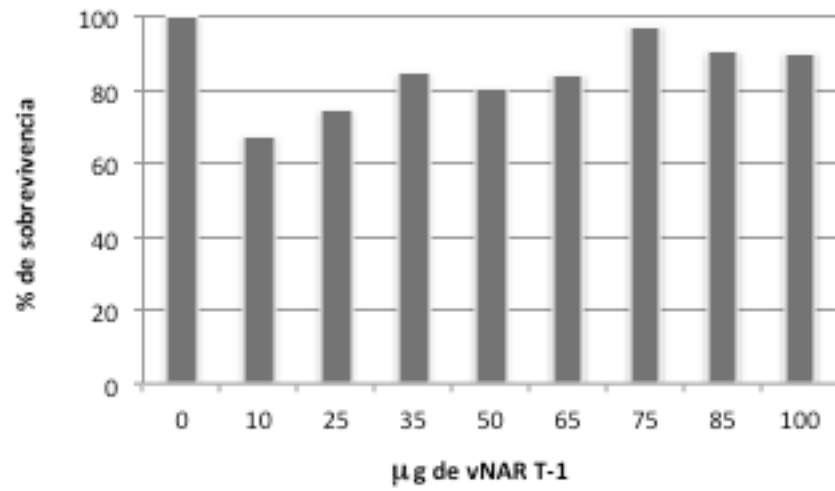


Figura 36. Ensayo de citotoxicidad en cultivo primario de hepatocitos. a) Ensayo de supervivencia a las 24 horas. **b)** ensayo de supervivencia a las 48 horas. No existe diferencia entre las cantidades usadas de anticuerpo T-1.

VII.4 DISCUSIONES

Previamente, se ha demostrado que es posible aislar anticuerpos de dominio sencillo partiendo de tiburones no inmunizados y que estos anticuerpos mantienen su capacidad de reconocimiento y una alta afinidad por su antígeno (Nuttall *et al* 2002).

En el Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, se han obtenido anticuerpos de dominio sencillo de bibliotecas no inmunes que tienen capacidad de reconocimiento y neutralización de diversos antígenos, por ejemplo: Mendoza en 2008, aisló un vNAR con capacidad de reconocer la proteína PA de *Bacillus anthracis*; Montoya en 2010, aisló tres vNAR con capacidad de neutralizar fracciones del veneno del alacrán *Androctonus australis*; Vargas en 2010, aisló un vNAR que reconoce a IL-18. También se han aislado diversos anticuerpos de bibliotecas inmunes. En este trabajo, se empleó una biblioteca de fragmentos de anticuerpo vNAR, obtenida de un tiburón *Heterodontus francisci* no inmunizado y, mediante la técnica de despliegue en fagos, se seleccionó un vNAR (T-1) que tiene capacidad de reconocer y neutralizar *in vitro* la acción biológica de la citocina TGF β .

Al re-amplificar la biblioteca no inmune, se obtuvieron 9.44×10^7 ufc, después de aplicar lavados astringentes este título disminuyó a 8.76×10^5 , lo cual indica que se eliminaron gran cantidad de fagémidos que desplegaban proteína vNAR con poca afinidad por la citocina, al incrementar los lavados y al amplificar los fagémidos salientes de la R2, se obtuvieron 4.57×10^8 ufc en la Ronda 3, lo cual indica un incremento de un orden de magnitud después de la selección.

De la Ronda 3, se seleccionaron al azar 32 colonias aisladas, con las cuales se realizó un PCR empleando los oligonucleótidos ompseq y gback. Se

obtuvieron colonias positivas a inserto de 600pb, esto representa el 56% de insertos en la biblioteca. Se obtuvo la secuencia de los fragmentos vNAR previo purificación del plásmido pCOMb3X. Al menos se obtuvieron tres secuencias que cumplieran con las siguientes características: estar en un marco de lectura correcto; ausencia de codones de paro dentro de la secuencia y poseer una secuencia que no se hubiese aislado previamente en el laboratorio.

Los vNAR aislados, se denominaron T-1, T-20 y T-28. Al analizar las secuencias de los tres vNAR aislados, se observa que conservan la estructura correspondiente a los vNAR tipo II, al contener dos cisteínas canónicas en el FR1 y FR3, así como una cisteína en el centro del CDR1 y otra adicional en el CDR3, según lo descrito por (Roux et al. 2008).

El plásmido pCOMb3X que tenía clonado el vNAR, fue electroporado en células de *E. coli* BL21(DE3) y se produjo anticuerpo de forma soluble y fue extraído del periplasma celular. Con este extracto, se realizó una ELISA de expresión en la cual se observa que el anticuerpo vNAR T-1 tiene una expresión 3.5 veces mayor respecto a las T-20 y T-28.

En el ELISA de reconocimiento, T-1 también muestra un mejor reconocimiento hacia TGF β 1. En esta ELISA, se puede observar que no existe diferencia significativa entre el reconocimiento a la citocina y el reconocimiento a albúmina por los vNAR T-20 y T-28. La selección de anticuerpos que se unen a la solución bloqueadora o al plástico de la placa de ELISA, ha sido documentado previamente. Es posible que durante las rondas de selección se amplifiquen vNAR que se unen a la albumina (Barbas et al. 2001).

Debido a los resultados obtenidos en ambos ELISA's, se consideró al vNAR T-1 como el único anticuerpo aislado con capacidad de reconocer a la citocina TGF β 1. Se realizó una inducción a pequeña escala y se purificó el anticuerpo por afinidad a metales. En la Figura 25, se muestra un gel desnaturizante de poliacrilamida, donde se observa que la purificación fue exitosa, aunque existen algunas bandas accesorias de 25 y 50 kDa, pero no representan la mayoría de la proteína purificada (aproximadamente 25%), por lo

tanto, se consideró que es posible expresar eficientemente el anticuerpo vNAR en *E. coli*, sin embargo, para la realización de posteriores ensayos, será necesario producir mayores cantidades de anticuerpo, para lo cual, se realizaron inducciones en biorreactores a volúmenes de 10 L.

El cultivo se realizó en jarras de vidrio de 15 L, y se controlaron los parámetros físicos: temperatura, pH, TOD (tensión de oxígeno disuelto), y agitación con un margen de cambio mínimo. En la Figura 27a, al graficar las RPM y la TOD se observó un incremento de la agitación cuando existe un decremento en la TOD, esto debido a que la biomasa en cultivo tiene una demanda metabólica importante y su consumo de oxígeno es mayor; el controlador empleado permite que automáticamente se aumenten las RPM para contrarrestar las necesidades metabólicas del cultivo. El cultivo se indujo cuando se encontraba a una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, dado que en ese punto el cultivo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, como se muestra en la Figura 26.

Después de la inducción, se obtuvo la proteína mediante extracción periplásmica y se purificó por afinidad a metales. Debido al volumen final de cultivo y la cantidad de biomasa generada después del bioproceso (450 g/L), se hicieron lotes de 400 mL cada uno, congelando el paquete celular. De la purificación se obtuvieron diferentes fracciones (Figura 28), siendo la fracción E1 la que contiene mayor concentración de anticuerpo, sin embargo, existe una gran cantidad de proteínas accesorias. Por lo tanto, después de la cuantificación, se consideró que solo el 50% de proteína cuantificada correspondía al vNAR T-1. En la fracción E2, se observan menos bandas accesorias, sin embargo esto puede deberse a la cantidad de proteína cargada en el gel.

Al analizar estas fracciones mediante western blot con el anticuerpo específico anti-HA (Figura 29), se observa que sólo la banda correspondiente a 16 kDa es reconocida por el anticuerpo, lo cual implica que las bandas accesorias observadas corresponden a proteínas propias de *E. coli* que no fueron eliminadas efectivamente en los lavados, por lo tanto se recomienda modificar las

condiciones de elusión ya sea variando la concentración de imidazol, pH o la concentraciones de sales en los amortiguadores usados.

Para determinar si el anticuerpo T-1 tiene capacidad de reconocimiento de las diferentes isoformas de mamífero de TGF β , se realizó un ELISA de reconocimiento (Figura 30) donde se observó que T-1 tiene capacidad de reconocimiento de las tres isoformas, sin embargo, muestra un mayor reconocimiento ($p < 0.005$) a la isoforma 1. Las tres isoformas de esta citocina son similares en función y secuencia, además se unen a los mismos receptores, por lo tanto emplear un anticuerpo que tenga capacidad de reconocer a las tres isoformas puede considerarse ventajoso al considerar en un posible uso como agente terapéutico.

Una vez determinado que el anticuerpo T-1 tiene capacidad de reconocimiento, se realizaron ensayos con el gen reportero luciferasa y las células Mv1Lu, para determinar si también tenía capacidad de neutralización. En este caso sólo se pudieron probar las isoformas 1 y 2. Se empleó como control positivo β glucano del cual ya esta caracterizada su acción en este modelo de luciferasa. Vilchis-Landeros y colaboradores (2001), demostraron que el β glucano tiene preferencia por el bloqueo de la isoforma TGF β 2 (2 nM); con respecto a TGF β 3 (20 nM) y TGF β 1 (20 nM). Lo cual significa que el β glucano se une fuertemente a TGF β .

Con base en los resultados que se muestran en la Figura 31a,) para neutralizar 2 pM de TGF β 1, del control β glucano se necesita 20 nM y del anticuerpo T-1 se necesita 6.6 mM. Esta es la máxima concentración analizada en este ensayo. En el caso de TGF β 2, de glucano es necesario 2.5 nM para inhibir un 70% y a 25 nM existe una inhibición del 92%. Con este resultado, se corrobora que el β glucano tiene mayor afinidad por le isoforma 2. En el caso de T-1, se necesitan 6.6 mM para inhibir el 97% del efecto de la citocinas, pero al usar 0.053 mM de anticuerpo se puede inhibir un 38% de la acción biología de la citocina. Este resultado podría sugerir que al emplear un modelo *in vitro*, el anticuerpo T-1

posee una mayor capacidad de neutralizar el efecto de la isoforma 2, aún cuando en el ELISA de reconocimiento existe diferencia entre el reconocimiento a TGF β 1 y TGF β 2, esto se puede deber al modelo de neutralización *in vitro* utilizado.

Para ambos ensayos es necesario emplear diferentes cantidades de anticuerpo y para poder generar una curva dosis-respuesta entre los puntos de 1.6 mM a 6.6 mM y determinar la DE₅₀, así como obtener proteína con un mayor grado de pureza y concentración. También, es necesario realizar este ensayo con la isoforma 3.

Al comparar las concentraciones a las cuales se obtiene algún grado de inhibición para ambas isoformas es claro que, se necesita menor cantidad de β glucano para inhibir a las citocinas y aproximadamente 300 veces más vNAR para el caso de TGF β 1. Para TGF β 2, se necesitan aproximadamente 260 veces más vNAR que β glucano. Si se consideran los pesos moleculares de 300 kDa para el β glucano y de 16 kDa para el vNAR, es posible que el anticuerpo vNAR tenga la capacidad de ingresar a tejidos donde el β glucano no pueda ejercer su efecto, lo cual le da una ventaja al anticuerpo de 16 kDa.

Además, se debe considerar que al tratar de bloquear una citocina con efecto pleotrópico como TGF β 1, pueden generar problemas en un organismo vivo.

Al usar el β glucano expresado en un sistema de baculovirus, es posible obtener un homodímero estable que se une a TGF β con una afinidad de 3.5 nM; en su forma monomérica tiene una K_d es de 1.9 nM. Se ha observado citotoxicidad al emplear el betaglucano en organismos vivos (Hernández-Pando, comunicación personal), posiblemente debido a su tamaño y alta afinidad, por lo tanto, se plantea que el anticuerpo vNAR podría presentar un menor grado de citotoxicidad. Hasta el momento no se ha analizado la K_d del vNAR al interactuar con las isoformas de la citocina.

Con base en estos resultados, es posible que el anticuerpo vNAR seleccionado llamado T-1, tenga la capacidad de unirse al sitio activo de las citocinas TGF β 1 y TGF β 2, dado que en el ensayo de luciferasa y a la máxima

concentración de anticuerpo utilizada, es posible neutralizar el efecto de ambas citocinas. Esto es posible pues las citocinas tienen una similitud en sus secuencias del 90% y similitud en su acción biológica.

Con la intención de determinar si el anticuerpo T-1 despierta respuesta inmune en un ensayo preliminar, se inyectaron ratones silvestres (20 g/ratón) con 10 μ g de anticuerpo T-1 durante un periodo de tres meses y por vía intraperitoneal. Se sangraron los ratones y se realizó un ELISA empleando el anticuerpo T-1 como antígeno. En la Figura 30, se muestra el resultado de los dos grupos tratados, donde no hay diferencia significativa entre los ratones inyectados con PBS 1X y los ratones inyectados con el vNAR T-1. En el caso de las lecturas de absorbancia del grupo inyectado con T-1, se encuentran cercanas al límite inferior del lector de placas de ELISA, con un promedio de 0.027. En el caso de los ratones tratados con PBS 1x, la media fue de 0.044, pero con una desviación estándar de 0.057. En el transcurso de las inyecciones, no se observaron signos de intoxicación en los ratones del grupo tratado con T-1.

En la placa de ELISA se analizaron por igual una proteína no relacionada pero que contiene la etiqueta de hemaglutinina y otra proteína no relacionada que contiene la etiqueta de seis histidinas, ambas proteínas se pusieron en contacto con el suero de tres ratones y las lecturas obtenidas son iguales a las obtenidas para el anticuerpo T-1.

El anticuerpo T-1 contiene en su secuencia las etiquetas de 6 histidinas empleada para la purificación y la etiqueta de hemaglutinina empleada en la detección, en este proyecto no se eliminaron estas etiquetas con el objetivo de para trabajar únicamente con el vNAR nativo. La eliminación de estas etiquetas puede favorecer el uso de este anticuerpo como agente terapéutico, debido que disminuiría posibles efecto secundarios, ya que la etiqueta de hemaglutinina se considera antigénica, y podría despertar respuesta inmune en el organismo a tratar.

En un ensayo preliminar de citotoxicidad, se empleó un cultivo primario de hepatocitos extraído de ratones silvestres. Se puso en contacto 35,000 células

con diferentes concentraciones del anticuerpo T-1 (10 a 100 μg) y se cultivaron por 24 y 48 horas. Se determinó la actividad metabólica usando el reactivo Cell Titer. En la Figura 34a), se observa que existe una disminución del 30% entre el control sin T-1 y la concentración de 10 μg sin embargo, al comparar las diferentes concentraciones de T-1 aplicadas no existe diferencia entre ellas. Estos resultados preliminares, pueden indicar que con las cantidades de proteína T-1 empleadas en este trabajo, no existe efecto citotóxico en hepatocitos, lo cual puede significar que el anticuerpo T-1 no daña las células de este órgano principal sin embargo, es necesario realizar más experimentos con mayor concentración de anticuerpo T-1.

CAPITULO IV

VIII.1 CONCLUSIONES GENERALES

1. Se aisló un anticuerpo de dominio sencillo vNAR denominado T43, con capacidad de neutralizar *in vitro* el efecto biológico de la citocina TNF α .
2. Partiendo del gen T43 optimizado, se diseñó un anticuerpo quimérico complementado por la región bisagra y CH2 de humano, clonando y expresándolo exitosamente en *Pichia pastoris*.
3. Se realizaron fermentaciones en lote agitado del anticuerpo quimérico T43ch usando la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* X33, obteniendo un rendimiento de 3.3 mg/mL, sin embargo al evaluar la producción de la proteína purificada por afinidad a metales, mediante electroforesis, se observaron tres posibles formatos del anticuerpo, forma dimérica (58 kDa), monomérica (28 kDa) y en el peso de un dominio sencillo (14 kDa).
4. En el ensayo de neutralización *in vitro* de 3DE₅₀ de rhTNF α , el anticuerpo quimérico T43ch tiene una CI₅₀ de 24.94 μ g/mL mientras el control F(ab')₂ de 0.094 μ g/mL, por lo que son necesarias 270 veces más anticuerpo quimérico para lograr el mismo efecto inhibitorio. Se debe obtener una mayor concentración y pureza del formato quimérico T43ch de 58 kDa para hacer comparables las eficiencias de neutralización de ambos anti-TNF α .
5. Se obtuvo un anticuerpo de dominio sencillo vNAR denominado T-1, partiendo de una biblioteca no inmune del tiburón *Heterodontus francisci*, y

con capacidad de reconocimiento de la citocina TGF β isoformas 1, 2 y 3, y neutralización de las isoformas 1 y 2.

6. En ensayos preliminares en ratones *Wt* en los cuales se inyectó con 10 μ g del anticuerpo vNAR T-1, durante un periodo de tres meses no se detectó la presencia de anticuerpos de ratón anti-vNAR, esto podría indicar una escasa inmunogenicidad del anticuerpo T-1.
7. En un ensayo preliminar de citotoxicidad en cultivo primario de hígado de ratón, que fue incubado con diferentes concentraciones de vNAR T-1, no se observaron efectos citotóxicos o citolíticos.
8. Los resultados obtenidos en la presente tesis, indican que es posible obtener anticuerpos de dominio sencillo de tiburón inmunizado y no inmunizado, con capacidad neutralizante de citocinas humanas. También, que es posible generar diferentes formatos de los mismos, manteniendo la capacidad de neutralización *in vitro*. Los dominios sencillos podrían mostrar baja o nula inmunogenicidad y citotoxicidad en modelos murinos *Wt*.
9. Se puede concluir, que los anticuerpos de dominio sencillo aislados de tiburón y las modificaciones en sus formatos, demuestran la versatilidad de estas moléculas como posibles agentes terapéuticos, de diagnostico *in situ* y *ex vivo* en enfermedades asociadas a desregulaciones de citocinas.

IX. PERSPECTIVAS

1. Optimizar las condiciones de fermentación y purificación del gen quimérico T43ch para obtener una mayor producción y pureza.
2. Determinar la afinidad del anticuerpo quimérico.
3. Realizar ensayos de farmacocinética para los anticuerpos de dominio sencillo (T43) y quimérico (T43ch).
4. Realizar ensayos *in vivo* en un modelo de tuberculosis en ratones empleando el anticuerpo de domino sencillo T-1.

X. LITERATURA CITADA

Abbas AK y Lichtman AH. 2003. Cellular and molecular immunology. 5ta edición. Saunders, Philadelphia, USA. 562 pp.

Andreaskos E., Foxwell B., Brennan F., Maini R., Feldmann M. 2002. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. Cytokine and Growth Factor Reviews. 13: 299-313 p.

Barbas C., Burton D., Scott J., Silverman G. 2001. Phage Display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. 1990. The cell biology of transforming growth factor beta. Biochim Biophys Acta. 1032(1): 79-87 p.

Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, Dijkmans BA, Aarden L, Wolbink GJ. 2011. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long term follow up. JAMA. 305(14): 1460-8 p.

Bernstein R., Schluter S., Shen S., Marchalonis J. 1996. A new high molecular weight immunoglobulin class from the carcharhine shark: Implications for the properties of the primordial immunoglobulin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93: 3289–3293 p.

Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. 1984. Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature*. 312(5995): 643-646 p.

Cereghino JL y Gregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24(1):45–66 p.

Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329-332 p.

Chang J, Kavanaugh A. 2005. Novel therapies for rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 12(3): 217-25 p.

Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. 2004. What is Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)?. *The British Association of Plastic Surgeons.* 57: 215-221 p.

Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris PA, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G, Thill GP. 1987. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio Technol.* 5: 479-485 p.

Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman GA. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1316-1323 p.

Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, Beirnaert E, Jonckheere H, Van de Wiele C, Staelens L, Hostens J, Revets H, Remaut E, Elewaut D, Rottiers P. 2006. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 54(6): 1856-66 p.

Chen YF, Jobanputra P, Barton P, Jowett S, Bryan S, Clark W, Fry-Smith A, Burls A. 2006. A systemic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic

evaluation of their cost-effectiveness. *Health Technol Assess.* 10(42):iii-iv, xi-xiii, 1-229.

Diaz M., Greenberg A., Flajnik M. 1998. Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 95: 14343-14348 p.

Diaz M., Stanfield R., Greenberg A., Flajnik M. 2002. Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development. *Immunogenetics.* 54: 501–512 p.

Diaz M., Velez J., Singh M., Cerny J., Flajnik M. 1999. Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: The translesion synthesis model of somatic hypermutation. *International Immunology.* 11: 825–833 p.

David C, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. 2004. What is transforming growth factor-beta (TGF- β)? *British Journal of Plastic Surgery.* 57(3): 215-221 p.

Dooley H, Flajnik M, Porter A. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular Immunology.* 40: 25-33 p.

Dooley H, Flajnik M. 2005. Shark immunity bites back: Affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *European Journal of Immunology.* 35: 936–945 p.

Dooley H, Flajnik MF. 2006. Antibody repertoire development in cartilaginous fishes. *Develop Comp Immunol.* 30: 43-56 p.

Dumoulin M., Conrath K., van Mierhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A. 2002. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*. 11: 500-515 p.

Els-Conrath K, Lauwereys M, Muyldermans S. 2001. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J Biol Chem*. 276(10): 7346-50 p.

Fennell BJ, Darmanin-Sheehan A, Hufton SE, Calabro V, Wu L, Müller MR, Cao W, Gill D, Cunningham O, Finlay WJ. 2010. Dissection of the IgNAR Vdomain: molecular scanning and orthologue database mining define novel IgNAR hallmarks and affinity maturation mechanisms. *J Mol Biol*. 400(2):155-70 p.

Fleischmann R, Shealy D. 2003. Developing a new generation of TNFalpha antagonists for the treatment of rheumatoid arthritis. *Mol Interv*. 3(6): 310-318 p.

Gasser B y Mattanovich D. 2007. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale?. *Biotechnol Lett*. 29: 201-212 p.

Gellissen G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54(6): 741-50 p.

Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, van der Klei I. 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*: a comparison. *FEMS Yeast Res*. 5(11): 1079-96 p.

Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity: Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226: 889–896 p.

Hernández-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado HA, Aguilar-León D, Vilchis-Landeros MM, Mata-Espinosa D, Mendoza V, López-Casillas F. 2006. A combination of a transforming growth factor- β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2006 May; 144(2): 264–272 p.

Higgins DR y Cregg JM. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*. 103: 1-15 p.

Holliger P., Hudson P. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*. 23(9): 1126-1136 p.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321: 522–525 p.

Jones SM, Kazlauskas A. 2001. Growth factor dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Letters*. 490:110-116 p.

Juárez P, Vilchis-Landeros MM, Ponce-Coria J, Mendoza V, Hernández-Pando R, Bobadilla NA, López-Casillas F. 2007. Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. *Renal Physiol*. 292(1): F321-F329 p.

Juarez K, Dubberke G, Lugo P, Koch-Nolte F, Buck F, Haag F, Licea A. 2011. Monoclonal antibodies for the identification and purification of vNAR domains and IgNAR immunoglobulins from the horn shark *Heterodontus francisci*. *Hydridoma*. 30(4): 323-329 p.

Kabat EA. 1991. Sequences of proteins of immunological interest. Volumen 2. National Institutes of Health (US). Columbia University.

Letterio JJ y Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*. 16: 137-61 p.

Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. 1993. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNR receptor type, TNF R55. *J Exp Med*. 177(5): 1277-86 p.

Massagué J. 1987. The TGFβ family of growth and differentiation factors. *Cell*. 49: 437-438 p.

Massagué J. 1992. Receptors for the TGFβ family. *Cell*. 69: 1067-1070 p.

McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 348: 552–554 p.

Mease PJ. 2011. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of this clinic efficacy and safety. *Rheumatology*. 50(2): 261-70 p.

Montoya D. 2010. Obtención de anticuerpos tipo vNAR que reconocen y neutralizan venenos de alacrán. Tesis de Maestría. CICESE, México.

Muyldermans S. 2001. Single domain camel antibodies: Current status. *Journal of Biotechnology*. 74: 277–302 p.

Nishimoto N, Kishimoto T. 2008. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol*. 181: 151–160 p.

Nuttall S., Irving R., Hudson P. 2000. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 1(3): 253-263 p.

Nuttall S, Humberstone K, Krishnan U, Carmichael J, Doughty L, Hattarki M, Coley A, Casey J, Anders R, Foley M. 2004. Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. *Proteins*. 55: 187–197 p.

Nuttall S, Krishnan U, Hattarki M, de Gori R, Irving R, Hudson P. 2001. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Molecular Immunology*. 38: 313-326 p.

Nuttall S, Krishnan U, Doughty L, Nathanielsz A, Ally N, Pike R, Hudson P, Kortt A, Irving R. 2002. A naturally occurring NAR variable domain binds the kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*. *Federation of European Biochemical Societies*. 516: 80-86 p.

Nuttall S, Krishnan U, Doughty L, Pearson K, Ryan M, Hoogenraad N, Hattarki M, Carmichael J, Irving R, Hudson P. 2003. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3543–3554 p.

Pasche B. 2001. Role of Transforming Growth Factor β in cancer. *J Cell Physiol*. 186: 153-168 p.

Paul W. 2003. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins. 4a edición. USA. 1659 pp.

Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang Y, Li F, Lynaugh H, Malleb M, McKelvey T, Mitchell T, Nylen A, Rittenhour A, Stadheim A, Zha D, Anjou M. 2009. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 139; 318–325 p.

Rai M y Padh H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr Sci.* 80(9): 1121-1128 p.

Roux K., Greenberg A., Greene L., Strelets L., Avila D., McKinney E., Flajnik M. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proceeding of the National Academy of Sciences.* 95: 11804–11809 p.

Rumfelt L, Lohr R, Dooley H, Flajnik M. 2004. Diversity and repertoire of IgW and IgM VH families in the newborn nurse shark. *BCM Immunology.* 5(8) doi: 10.1186/1471-2172-5-8.

Rumfelt L, McKinney E, Taylor E, Flajnik M. 2002. The development of primary and secondary lymphoid tissues in the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*: B-cell zones precede dendritic cell immigration and T-cell zone formation during ontogeny of the spleen. *Scandinavian Journal of Immunology.* 56: 130–148 p.

Sambrook J y Russell WD. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3era edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344 pp.

Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. 2009. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 18: 936-48 p.

Spencer-Green G. 2000. Etanercept (Enbrel): update on therapeutic use. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 59(suppl I): 46-49 p.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assosian RK. 1986. Transforming growth factor β biological function and chemical structure. *Science*. 233: 532-534 p.

Stanfield R., Dooley H., Flajnik M., Wilson I. 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody with lysozyme. *Science*. 304(5691): 1770-1773 p.

Streltsov V, Carmichael J. y Nuttall S. 2005. Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein Science*. 14: 2901-2909 p.

Streltsov V, Varghese J, Carmichael J, Irving R, Hudson P, Nuttall S. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(34): 12444-12449 p.

Taylor PC. 2010. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 10(3): 308-15 p.

Thalayasingam N, Isaacs JD. 2011. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 25(4):549-67 p.

Toossi Z, Ellner JJ. 1998. The Role of TGF β in the Pathogenesis of Human Tuberculosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 87(2): 107–114 p.

Vargas C. 2010. Obtención de fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con afinidad por IL-18 humana. Tesis Maestría. CICESE, Mexico. 77 pp.

Verhoeyen M, Riechmann L. 1988. Engineering of antibodies. *Bioessays* 8: 74–78 p.

Weinblatt ME. 2002. The best of times, the worst of times: rheumatology 2001. *Arthritis Rheum.* 46(3): 567-73 p.

Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerh A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol.* 198:157–174 p.

Zhang W, Inan M, Meagher MM. 2000. Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 5: 275-287 p.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

Revisadas al mes de noviembre de 2012.

<http://www.ablynx.com/>

<http://www.rcsb.org/>

http://www.invitrogen.com/.../manuals/ppicz_man.pdf/

XI. SOLICITUD DE PATENTE

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/056056 A2

(43) Fecha de publicación internacional
12 de mayo de 2011 (12.05.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/MX2010/000122
- (22) Fecha de presentación internacional: 4 de noviembre de 2010 (04.11.2010)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: 61/258,118
4 de noviembre de 2009 (04.11.2009) US
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): LABORATORIOS SILANES, S.A. de C.V. (MX/MX); Amores No. 1304, Col. del Valle, C.P. 03100, México, D.F. (MX).
- (72) Inventores: LICEA NAVARRO, Alexei Fedorovich; Niños Héroes 1873, Col. Hidalgo, C.P. 22880, Ensenada, Baja California (MX). CAMACHO VILLEGAS, Tanya Amanda; Santa Elena No. 108, Fraccionamiento Misiones de Altamir, C.P. 22813, Ensenada, Baja California (MX). SÁNCHEZ CASTREJÓN, Edna; Riveroll 1449-2, Col. Centro, C.P. 22800, Ensenada, Baja California (MX). MATA GONZÁLEZ, María Teresa; Amores No. 1304, Col. Del Valle, C.P. 03100, México, D.F. (MX). GARCÍA HUBBELOHDE, Walter J.; Amores No. 1304, Col. Del Valle, C.P. 03100 México D.F. (MX). OLGUÍN JIMÉNEZ, Araceli; Amores No. 1304, Col. Del Valle, C.P. 03100 México D-F. (MX). PANAGUA SOLÍS, Jorge F.; Amores No. 1304, Col. Del Valle, C.P. 03100 México D.F. (MX).
- (74) Mandatario: PARDAVELL JUAREZ, María Angélica; San Francisco No. 310, Col. del Valle, C.P. 03100 México D.F. (MX).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NL, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ANTI-CYTOKINE V_HNAR DOMAINS

(54) Título: DOMINIOS V_HNAR ANTI-CITOCINAS

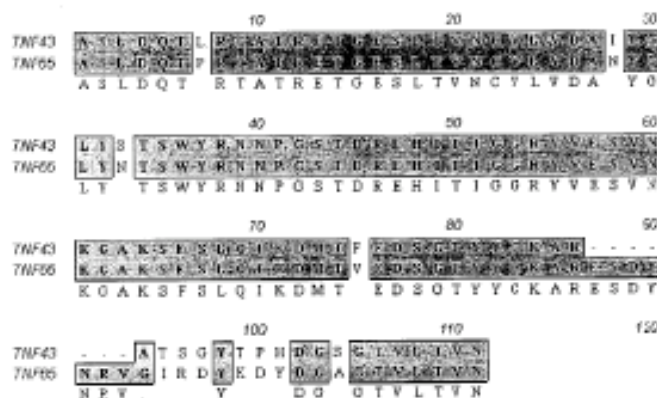


FIG. 1

(57) Abstract: The invention relates to selected sequences of variable regions called VH_{NAR} from antigen receptor Ig_{NAR}-type immunoglobulins from elasmobranchs with a specificity for cytokines. The invention also relates to pharmaceutical compositions containing recombinant vNAR proteins, encoded by the VH_{NAR} sequences, to be used in the topical or systemic treatment of ailments depending on the action of cytokines for inhibiting its activity, especially that of interleukins 1 and 6 (IL-1, IL-6) of the tumoral necrosis factor (TNF) and the vascular endothelial growth factor (VEGF).

(57) Resumen: La presente

[Continúa en la página siguiente]

WO 2011/056056 A2

WO 2011/056056 A2 

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección regional admisible):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

invención se relaciona con secuencias seleccionadas de regiones variables denominadas VHINAR provenientes de inmunoglobulinas tipo IgNARs receptoras de antígenos que provienen de elasmobranchios con especificidad para citocinas. También se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen a las proteínas denominadas vNAR recombinantes, codificadas por las secuencias VHINAR, para usarse en el tratamiento tópico o sistémico de padecimientos dependientes de la acción de citocinas para así inhibir su actividad, en particular de interleucinas 1 y 6, (IL-1, IL-6) del factor de necrosis tumoral (TNF) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

ANEXO I

I.1 Medios de cultivo para *E. coli*

I.1.1 Medio SB (Super Broth).

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
Tryptona	32 g
Extracto de levadura	20 g

NaCl	5 g
------	-----

Disolver y ajustar pH a 7.4.

Aforar a 1 L. Esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente.

Almacenar a 4° C.

I.1.2 Medio SOC pH 7.0.

Para preparar 1 L, mezclar:

Tryptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
KCl	186 mg
MgCL ₂ 1M	10 mL

ANEXO 2

II.1 Medios de cultivo empleados para el crecimiento de *Pichia pastoris*

II.1.1 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

Para preparar 1L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g

Disolver y aforar a 900 mL. Esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos

Adicionar 10X D (Anexo 3) 100 mL

Enfriar a temperatura ambiente. Si es necesario agregar Zeocina a concentración final de 100 µg/mL -50 µg/mL

II.1.2 10X D. Dextrosa al 20%.

Para preparar 1 L, mezclar:

D-glucosa	200 g
-----------	-------

Disolver y aforar a 900 mL. Esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 15 minutos o por filtración.

Almacenar a 4° C

II.1.3 10X Amortiguador de Fosfato de potasio, pH 6.0

Para preparar 1 L, mezclar:

K ₂ HPO ₄ 1M	132 mL
------------------------------------	--------

KHPO ₄ 1M	868 mL
----------------------	--------

Ajustar pH con KOH 5M.

Esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos.

Almacenar a 4° C.

II.1.4 10X YNB. (Yeast Nitrogen Base).

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
----------------	--------

YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	34 g
---	------

Sulfato de amonio	100 g
-------------------	-------

Disolver y aforar a 1 L. Esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 15 minutos o por filtración.

Almacenar a 4° C.

II.1.5 10X Biotina. Biotina 20%.

Para preparar 100 mL, mezclar:

Agua destilada	100 mL
----------------	--------

Biotina	20 mg
---------	-------

Disolver y esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 15 minutos. Almacenar a 4° C.

II.2 6 10X GY. Glicerol 10%.

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	900 mL
----------------	--------

Glicerol 100%	100 mL
---------------	--------

Disolver y esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente.

Almacenar a 4° C.

II.2.7 Medio BMGY. (Buffered glycerol complex medium).

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
----------------	--------

Peptona	20 g
---------	------

Extracto de levadura	10 g
----------------------	------

Disolver y esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente.

Amortiguador de fosfato de Potasio	100 mL
------------------------------------	--------

(Anexo 3)

10X YNB	100 mL
---------	--------

500X Biotina	1 mL
--------------	------

10X Glicerol	100 mL
--------------	--------

II.2.8 Medio BMMY. (Buffered Methanol complex medium).

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g

Disolver y esterilizar a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente.

Amortiguador de fosfato de Potasio 100 mL

(Anexo 3)

10X YNB	100 mL
500X Biotina	1 mL

Adicionar metanol concentración final de 2%.

II.2.9 Medio FBSM (fermentation basal salts medium)

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
Ácido fosfórico, 85%	26.7 mL
Sulfato de calcio	0.93g
Sulfato de potasio	18.2 g
Sulfato de magnesio-7H ₂ O	14.9 g
Hidróxido de potasio	4.13 g
Glicerol	40 mL

Disolver, aforar a 1 L. Esterilizar en biorreactor a 121° C, 15 lb/pulg² por 20 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

II.2.10 Sales PTM1

Para preparar 1 L, mezclar:

Agua destilada	700 mL
Sulfato cupríco-5H ₂ O	6 g
Ioduro de sodio	0.08 g
Sulfato de magnesio-H ₂ O	3 g
Molibdato de sodio-2H ₂ O	0.2 g
Ácido bórico	0.02 g
Cloruro de cobalto	0.5 g
Cloruro de zinc	20 g
Sulfato ferroso-7H ₂ O	65 g
Biotina	0.2 g
Ácido sulfúrico	5 mL

Disolver y aforar a 1 L. Esterilizar por filtración.

Almacenar a temperatura ambiente.

NOTA: puede tener un precipitado después de mezclados los ingredientes.

Esterilice por filtración justo antes de usar.