

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**Facultad de Ciencias**



**Tesis como requisito parcial para obtener el título profesional de:**

**Biólogo**

**“DESARROLLO DE UN PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA LA  
PURIFICACIÓN EFICIENTE DE UN VNAR NEUTRALIZANTE DEL  
ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO”**

**Presenta:**

André Víctor Romero Castellares

Ensenada, Baja California a mayo de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS,  
CAMPUS ENSENADA.



**“DESARROLLO DE UN PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA LA  
PURIFICACIÓN EFICIENTE DE UN VNAR NEUTRALIZANTE DEL  
ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Biólogo**

PRESENTA

**André Víctor Romero Castellares  
1162276**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal y de acuerdo con el  
Art. 19 del R.G.E.P.E.P, emite los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

**DIRECTOR**

Dra. Olivia Cabanillas Bernal

**CODIRECTOR**

M en C. Estrella Azalia Nuñez Zarco

**SINODAL**

Dr. Julio Enrique Valencia Suárez

**SINODAL**

**“Por la Realización Plena del Ser”**

Resumen de tesis de André Víctor Romero Castellares como requisito parcial para obtención el título profesional de Biología.

Ensenada, B. C., México, mayo de 2024.

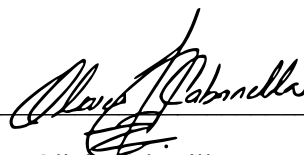
“DESARROLLO DE UN PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA LA PURIFICACIÓN EFICIENTE DE UN VNAR NEUTRALIZANTE DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO”

Resumen aprobado por:



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

**Director de tesis**



Dra. Olivia Cabanillas Bernal

**Codirector de tesis**

Los fragmentos VNAR de tiburón son las moléculas de unión a antígeno más pequeñas obtenidas naturalmente. Estas moléculas reciben gran atención por parte de la industria farmacéutica debido a sus características especiales de especificidad, tamaño y estabilidad, que los vuelven candidatos ideales para fines terapéuticos y de diagnóstico. Este estudio se centra en el desarrollo de un protocolo eficiente para la purificación del dominio VNAR nombrado CV0-43, obtenido a partir de una biblioteca sintética, el cual reconoce al antígeno carcinoembrionario (CEA), un importante marcador tumoral en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de colón. Para realizar la purificación de CV0-43, se utilizaron técnicas de cromatografía de afinidad a metales (IMAC) en un sistema de cromatografía líquida FPLC. En este trabajo se evaluó por primera vez la adición de Tritón X-100 y glicerol durante la purificación, para interrumpir interacciones no específicas de proteínas con la columna, y así mejorar la pureza de la proteína. Los resultados mostraron una alta pureza del VNAR purificado con base al análisis por SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones eluidas, aunque el rendimiento fue bajo con ~3mg/L de cultivo. Este bajo rendimiento se atribuyó al uso de un vector fagémido en lugar de un vector de expresión optimizado, así como a la pérdida de proteína de interés durante los lavados en la purificación. Los ensayos ELISA demostraron que el anticuerpo purificado reconocía eficazmente el antígeno CEA. Se concluyó que el uso de una solución de 2% de Tritón X-100 y un 10% de glicerol durante la purificación, aumenta el grado de pureza de la muestra sin comprometer la funcionalidad del anticuerpo CV0-43. Sin embargo, aunque el protocolo desarrollado es efectivo para obtener alta pureza, se recomienda optimizar el rendimiento de producción de la proteína mediante el uso de vectores de expresión. Estos hallazgos son importantes para futuras aplicaciones terapéuticas y diagnósticas del VNAR CV0-43.

**Palabras clave:** anticuerpos, VNAR, purificación, expresión, IMAC, antígeno carcinoembrionario (CEA), pComb3X, anticuerpos de tiburón.

Summary of thesis by André Víctor Romero Castellares as a partial requirement to obtain the Bachelor's degree in Biology.

Ensenada, B. C., México, May of 2024.

“DEVELOPMENT OF A STANDARDIZED PROTOCOL FOR THE EFFICIENT PURIFICATION OF A NEUTRALIZING VNAR AGAINST THE CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN”

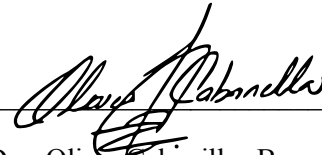
Summary approved by:



---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

**Thesis director**



---

Dra. Olivia Cabanillas Bernal

**Thesis codirector**

Shark VNAR fragments are the smallest naturally occurring antigen-binding molecules. These molecules receive significant attention from the pharmaceutical industry due to their special characteristics of specificity, size, and stability, making them ideal candidates for therapeutic and diagnostic purposes. This study focuses on developing an efficient protocol for purifying the VNAR domain named CV0-43, obtained from a synthetic library, which recognizes carcinoembryonic antigen (CEA), an important tumor marker in certain types of cancer, such as colon cancer. To purify CV0-43, immobilized metal affinity chromatography (IMAC) techniques were used in a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system. In this work, the addition of Triton X-100 and glycerol during purification was evaluated for the first time to disrupt nonspecific protein interactions with the column, thereby improving protein purity. The results showed a high purity of the purified VNAR based on SDS-PAGE and Western Blot analysis of the eluted fractions, although the yield was low at ~3mg/L of culture. This low yield was attributed to the use of a phagemid vector instead of an optimized expression vector, as well as the loss of the protein of interest during purification washes. ELISA assays demonstrated that the purified antibody effectively recognized the CEA antigen. It was concluded that using a 2% Triton X-100 and 10% glycerol solution during purification increases the sample's purity without compromising the functionality of the CV0-43 antibody. However, although the developed protocol is effective for obtaining high purity, it is recommended to optimize the protein production yield by using expression vectors. These findings are important for future therapeutic and diagnostic applications of the VNAR CV0-43.

**Keywords:** antibodies, VNAR, purification, expression, IMAC, carcinoembryonic antigen (CEA), pComb3X, shark antibodies

## **AGRADECIMIENTOS**

AGRADECIMIENTOS A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por brindarme la formación académica que ha sido fundamental para mi desarrollo profesional.

Al Departamento de Innovación Biomédicas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por darme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en sus instalaciones.

A mi director de tesis, Dr. Alexei Licea Navarro, por aceptarme como su alumno y brindarme su valiosa orientación para mi posgrado. A mi codirectora de tesis, Dra. Olivia Cabanillas, por guiarme con sabiduría y dedicación en la realización de este trabajo. A mi comité de tesis por su apoyo en formar parte de este trabajo.

A los miembros del laboratorio de biomédicas, por compartir sus conocimientos y asistir en mis experimentos.

A mis amigos de licenciatura, Javier, Carolina, Marcela, por su constante apoyo a lo largo de este proceso.

A mi familia, por su incondicional apoyo y siempre estar conmigo.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi familia. A mis padres, Graciela y Rubén, quienes me han permitido estudiar una carrera lejos de casa. Siempre me han apoyado en todos los aspectos y espero que estén orgullosos de cuánto he aprendido en estos últimos años. Los amo.

## ÍNDICE.

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 8  |
| 2. ANTECEDENTES. ....  | 10 |
| 2.1. Anticuerpos .....   | 10 |
| 2.2. Fragmentos Funcionales de los Anticuerpos.....                            | 12 |
| 2.3. Anticuerpos Terapéuticos.....   | 14 |
| 2.4. mAb de Origen Murino .....  | 15 |
| 2.5. Limitaciones .....  | 17 |
| 2.6. Nuevas Configuraciones de Anticuerpos .....                               | 18 |
| 2.7. Anticuerpos de Cadena Pesada .....  | 20 |
| 2.7.1. hcAbs de camélido / VHH o nanocuerpo.....                               | 20 |
| 2.7.2. IgNAR / VNAR.....   | 21 |
| 2.8. Ventajas de los sdAbs .....   | 23 |
| 2.9. Anticuerpos VNAR .....  | 24 |
| 2.10. Estrategias de generación de bibliotecas de anticuerpos VNAR.....        | 25 |
| 2.11. Sistemas de expresión para VNAR.....                                     | 27 |
| 2.12. Anticuerpo VNAR CV0-43.....  | 29 |
| 3. HIPÓTESIS.....  | 30 |
| 4. OBJETIVO GENERAL.....   | 30 |
| 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 30 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS. ....  | 30 |
| 6.1. Cepa bacteriana BL21(DE3) y vector pComb3x .....                          | 30 |
| 6.2. Transformación células bacterianas con pComb3X.....                       | 32 |
| 6.3. Evaluación de clonas por PCR de colonia.....                              | 32 |
| 6.4. Resiembra de cultivos aislados y criopreservación de las clonas .....     | 33 |
| 6.5. Expresión de VNAR recombinante .....                                      | 33 |
| 6.6. Extracción periplásmica de VNAR por choque osmótico .....                 | 34 |
| 6.7. ELISA para evaluar la expresión de VNAR .....                             | 34 |
| 6.8. Purificación de VNAR por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) ..... | 35 |
| 6.8.1. Gradiente. ....   | 35 |
| 6.8.2. Corrida. ....   | 36 |
| 6.9. Precipitación y desnaturalización de VNAR puro.....                       | 36 |

|   |    |
|---|----|
| <b>6.10. Inmunodetección de las proteínas recombinantes</b> .....   | 37 |
| 6.10.1. <i>Tinción Coomassie</i> . .....  | 37 |
| 6.10.2. <i>Western Blot</i> . .....   | 38 |
| <b>6.11. Diálisis de fracciones de VNAR purificado</b> .....  | 39 |
| <b>6.12. ELISA para evaluar el reconocimiento de los VNAR contra CEA</b> .....  | 39 |
| <b>7. RESULTADOS</b> .....  | 40 |
| <b>7.1. Transformación de células bacterianas con el plásmido pComb3X y evaluación mediante la PCR de colonia</b> ..... | 40 |
| <b>7.2. Expresión de VNAR recombinante</b> .....  | 40 |
| <b>7.3. Primera purificación mediante IMAC</b> .....  | 41 |
| <b>7.4 Purificación en forma de gradiente lineal mediante IMAC</b> .....  | 43 |
| <b>7.5. Purificación final mediante IMAC</b> .....  | 45 |
| <b>7.6. ELISA de reconocimiento contra CEA</b> .....  | 47 |
| <b>8. DISCUSIONES</b> .....   | 48 |
| <b>9. CONCLUSIONES</b> .....  | 52 |
| <b>10. REFERENCIAS</b> .....  | 53 |

## Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Amplificación de los genes transformados.....  | 40 |
| <b>Figura 2.</b> Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-HA.....  | 41 |
| <b>Figura 3.</b> Cromatograma de la primera purificación de CV0-43. ....  | 42 |
| <b>Figura 4.</b> Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida del VNAR purificado. ....   | 43 |
| <b>Figura 5.</b> Cromatograma de la purificación de CV0-43 en forma de gradiente. ....  | 44 |
| <b>Figura 6.</b> Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida del VNAR purificado en forma de gradiente. ....                               | 44 |
| <b>Figura 7.</b> Cromatograma de la purificación final de CV0-43.....   | 46 |
| <b>Figura 8.</b> Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida del VNAR purificado mediante las condiciones finales de lavado y elución..... | 47 |
| <b>Figura 9.</b> Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento de los anticuerpos contra CEA. ....  | 48 |

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) han desempeñado un papel fundamental en el avance de la medicina y la investigación biomédica al proporcionar una herramienta precisa y altamente específica para la detección y neutralización de agentes patógenos o células anormales en el cuerpo humano. Las aplicaciones de estas proteínas, a lo largo de las últimas décadas, han evolucionado para convertirse en la modalidad predominante en el tratamiento de una variedad de enfermedades, desde el cáncer hasta las enfermedades autoinmunes, estableciéndose como los fármacos predominantes en el mercado (Brekke, 2003; EmergenResearch, 2023).

A pesar de sus beneficios terapéuticos, los mAb terapéuticos enfrentan desafíos debido a sus elevados costos de producción y limitaciones farmacodinámicas. El tamaño de un anticuerpo humano convencional (~150 kDa) inflige restricciones en su penetración tisular y aclaramiento renal, lo que puede aumentar el riesgo de reacciones inmunes adversas y reducir su eficacia clínica (Chames *et al.*, 2009).

En respuesta a estas limitaciones, ha surgido un creciente interés en los anticuerpos de dominio único (sdAbs), que incluyen los nanocuerpos, derivados de camélidos, y los dominios VNAR, provenientes de tiburones. Estas moléculas son notablemente más pequeñas y compactas que los anticuerpos convencionales (de ~12-15 kDa) y presentan una serie de ventajas potenciales que los hacen atractivos para aplicaciones biomédicas y terapéuticas (Bannas *et al.*, 2017; Muyldermans, 2013).

Los sdAbs exhiben una solubilidad y estabilidad térmica excepcionalmente alta, junto con una resistencia a pH gástricos. Además, su tamaño compacto les permite penetrar tejidos con mayor facilidad y ser eliminados rápidamente del organismo, características que son deseables en terapias y diagnósticos (Arbabi-Ghahroudi, 2022; Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019; Juma *et al.*, 2021; Khalid *et al.*, 2021; Zielonka *et al.*, 2015).

A pesar de las ventajas que presentan los VNARs, existe una disparidad en el nivel de investigación con respecto a los nanocuerpos, que puede atribuirse a la mayor disponibilidad y facilidad de manipular camélidos en comparación con tiburones o a que los nanocuerpos fueron descubiertos antes que su contraparte en los peces cartilagosos (Matamoros & Gonzales, 2021). Sin embargo, el interés en los VNARs está en aumento debido a su versatilidad potencial y a las características únicas que ofrecen, lo que sugiere que existe un amplio espacio para la exploración y el desarrollo de estas proteínas como herramientas terapéuticas y diagnósticas.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método estandarizado para la purificación eficiente de un VNAR recombinante en un sistema de expresión de *Escherichia coli* a través de una combinación de técnicas, incluidas: transformación bacteriana, expresión recombinante, extracción periplásmica y purificación por cromatografía de afinidad a metales (IMAC); se busca establecer un protocolo reproducible para la obtención de VNAR puro con alto rendimiento.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1. Anticuerpos**

Los anticuerpos (Ab) o inmunoglobulinas (Ig), son proteínas circulantes producidas por los linfocitos B (células B) del sistema inmunológico de los vertebrados, en respuesta a la presencia de sustancias extrañas llamadas antígenos (Ag) (Abbas, 2021). Los Ag se definen como moléculas (incluyendo pequeños químicos, carbohidratos, lípidos y proteínas) capaces de desencadenar una respuesta inmunológica en un organismo que se origina de, alguna sustancia química, toxina, virus, bacteria, hongo o de otro microorganismo (Alberts, 2013).

La función principal de los anticuerpos consiste en reconocer y unirse a antígenos específicos, marcándolos para su inactivación o eliminación por parte de otros componentes

del sistema inmunológico, al mismo tiempo que colaboran con células efectoras específicas (Abbas, 2021). Los anticuerpos son altamente específicos y capaces de unirse a antígenos con un alto grado de precisión debido a su estructura única y, en comparación con los receptores de células T y componentes del complejo principal de histocompatibilidad, poseen una gran fuerza de unión hacia ellos (Abbas, 2021).

Todas las moléculas de anticuerpos comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad notable en las regiones que se unen a los antígenos. La mayoría de los anticuerpos de todos los seres vivos tienen una estructura tetramérica distintiva en forma de Y al estar compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras idénticas (LC) y dos cadenas pesadas (HC) también idénticas. Las cadenas están estabilizadas y unidas mediante enlaces disulfuro; las dos cadenas pesadas están unidas entre sí y cada cadena ligera está unida a una cadena pesada (Janeway, 2001).

Las cadenas de los anticuerpos se componen de dominios Ig, series de unidades estructurales homólogas y repetidas de láminas beta de alrededor de 110 aminoácidos de longitud que se pliegan independientemente en una forma globular compacta (Abbas, 2021). La cadena ligera típicamente está formada por dos de estos dominios Ig, mientras que la cadena pesada generalmente contiene tres o cuatro dominios Ig.

Tanto la cadena pesada como la ligera se componen de regiones amino-terminal y carboxilo-terminal, las cuales constituyen las regiones variables (V) y constantes (C), respectivamente. Los dominios Ig de las regiones V exhiben la mayor variabilidad en su secuencia de aminoácidos entre diferentes anticuerpos y son los responsables de la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse a diferentes antígenos y epítomos de un mismo antígeno.

Independientemente del tipo de cadena y del número total de dominios Ig de un anticuerpo, en una cadena siempre existirá un dominio Ig amino-terminal que conformará la

región V. Las regiones V de las cadenas ligeras (VL) se sitúan de manera adyacente a las regiones V de las cadenas pesadas (VH) para formar el sitio de unión al antígeno; y debido a las características estructurales básicas de un anticuerpo, una inmunoglobulina tiende a poseer al menos dos sitios de unión a antígeno, también conocido como parátomos (Abbas, 2021; Alberts, 2013).

Los dominios Ig constantes de las cadenas pesada y ligera (CH y CL, respectivamente) forman la región C y los múltiples dominios Ig de la cadena pesada están numerados empezando desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal (por ejemplo: CH1, CH2, CH3...) (Janeway, 2001).

Las regiones C no participan en la interacción con el antígeno, pero interactúan con células y moléculas efectoras del sistema inmunológico y confieren el isotipo del anticuerpo según el número de dominios Ig constantes en una molécula (Abbas, 2021). Los anticuerpos humanos, IgA, IgD e IgG tienen tres dominios Ig constantes en su cadena pesada (CH1, CH2 y CH3), y los IgE e IgM tienen cuatro dominios constantes (CH1 a CH4) y una cadena J adicional que permite la formación de dímeros y pentámeros, respectivamente (Gilliland, 2011).

La organización modular de los dominios Ig, tanto en las regiones variables como en las regiones constantes, permite la diversidad funcional y estructural de los anticuerpos, lo que es esencial para su capacidad para reconocer y neutralizar una variedad de antígenos.

## **2.2. Fragmentos Funcionales de los Anticuerpos**

Una molécula intacta de un anticuerpo humano puede categorizarse en tres componentes funcionales: dos fragmentos de unión al antígeno (Fab) y un fragmento cristalizante (Fc).

Los fragmentos Fab están compuestos por los dominios constantes y variables próximos al extremo amino-terminal de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo, y tales cadenas forman un sitio de unión al antígeno con una especificidad idéntica a su contraparte lateral (Chiu *et al.*, 2019).

Dentro del parátopo existen seis bucles variables (tres en cada cadena) responsables de la hipervariabilidad necesaria para que los anticuerpos reconozcan un número casi ilimitado de antígenos, denominado como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (Chiu *et al.*, 2019). Los seis bucles de CDR están muy próximos entre sí y no solo su secuencia cambia, sino también su orientación uno con otro, además de presentar residuos hidrofóbicos que ayuda con la unión de VL y VH creando también una hendidura plana para la unión del antígeno (Fernández-Quintero *et al.*, 2023).

Existen regiones constantes muy bien conservadas dentro del Fab, denominadas como regiones marco (FR) que interactúan con los bucles para apoyar al plegamiento adecuado del anticuerpo, proporcionando la estructura y estabilidad necesarias para mantener la conformación adecuada de las regiones variables y facilitar la unión del antígeno (Chiu *et al.*, 2019).

Por tanto, la hipervariabilidad de secuencias de aminoácidos, la orientación y aproximación de las regiones CDR, y las secuencias conservadas de FR, determinan la especificidad por su antígeno afín.

Los fragmentos Fab están conectados al fragmento Fc a través de una región bisagra que enlaza los dominios CH1 y CH2, manteniendo separados los dos Fabs y otorgándoles una flexibilidad y movilidad en relación con el Fc, permitiendo que su orientación cambie de forma independiente (Gilliland, 2011).

Los dominios CH2 y subsiguientes constituyen el Fc, y recibe su nombre por ser fácilmente cristalizado. Esta porción del anticuerpo no se une directamente al antígeno, pero es la desempeña un papel importante en las funciones efectoras y en las interacciones con otras células, como interacciones con fagocitos o células NK que permite la activación de respuestas efectoras, como la fagocitosis, la citotoxicidad dependiente de células y la activación del sistema del complemento (Chiu *et al.*, 2019; Gilliland, 2011).

### **2.3. Anticuerpos Terapéuticos**

Las inmunoglobulinas se destacan como moléculas únicas con una amplia variedad de especificidades de unión y funciones efectoras, propiedades que las hacen potencialmente útiles en diversos regímenes terapéuticos, confiriéndoles una gran relevancia en la medicina y la investigación.

La creación del primer anticuerpo monoclonal (mAb) mediante la tecnología de hibridomas por Köhler y Milstein en 1975 marcó el inicio de una revolución en la investigación biomédica con el surgimiento de nuevas terapias más precisas y herramientas de diagnóstico avanzadas. Los mAbs son una colección de Ig idénticos producidos por la progenie de un único clon de célula B, por lo tanto, todas las moléculas resultantes comparten la misma región V y se unen al mismo antígeno que originalmente desencadenó la respuesta en esa célula B (Abbas, 2021).

Desde entonces, los tratamientos con mAbs han avanzado gradualmente, convirtiéndose en la modalidad predominante para abordar diversas enfermedades, principalmente las autoinmunes, cancerígenas, cardiovasculares, inflamatorias e infecciosas (Brekke, 2003). El valor de los mAbs radica en su monoespecificidad y alta pureza, en comparación con los anticuerpos policlonales, ofreciendo así una terapia más precisa y menos invasiva en comparación con otros enfoques.

Desde principios de la década de 1980 hasta principios de la década de 2010, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) había aprobado menos de 35 mAb como tratamientos terapéuticos en humanos (Liu, 2014). En tan solo 10 años este número experimentó un notable incremento, alcanzando un total de 119 (Cai, 2021). A partir de 2015, la FDA ha aprobado más de 10 fármacos anuales, logrando un récord histórico en 2017 al aprobar 17, además, a pesar del impacto de la pandemia por COVID-19, en 2020 se aprobaron 13 mAbs terapéuticos (Cai, 2021).

Estos biofarmacéuticos constituyen hoy en día una parte fundamental del mercado terapéutico, siendo la base de la mayoría de los productos farmacéuticos más vendidos en los últimos años. El mercado mundial de mAbs tuvo un tamaño de 204,42 mil millones de dólares en 2022 y se proyecta que genere ingresos para un total de 572,62 mil millones de dólares en 2032 (EmergenResearch, 2023).

Este crecimiento destaca la importancia y expansión de los anticuerpos monoclonales en el panorama de la atención biomédica, impulsado por factores como la creciente adopción de la medicina personalizada y los continuos avances tecnológicos que han hecho su desarrollo más rápidos y eficientes.

#### **2.4. mAb de Origen Murino**

La técnica de hibridomas se basa en la fusión de células B, generalmente obtenidas de ratones inmunizados, con una línea celular de mieloma inmortal, dando origen a células conocidas como hibridomas, con la capacidad de generar anticuerpos de parte de la célula B, como la longevidad y productividad del mieloma (Liu, 2014). El cultivo inicial de hibridomas contiene una mezcla de anticuerpos policlonales, una mezcla heterogénea de distintos clones de linfocitos B que secretan un anticuerpo con una especificidad individual, por lo que se lleva

a cabo una selección cuidadosa de estos hibridomas para su producción a gran escala en cultivos *in vitro* (Posner *et al.*, 2019).

En 1986 se autorizó por la FDA el primer mAb terapéutico, Orthoclone OKT3 o Muromonab CD3, un anticuerpo de origen murino, es decir, obtenido a través del uso de una línea celular de hibridomas cultivados a partir de células de ratón. Este fármaco actúa uniéndose y bloqueando los efectos del receptor CD3 expresado en los linfocitos T con el propósito de prevenir el rechazo en trasplantes de riñón actuando como inmunosupresor (Liu, 2014). Al ser de origen murino, resultó tener una alta inmunogenicidad en el sistema inmunológico humano. OKT3 principalmente desencadenaba una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón, y en algunos pacientes, presentaba un riesgo al inducir el "síndrome de primera dosis", caracterizado por fiebre, náuseas, vómitos y dolor de cabeza; en casos más severos, se asociaba con efectos más graves como angustia cardiopulmonar, convulsiones, encefalopatía, meningitis, insuficiencia renal y trombosis del injerto (Posner *et al.*, 2019).

Aprendiendo de los primeros intentos con fármacos murinos, la búsqueda se centró en crear anticuerpos que se asemejan más a las inmunoglobulinas humanas. La introducción de anticuerpos quiméricos, con alrededor de un 70% de secuencias humanas, y posteriormente, anticuerpos humanizados que utilizan anticuerpos murinos con injertos de regiones CDR humanas, con aproximadamente 90% de secuencias humanas, representaron avances significativos contra la inmunogenicidad, pero aun provocan cierta reacción inmunogénica (Brekke, 2003; Lu *et al.*, 2020). Actualmente, los anticuerpos totalmente humanos, que suelen ser el formato preferido para aplicaciones terapéuticas, se han generado gracias a tecnologías como la presentación en fagos o el uso de ratones transgénicos, lo que abre nuevas posibilidades en el desarrollo de anticuerpos monoclonales terapéuticos (Chames *et al.*, 2009; Liu, 2014).

## 2.5. Limitaciones

Los anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos han supuesto un avance significativo como herramientas terapéuticas para abordar una variedad de enfermedades, sin embargo, su uso generalizado es restringido por diversas limitaciones.

Una de estas limitaciones es la inmunogenicidad que puede despertar en el organismo receptor. La inmunogenicidad se refiere a la capacidad de un agente, como un antígeno, vacuna, célula o fármaco, para desencadenar una respuesta inmune en el organismo, generalmente considerada como una respuesta fisiológica no deseada (Kiernan *et al.*, 2018). Los mAb, al ser reconocidos como agentes externos, pueden inducir una respuesta inmune, la cual se monitorea típicamente mediante la medición de la producción de anticuerpos anti-tratamiento fármaco (ADAs) (Piché *et al.*, 2015). El impacto de los ADAs puede variar desde no tener efecto hasta afectar la eficacia del fármaco, como en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, o neutralizar por completo su efecto; también puede afectar en la seguridad de su uso al eventualmente provocar reacciones adversas en los pacientes humanos (Mosch & Guchelaar, 2022).

Se cree que la producción de ADAs se ve afectada por varios factores como las características del fármaco en sí (como impurezas, agregaciones o secuencias no humanas), factores relacionados con el paciente (como enfermedades subyacentes y la predisposición genética) y el método y la frecuencia de administración del fármaco (Mosch & Guchelaar, 2022). A pesar de la investigación constante, las razones exactas de los orígenes de la inmunogenicidad siguen siendo desconocidas. Algunos investigadores han atribuido las reacciones inmunogénicas principalmente al origen murino de los mAb y secuencias no humanas en las inmunoglobulinas.

Es por eso que los enfoques de la creación de nuevos mAb terapéuticos se basaron principalmente en la creación de moléculas con estructuras similares a las humanas, con el fin de reducir la inmunogenicidad y mejorar la seguridad y eficacia del tratamiento, sin comprometer sus propiedades de unión (Brekke, 2003; Lu *et al.*, 2020).

Además de la inmunogenicidad, los elevados costos de producción destacan como un obstáculo fundamental, ya que requieren procesos complejos como configuraciones genéticas, inmunización de organismos vivos, selección de clonas de células B, cultivos celulares a gran escala y pasos de purificación extensos, lo que limita su accesibilidad para un amplio rango de pacientes (Chames *et al.*, 2009).

Por otro lado, los mAb muestran una circulación prolongada en la sangre gracias a su gran tamaño (una IgG pesa ~150 kDa) y a las interacciones con los receptores Fc, lo que impide que se eliminen rápidamente al supera el límite para el umbral de aclaramiento renal (~70 kDa), propiedad que puede ser contraproducente si se trata de evitar una reacción inmunogénica. Su tamaño también representa una barrera para la penetración en los tejidos y matriz extracelular, especialmente en el contexto de tumores que presentan una vasculatura heterogénea y retorcida, así como una alta viscosidad, limitando la farmacocinética y eficacia como tratamiento para tumores sólidos, afectando su utilidad clínica (Chames *et al.*, 2009).

## **2.6. Nuevas Configuraciones de Anticuerpos**

Con avances en la ingeniería genética, han surgido numerosas estrategias para mejorar la especificidad de los anticuerpos y superar ciertas limitaciones, extendiéndose más allá de una mera optimización; fabricando nuevos compuestos derivados de los dominios de un Ig, ausentes en entornos naturales y personalizados para cumplir adaptaciones deseadas.

A través de la aplicación de técnicas de biología molecular, es posible producir fragmentos de anticuerpos que consisten únicamente de la región Fab. Estos fragmentos, al carecer de la región Fc, presentan una monovalencia similar a la de los mAbs convencionales, pero con un tamaño reducido de ~50 kDa, lo que mejora la farmacocinética, facilitando su penetración a tejidos y eliminación rápida a través de la filtración renal (Chames *et al.*, 2009). Existen dos tipos: F(ab'), que es un fragmento individual, y el F(ab')<sub>2</sub>, que consta de dos fragmentos unidos por la región bisagra, pero ambos carecen de la región Fc (Flaherty, 2012).

También es posible crear un anticuerpo biespecífico (bsAb) combinando una cadena pesada y ligera de un mAb individual con la de otro. Estos bsAbs tienen dos sets de CDRs (en teoría 12 bucles diferentes), lo que les permite unirse a dos epítomos distintos del mismo antígeno o incluso a dos antígenos diferentes (Byrne *et al.*, 2013). En comparación con los mAbs monoespecíficos, los bsAbs ofrecen varias ventajas, siendo la más destacada su capacidad para redirigir simultáneamente a las células efectoras del sistema inmunológico y estimularlas mediante la interacción con un receptor activador. Esto conduce a una lisis eficiente de las células tumorales (Chames *et al.*, 2009).

Los fragmentos variables de cadena única (scFv) están conformados por los dominios variables de una de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, unidos mediante una secuencia conectora llamada *linker*. Este *linker* conecta los extremos amino y carboxilo terminales de las cadenas a una distancia óptima para favorecer el plegamiento y formación del sitio de unión al antígeno, al mismo tiempo minimizando la oligomerización. Por lo general, estos fragmentos se producen en la cubierta proteica de bacteriófagos utilizando la metodología de presentación o despliegue en fagos (Monnier *et al.*, 2013).

Con un peso de ~25 kDa, los scFv exhiben una excelente farmacocinética (una mejor penetración en los tejidos y una rápida eliminación de la sangre), lo que puede ser beneficioso

en aplicaciones de radioterapia y diagnóstico (Monnier *et al.*, 2013), además de ser más fáciles y económicos de producir en comparación con los anticuerpos convencionales, ya que por su menor tamaño pueden expresarse en bacterias como *Escherichia coli*, evitando requerir sistemas de expresión de mamíferos (Flaherty, 2012). Sin embargo, tienden a tener afinidades más bajas, menor estabilidad a largo plazo y una mayor probabilidad de aglomerarse debido a su tamaño reducido (Bates & Power, 2019).

## **2.7. Anticuerpos de Cadena Pesada**

Las especies que conforman la familia de los *Camelidae* (camellos, dromedarios, llamas y alpacas) y ciertas especies de la familia *Chondrichthyes* (peces cartilagosos), como los tiburones, poseen anticuerpos no convencionales conocidos como anticuerpos de cadena pesada (hcAbs) los cuales están compuestos únicamente por dos cadenas pesadas, careciendo de cadenas ligeras (Muyldermans, 2013). Esta cadena pesada contiene tanto la región C como la V, y el parátipo está formado exclusivamente por un único dominio denominado como VHH en camélidos y VNAR en tiburones, que equivale al fragmento Fab del anticuerpo convencional (Bannas *et al.*, 2017).

### *2.7.1. hcAbs de camélido / VHH o nanocuerpo.*

La molécula completa de los hcAbs de camélidos tiene un peso molecular de ~75 kDa. Hay una ausencia del dominio CH1 debido a una deleción genética, lo que resulta en una estructura homodimérica compuesta por tres dominios: VHH, su región variable y análoga a VH, unida mediante una región bisagra con los dominios constantes CH2 y CH3 (Juma *et al.*, 2021). Hay dos isotipos de esta molécula cuya diferencia está en la longitud de la región bisagra entre VHH y CH2, siendo una más alargada que la otra (Pothin *et al.*, 2020).

Los parátomos, VHH, también conocidos como nanocuerpos, son fragmentos de anticuerpos de dominio único (sdAb) que tienen un peso molecular de ~15 kDa, diez veces menor a un anticuerpo convencional completo (~150 kDa), y son capaces de reconocer a antígenos por sí solos (Muyldermans, 2013; Pothin *et al.*, 2020).

Su estructura es similar a VH, pero difiere en varios aspectos claves. Los VH convencionales muestran una región que funciona como sitio de anclaje para VL compuesta de varios residuos de aminoácidos hidrofóbicos muy bien conservados, en cambio los VHH, al estar expuestos a solventes polares, muestra una sustitución a residuos hidrofílicos (Muyldermans, 2016). Ya que el dominio variable está formado por solo una cadena, VHH presenta tres CDR en lugar de seis; y el CDR3 contiene un bucle adicional resultando en un residuo con mayor longitud de aminoácidos que también lo hace más diverso tanto en secuencia como en estructura, y forma un parátomo único de forma convexa (Kinoshita *et al.*, 2022).

### 2.7.2. IgNAR / VNAR.

Los IgNAR se han identificado en varias especies de diferentes tiburones, incluidos los tiburones nodriza (*Ginglymostoma cirratum*), los tiburones wobbegong (*Orectolobus maculatus*), la mielga lisa (*Mustelus canis*), los tiburones sabuesos anillados (*Triakiss cyllium*) y los tiburones cornudos (*Heterodontus francisci*) (Cheong *et al.*, 2020).

La estructura de los IgNAR es de un homodímero con un peso molecular de ~95 kDa y comprende cinco dominios constantes (CH1-CH5), que se presentan con una gran flexibilidad gracias a la presencia de enlaces disulfuro y variaciones de longitudes entre dominios y especies, y su dominio variable N-terminal está conectado con el dominio constante por la unión de un enlace disulfuro en vez de una región bisagra (Juma *et al.*, 2021; Khalid *et al.*, 2021).

El dominio variable VNAR, es también un sdAb, que posee un peso molecular de ~12 kDa convirtiéndolo así en el fragmento de anticuerpo más pequeño naturalmente encontrado en el reino animal hasta la fecha (Zielonka *et al.*, 2015). Está compuesto por cuatro bucles hipervariables: CDR1 y CDR3, mientras que hay una delección de CDR2 por mutaciones somáticas siendo reemplazada por dos hebras hipervariables cortas denominadas HV2 y HV4, similares a las que se encuentran en los receptores de las células T (TCR), que contribuyen con la unión al antígeno (Juma *et al.*, 2021; Khalid *et al.*, 2021; Zielonka *et al.*, 2015). Similar al VHH, para compensar el tamaño reducido, el CDR3 presenta una extensión de aminoácidos en CRR3 y residuos hidrofílicos por su exposición a solventes polares (Fernández-Quintero *et al.*, 2022).

La molécula de VNAR es categorizada en cuatro distintos subtipos de acuerdo con el número y posición de los residuos de cisteínas no-canónicas y patrón de enlaces disulfuro dentro de su FR (VNAR tipo I - VNAR tipo IV) (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019; Streltsov *et al.*, 2005). Todos los tipos de VNAR contienen un residuo de cisteína canónico que estabiliza la molécula vía un enlace disulfuro, presente en toda inmunoglobulina clásica (Zielonka *et al.*, 2015).

El VNAR tipo I solo se ha encontrado hasta la fecha en tiburones nodriza y wobbegong, y presenta dos residuos de cisteínas no-canónicos que se unen y forman un bucle adicional en los residuos canónicos de CDR3 (Khalid *et al.*, 2021). El VNAR tipo II contiene un solo residuo no-canónico de cisteína que forma un enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3; este tipo de VNARs resultan con bucles más próximos entre sí y con un CDR3 que se asemeja a la forma de un dedo, que ayuda a unirse eficientemente a sitios de uniones encriptados o difíciles de extender (Juma *et al.*, 2021; Zielonka *et al.*, 2015).

El VNAR Tipo III, al igual que tipo II, tiene solo un residuo no-canónico de cisteína, y comparte una arquitectura estructural similar, salvo que este isotipo también contiene un residuo no variable de triptófano en CDR1, no presente en los otros isotipos de VNAR; como consecuencia, estos anticuerpos presentan un número fijo de aminoácidos limitando su diversidad (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019; Khalid *et al.*, 2021). Este tipo de anticuerpo es predominante en el desarrollo neonatal de tiburones, por lo que se ha hipotetizado que sirve como la primera línea de defensa contra patógenos en las etapas tempranas de desarrollo (menores de un año) (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019; Juma *et al.*, 2021; Zielonka *et al.*, 2015).

El VNAR Tipo IV se diferencia de todos los demás tipos al no tener residuos no-canónicos, proporcionando una mayor flexibilidad en el sitio de unión al antígeno (Juma *et al.*, 2021). Alrededor del 5% de los VNARs conocidos, no se pueden categorizar en ninguno de estos tipos, al presentar distintos residuos de cisteínas en ubicaciones y cantidades diferentes (Juma *et al.*, 2021; Khalid *et al.*, 2021).

## **2.8. Ventajas de los sdAbs**

Al tener cambios estructurales similares en sus regiones variables, ambos tipos de sdAbs resultan con características bioquímicas compartidas únicas y deseables, lo que los convierte en candidatos prometedores para su aplicación biomédica.

Los sdAbs exhiben una notable solubilidad y estabilidad térmica, y resistencia a pH gástricos, atributos que se derivan de su riguroso entorno fisiológico natural; además, su tamaño reducido (~12-15 kDa) mejora la farmacodinámica al facilitar la absorción, distribución y penetración en los tejidos, así como la rápida eliminación del tejido y la sangre a través del aclaramiento renal (Arbabi-Ghahroudi, 2022; Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019; Juma *et al.*, 2021; Khalid *et al.*, 2021; Zielonka *et al.*, 2015). Los CDRs extendidos amplían su diversidad, permitiendo una mayor especificidad hacia los antígenos y una afinidad más robusta, lo que

resulta en un enlace más estable; además poseen la capacidad de unirse a antígenos de menor tamaño, haptenos y sitios activos enzimáticos difíciles de alcanzar para un anticuerpo convencional (Jiang *et al.*, 2023; Khalid *et al.*, 2021).

Su tamaño compacto facilita su producción a gran escala tanto en términos de esfuerzo como de costos. Estos anticuerpos pueden expresarse fácilmente en células de mamíferos, levaduras y *E. coli*, con niveles de expresión mucho más altos que sus contrapartes convencionales, como los fragmentos Fab o los scFV (Wesolowski *et al.*, 2009).

## **2.9. Anticuerpos VNAR**

En los últimos años, ha habido un aumento significativo en la investigación y publicaciones relacionadas con los sdAbs, especialmente los nanocuerpos derivados de camélidos. A pesar del estudio exhaustivo de los IgNAR de tiburón, aún no se ha aprovechado a fondo el potencial de sus dominios VNAR como un método terapéutico. Esto se debe en parte a la facilidad con la que se pueden obtener y manipular IgNAR, ya que provienen de animales que habitan en faunas accesibles en países desarrollados cerca de Suramérica y Asia central (Matamoros & Gonzales, 2021)

De igual forma, la aplicación de ambos fragmentos se ha explorado en una variedad de campos, incluyendo tratamiento de enfermedades virales, cáncer, trastornos autoinmunes, así como su uso en la detección y diagnóstico de diversas patologías (Jiang *et al.*, 2023; Ortega-Monge *et al.*, 2022).

Se han aislado VNARs con el propósito de identificar y neutralizar una variedad de antígenos, que incluyen la proteína spike de diferentes variantes del virus SARS-CoV-2 (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2023; Gauhar *et al.*, 2021); el factor de necrosis tumoral, una molécula implicada en enfermedades autoinmunes graves, inflamación, estallido respiratorio,

lesiones tisulares y coagulaciones diseminadas (Bojalil *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2022); la quinasa Aurora A, que desempeña un papel crucial en la división celular y está sobreexpresada en diversos cánceres como el de mama y colon (Burgess *et al.*, 2016); y el antígeno de superficie de la hepatitis B (Jiang *et al.*, 2023). Estos ejemplos ilustran la versatilidad y el potencial terapéutico de los dominios VNARs en diversas áreas de investigación biomédica.

Existe escasa información sobre la inmunogenicidad inducida por los VNARs *in vivo*, pero varios estudios sugieren que su reacción es menor o similar a la observada con el uso de scFvs o nanocuerpos. Debido a que provienen de secuencias no humanas, se ha sugerido la configuración de estos sdAbs (incluyendo nanocuerpos) mediante sustituciones de residuos de aminoácidos en los FR para imitar a la de humanos o injertos de CDRs humanos, aunque esto puede tener como consecuencia agregaciones o una disminución en su estabilidad (Muyldermans, 2013; Rossotti *et al.*, 2022).

La literatura apoya que cambiar la estructura natural de los sdAbs es contraproducente, ya que la misma molécula no es tan inmunogénica, basándose en diversos ensayos pre-clínicos que muestran una producción nula o poca respecto a ADAs (Ackaert *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2023; Juma *et al.*, 2021; Rossotti *et al.*, 2022).

## **2.10. Estrategias de generación de bibliotecas de anticuerpos VNAR**

Para la búsqueda de nuevos VNARs y otros fragmentos de anticuerpos, se emplean diversas estrategias utilizando la metodología de presentación de fagos, para crear y seleccionar bibliotecas de anticuerpos, las cuales son colecciones de clonas con distintas variaciones entre ellas.

La presentación en fagos es un proceso que implica la manipulación del ADN de un bacteriófago para expresar una proteína recombinante en su cubierta proteínica; en el caso de

anticuerpos, las regiones variables (Brekke, 2003; Liu, 2014). La construcción de una biblioteca es representada como un repertorio de millones de clones de diferentes fagos, cada uno con la región V en su cubierta proteínica específica para prácticamente cualquier antígeno o epítipo. Se lleva a cabo un proceso de selección utilizando la técnica de *panning*, permitiendo la secuenciación y posterior clonación de una clona específica (Sino Biological, s.f.).

Todo el proceso se realiza *in vitro*, los anticuerpos se pueden obtener mucho más rápido que con la técnica tradicional de hibridoma y la biblioteca se puede utilizar para generar anticuerpos contra antígenos tóxicos cuando no es posible inmunizar a un animal porque el procedimiento puede ser letal (Liu, 2014). Estas bibliotecas ofrecen una valiosa herramienta para explorar la diversidad de secuencias de anticuerpos y seleccionar aquellas con propiedades deseables para su aplicación (Lai & Tim, 2020). Se pueden distinguir cuatro tipos principales de bibliotecas según el origen de las secuencias utilizadas: inmunes, no inmunes (naive), semisintéticas y sintéticas.

Las bibliotecas inmunes y las no inmunes pueden agruparse como bibliotecas naturales, ya que sus secuencias se originan a partir de muestras obtenidas de un organismo vivo (tiburones en el caso de VNAR). En la estrategia de bibliotecas inmunes, los VNAR derivan de animales que han sido inmunizados contra un antígeno de interés y han generado un repertorio de anticuerpos específicos contra tal antígeno (Jiang *et al.*, 2023). Por otro lado, las bibliotecas no inmunes se basan en el repertorio primario actual del organismo vivo y evitan el paso de inmunización, que puede llegar a tardar hasta meses, resultando en un proceso más acelerado, pero sin garantía de encontrar un anticuerpo ideal (Ponsel *et al.*, 2011). El material genético es extraído de linfocitos de sangre o bazo del organismo para ser amplificados mediante la PCR y son clonados en vectores de clonación para así crear una biblioteca diversa de genes VNAR.

Las bibliotecas sintéticas se crean completamente *in vitro* construidas a partir de ADN sintético para obtener moléculas con estructuras altamente optimizadas y diversas, permitiendo un control total de los anticuerpos producidos, aunque requiere un conocimiento profundo de la estructura y función de los anticuerpos (Burkovitz & Ofran, 2016). Las bibliotecas semisintéticas son construidas a partir de la introducción de secuencias al azar a un anticuerpo obtenido de un organismo vivo, usando técnicas de mutagénesis dirigidas o diversificación aleatorio se introducen cambios para ampliar la diversidad, principalmente en las regiones de CDR3 que presentan la mayor variabilidad por su número de aminoácidos extendido.

Las bibliotecas sintéticas ofrecen ventajas significativas sobre las naturales al evitar el uso y manejo de animales vivos, y utilizan una metodología relativamente sencilla y rápida para generar anticuerpos recombinantes con alta especificidad hacia prácticamente cualquier antígeno (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019); sin embargo, se ha observado que las bibliotecas naturales tienden a tener un mayor repertorio total de anticuerpos con mejor afinidad y especificidad en comparación con las bibliotecas sintéticas (Jiang *et al.*, 2023).

### **2.11. Sistemas de expresión para VNAR**

La expresión recombinante de anticuerpos puede realizarse en diversos sistemas celulares. Para producir los VNAR, se usa comúnmente el uso de un sistema en procariotas, como *E. coli*. Esta inclinación se debe a que *E. coli* es un huésped receptivo para replicar los anticuerpos por un corto período de tiempo, lo que facilita su producción a gran escala de manera eficiente y económica (Flaherty, 2012; Wesolowski *et al.*, 2009). Aunque los VNAR también pueden expresarse en células eucariotas, cada sistema de expresión tiene sus propias ventajas y se elige según las necesidades específicas de la aplicación.

Por ejemplo, las células eucariotas tienen organelos como el núcleo, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, que permiten modificaciones postraduccionales complejas

como glicosilaciones, plegamientos correctos y formación de puentes disulfuro, que se reservan para la expresión de moléculas más complejas como anticuerpos convencionales de tamaño completo o VNARs fusionados con un Fc (de Marco, 2020).

El método convencional para producir sdAbs recombinantes implica su secreción en el periplasma de *E. coli*, con una etiqueta de histidinas (6xHis), seguida de la purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) (Salema & Fernández, 2013).

Las condiciones oxidantes de este compartimento subcelular favorecen la formación de enlaces disulfuro que estabilizan la estructura del fragmento variable y el periplasma actúa como barrera contra la actividad de las proteasas presentes en el citoplasma bacteriano. También, mediante una etapa de choque osmótico se puede recuperar el sobrenadante por secreción directa evitando la necesidad de realizar lisis a la bacteria, facilitando su purificación (de Marco, 2020).

La cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) es una técnica ampliamente utilizada en biotecnología para la separación y purificación de proteínas. Funciona mediante la interacción específica entre una fase estacionaria de un quelante metálico y un péptido de unión al metal fusionado a una proteína de interés (Falke & Corbin, 2013).

Esta técnica se basa en la afinidad entre los iones ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  o  $Ni^{2+}$ ) presentes en una columna de resina cargada y las etiquetas de histidina presentes en las proteínas, pero el níquel es especialmente selectivo en esta interacción, lo que lo convierte en el ion más utilizado en IMAC (Regnier & Cho, 2013). El proceso típico de IMAC implica varias etapas: la aplicación de la muestra a la columna, donde teóricamente solo se unen las proteínas con etiquetas de histidina; un lavado con una baja concentración de imidazol para eliminar proteínas no específicas; y una elución con una alta concentración de imidazol para recuperar la proteína de interés (CYTIVA,

s.f.; Falke & Corbin, 2013; Regnier & Cho, 2013). El imidazol actúa como agente eluyente al competir con las histidinas y facilitar la liberación de la proteína durante la etapa de lavado y elución.

## **2.12. Anticuerpo VNAR CV0-43**

En el Departamento de Innovación Biomédica del CICESE se generó una biblioteca sintética utilizando como marco un anticuerpo VNAR que no contenía cisteínas en su CDR3, denominado como T1, proveniente de un tiburón cornudo. La biblioteca, nombrada como VS0 (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019), se utilizó en un proceso de selección contra el antígeno carcinoembrionario (CEA). A partir de esta selección se aisló el anticuerpo CV0-43 el cual mostró capacidad de reconocer a CEA tanto en forma soluble como expresado en la superficie de células de cáncer de colon, además mostró niveles de expresión elevados en comparación con las otras clonas (Cabanillas-Bernal, 2019; Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019; Manzanares-Guevara *et al.*, 2024).

El antígeno CEA es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de muchas células tumorales, siendo especialmente abundante en cánceres de colon, páncreas, pulmón, mama y ovario; y es utilizado como biomarcador, en el contexto de los anticuerpos, para la detección y cuantificación de proteínas recombinantes en pruebas de inmunoensayos (Shinmi *et al.*, 2017). Debido a su asociación con varios tipos de cáncer y su capacidad para ser detectado mediante ensayos inmunológicos, los anticuerpos dirigidos contra el CEA, como el CV0-43, muestran un gran potencial como herramienta valiosa en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon, por lo que es importante la estandarización de protocolos de purificación de este anticuerpo, que ofrezcan una muestra con un alto grado de pureza para su evaluación en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

### **3. HIPÓTESIS.**

La estandarización de las condiciones de purificación de CV0-43 mediante cromatografía por afinidad a metales permitirá obtener al dominio VNAR con alto nivel de pureza sin afectar su actividad, para su posterior uso en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.

### **4. OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar un método estandarizado para la purificación eficiente de un VNAR recombinante neutralizante del antígeno carcinoembrionario, que pueda ser utilizado en futuros ensayos *in vitro* e *in vivo*.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Obtener células de *E. coli* transformadas con un plásmido que contenga la secuencia del VNAR CV0-43.
- Realizar la expresión y extracción eficaz de los anticuerpos recombinantes CV0-43.
- Determinar las condiciones de elución del VNAR en distintas concentraciones de buffer de elución siguiendo un gradiente lineal.
- Establecer las condiciones ideales de lavado y elución dentro de la purificación para obtener un VNAR altamente puro.

### **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **6.1. Cepa bacteriana BL21(DE3) y vector pComb3x**

*E. coli* BL21(DE3) es una cepa bacteriana ampliamente reconocida y utilizada en la expresión de proteínas recombinantes. Esta cepa ha sido genéticamente modificada para

incorporar el gen de la polimerasa T7 ARN, el cual es provisto por un profago  $\lambda$ , lo que permite la expresión de genes heterólogos bajo la inducción con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (Jeong, 2015). Esta cepa es destacada por sus altos niveles de expresión y rendimiento de proteínas recombinantes, especialmente aquellas que poseen etiquetas de unión a Ni-NTA, como la secuencia de polihistidina (6xHis) (Robichon *et al.*, 2011).

pComb3x es un vector de clonación diseñado principalmente para la clonación direccional de Fabs completos, scFvs, péptidos y otras proteínas destinadas a ser presentadas en fagos. Con una longitud de 3300 pares de bases (bp), este vector cuenta con un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), un promotor LacZ y etiquetas de histidinas (6xHis), así como una etiqueta de hemaglutinina de la influenza HA y una secuencia líder pelB (Barbas *et al.*, 2001).

El gen AmpR actúa como un marcador de selección en las células transformadas con este vector, proporcionando una ventaja selectiva tras la exposición al antibiótico ampicilina o derivados, como la carbenicilina. El promotor LacZ regula la expresión de los genes heterólogos, siendo inducido por la presencia de lactosa o análogos, como el IPTG. Las etiquetas de histidinas ofrecen un método eficiente para la purificación de la proteína recombinante utilizando una columna de afinidad con Ni-NTA, debido a la alta afinidad de las histidinas por los iones de níquel. Además, la etiqueta HA permite una detección rápida y específica de la proteína de interés mediante técnicas de inmunodetección. Ambas etiquetas se fusionan a la proteína recombinante durante su expresión. Por último, la secuencia PelB dirige la proteína recombinante fusionada al periplasma bacteriano, lo que facilita su correcto plegamiento y posterior extracción, como por choque osmótico.

## **6.2. Transformación células bacterianas con pComb3X**

Se llevó a cabo la transformación por quimiocompetencia del plásmido pComb3X que contenía clonada la secuencia del VNAR CV0-43, en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). Se agregó 1  $\mu\text{L}$  del plásmido en 50  $\mu\text{L}$  de células y se incubó por 30 minutos en hielo, seguido de 1 minuto a 42° C, al finalizar este minuto, las células se incubaron rápidamente en hielo.

Se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de medio SB (Super Broth) al tubo que contenía las células y se incubó por 1 hora a 37° C, los primeros 30 minutos sin agitación y los siguientes 30 min a 250 rpm. Se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de cultivo en placas petri con medio de LB (Luria Bertani) + carbenicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó a 37° C por 48 horas. Se seleccionaron y resembraron 6 colonias al azar para su posterior evaluación por PCR de colonia. Después de 24 h de incubación a 37 °C, las placas fueron almacenadas a 4° C.

## **6.3. Evaluación de clonas por PCR de colonia**

Se evaluaron por PCR las colonias aisladas para confirmar la correcta transformación con el plásmido de interés. El volumen final de la reacción fue de 20  $\mu\text{L}$  usando  $\text{MgCl}_2$  (3 mM), dNTPs (0.2 nM), 0.5 U de TaqPol, Buffer green 5x, primers (0.4  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de agua de la colonia (colonia resuspendida en 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril). Los primers utilizados fueron Ompseq (F' 5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G-3') y Gback (R' 5'-GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC-3'). El volumen restante se aforó con agua libre de nucleasas.

Las condiciones y ciclos de amplificación se realizaron de la siguiente manera: un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C por 2 minutos, 30 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos, y finalmente un ciclo de extensión a 72° C por 5 minutos.

Los productos amplificados se evaluaron en gel de al 2% teñido con bromuro de etidio, cargando 10  $\mu$ L de reacción por muestra y 3  $\mu$ L de marcador molecular 100 pb ladder DNA marker (100 bp-300pb). Las condiciones de la electroforesis fueron de 100 voltios constantes por 45 minutos.

#### **6.4. Resiembra de cultivos aislados y criopreservación de las clonas**

Una vez confirmada la correcta transformación de las células quimiocompetentes, se tomaron las colonias aisladas y se resembraron en una nueva placa con medio LB + carbenicilina (100  $\mu$ g/mL). Las placas se incubaron a 37° C por 48 horas para finalmente ser almacenadas a 4° C. Cada dos meses, se resembraron las células en nuevas placas siguiendo la misma metodología.

Las clonas de interés se criopreservaron, para ello se preparó un preinóculo de ~10 mL de medio SB + carbenicilina (100  $\mu$ g/mL) con una colonia transformada y se incubó a 37° C, 250 rpm, por 16 a 18 horas. Se mezclaron 1.5 mL del cultivo líquido con 1 mL de glicerol estéril al 20% como crioprotector, se dividió en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -80° C.

#### **6.5. Expresión de VNAR recombinante**

Se colocó un preinóculo de ~10 mL de medio SB + carbenicilina (100  $\mu$ g/mL) con una colonia transformada de *E. coli* con pComb3X-CV0-43 y se incubó a 37° C, 250 rpm, por 16 a 18 horas. El preinóculo se utilizó para inocular 500 mL de medio SB + carbenicilina (100  $\mu$ g/mL), y se incubó a 37° C, 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.6 - 0.8. Se indujo la expresión de la proteína recombinante agregando 1 mM de IPTG e incubando a 37° C, 250 rpm por 6 horas. El cultivo se pasó a tubos de 50 mL (previamente pesados) y se centrifugó a 4500 rpm por 15 min, a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante dejando solo el botón celular para almacenarse a 4° C para su uso al día siguiente o a -20° C hasta su uso posterior.

## **6.6. Extracción periplásmica de VNAR por choque osmótico**

Se extrajo la proteína del periplasma, siguiendo una metodología modificada descrita en el manual *QIAexpressionist* (QIAGEN, 2003). Se trabajó todo el tiempo en hielo. Se resuspendió el botón celular en solución TSE (Tris-HCl 30 mM / Sacarosa 20%, pH 8.0) fría usando una relación de 30 mL de buffer por 1 gramo de botón celular. Se agregó 500 mM de EDTA para una concentración final de 1 mM y se incubó en un baño de hielo en agitación gentil (40 rpm de movimiento oscilatorio) por 10 minutos. Se centrifugó a 8000  $g$  a 4°C, por 20 min.

El sobrenadante fue separado y almacenado a -20° C, y el botón celular fue nuevamente resuspendido, en el mismo volumen que la solución TSE, con MgSO<sub>4</sub> 5 mM frío. Se incubó en un baño de hielo en agitación gentil por 20 minutos y se centrifugó a 8000  $g$  a 4°C, por 20 min. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20° C.

## **6.7. ELISA para evaluar la expresión de VNAR**

En una microplaca de ELISA de alta unión con fondo redondo, se colocaron por triplicado 50  $\mu$ L de los sobrenadantes del extracto periplásmico (TSE y MgSO<sub>4</sub>), BSA 1% / PBS 1X (como control negativo) y PBS 1X (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, pH 7.4) como blanco. Se incubó la placa toda la noche a 4° C. Se eliminó la solución por inversión y se bloquearon los pozos con 150  $\mu$ L de solución de bloqueo (BSA 3% / PBS 1X) incubando la placa 1 hora a 37° C. Se eliminó la solución y a cada pozo se agregaron 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-HA-HRP (BSA 1% / PBS 1X) en una relación 1:3000, incubando por 1 hora a 37° C. Se eliminó la solución y se realizaron cinco lavados con 200  $\mu$ L de solución de lavado (PBS 1X / Tween 0.5 %). Se agregó a los pozos 50  $\mu$ L de solución de revelado (1-Step™ TMB-Blotting Substrate Solution, ThermoFisher) y se incubó la placa por

30 minutos a 37° C. Finalmente se agregaron a los pozos 50 µL de solución stop (HCl 10%) y se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas.

## **6.8. Purificación de VNAR por cromatografía de afinidad a metales (IMAC)**

El sobrenadante periplásmico se sometió a una purificación por cromatografía de afinidad en un sistema de cromatografía líquida AKTA-FPLC (GE Healthcare), usando una columna de resinas de Ni Sefarosa 6 HisTrap™ FF, 5 mL afín a la secuencia de histidinas presente en los fragmentos VNAR recombinantes.

Los reactivos usados fueron Buffer A / NPI-0 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.08 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.92 mM, NaCl 500 mM), Buffer B / NPI-500 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.08 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.92 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM), agua destilada estéril y etanol al 20%; todas las soluciones fueron filtradas utilizando un filtro de 0.22 µm y ultrasonificadas en un baño mecánico por 10 minutos en Branson Bransonic® M Mechanical Bath 1800.

Los sobrenadantes periplásmicos fueron juntados y clarificados centrifugando a 13000 rpm durante 30 minutos para eliminar los restos celulares. Posteriormente se sonicó en las mismas condiciones descritas para los buffers y reactivos de purificación. Se agregó al extracto periplásmico con 8% Buffer B, 10% glicerol y 2% tritón X-100, para evitar las interacciones hidrofóbicas no específicas siguiendo las recomendaciones descritas en el manual de la columna HisTrap™ FF (catalog #11-0008-88 AF, GE Healthcare).

### *6.8.1. Gradiente.*

El equipo FPLC fue equilibrado con 5 volúmenes de columna (VC) o 25 mL de 8% Buffer B. Se cargó de 200 mL a 500 mL del sobrenadante utilizando una bomba peristáltica a un flujo de no más de 2.5 mL/min y la muestra se recuperó con un gradiente lineal de 10 a 100% de Buffer B en 5 VC por fracción.

### 6.8.2. *Corrida.*

El equipo FPLC fue equilibrado con 5 volúmenes de columna (VC) de 8% Buffer B. Se cargó de 200 mL a 500 mL del sobrenadante utilizando una bomba peristáltica a un flujo de no más de 2.5 mL/min. Se realizó un lavado de 5 a 7 VC (25 a 35 mL) de 25% Buffer B y se recuperó el anticuerpo con una elución de 5 VC 100% Buffer B.

Se seleccionaron y tomaron alícuotas de 1.5 mL de ciertas fracciones de interés para evaluar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot.

### **6.9. Precipitación y desnaturalización de VNAR puro**

A 1.5 mL de muestra, se agregó 25% de ácido tricloroacético (TCA), se mezcló por inversión e incubó toda la noche a 4° C. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm a 4° C por 25 min y se descartó el sobrenadante. Se hicieron dos lavados con 1 mL de acetona fría (-20° C), centrifugado a 13000 rpm a 4° C y descartando el sobrenadante. El botón celular se secó al aire, colocando las muestras boca abajo durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la evaporación de la acetona restante.

Las muestras se resuspendieron en 1.5 mL Buffer de Carga Laemmli (Tris-HCl 250 mM / SDS 5%, Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0.1%) con 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se agregó ~1  $\mu$ L de NaOH 0.4 N solo si el color de la muestra tornaba amarillo verdoso con la finalidad de que resultara en un tono azul con la finalidad de cambiar subir el pH si la muestra se encontraba ácida. Las muestras fueron homogeneizadas y llevadas a un thermoblock a 95° C durante 10 minutos e inmediatamente fueron colocadas en hielo.

## 6.10. Inmunodetección de las proteínas recombinantes

Los geles de poliacrilamidas se prepararon descrito por Schägger y von Jagow (1987) en una composición de dos partes: un gel separador con una concentración al 12% y otro gel concentrado con una concentración al 4%.

Se realizó la electroforesis a 150 volts constantes, 150 mAmp por ~1 hora si se trabajaba con 2 geles o ~1:45 horas si se trabajaba con 4 geles a la vez; se cargaron 20 µL de muestra por duplicado en dos geles y 3 µL de marcador molecular. Se utilizó el marcador molecular Broad Range Protein Molecular Weight Marker, PROMEGA (de 10 – 225 kDa) para el gel que sería teñido con azul de coomassie y el marcador molecular Pageruler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFisher (de 10 – 225 kDa) para el gel que sería transferido a la membrana para el Western Blot.

### 6.10.1 Tinción Coomassie.

Al finalizar la electroforesis, se realizó la tinción de un gel con azul de coomassie R250 para ver la pureza de las muestras. El gel se lavó con agua destilada y se cubrió con Solución de Desteñido (Metanol 45%, Ácido Acético 15%, H<sub>2</sub>O 40%) por 30 minutos en agitación gentil a temperatura ambiente. Se eliminó la solución y se cubrió en Solución de Tinción Coomassie (Coomassie R250 0.01 % / Metanol 50%, Ácido Acético 10%, H<sub>2</sub>O 40%), se incubó toda la noche en agitación gentil a temperatura ambiente. Se eliminó la solución y se agregó nuevamente la solución de desteñido por 1 hora o hasta que el fondo azul se eliminará. El gel fue fotodocumentado para su evaluación y fue almacenado en agua destilada a temperatura ambiente.

### 6.10.2 Western Blot.

El otro gel duplicado se usó para detectar específicamente el VNAR purificado mediante un Western Blot. Para la transferencia se usó una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno con poros de un tamaño de 0.45  $\mu\text{m}$  por UltraCruz®. La membrana fue activada sumergiéndola en metanol por 10 segundos, después en agua destilada por 5 minutos y finalizando con Buffer Towbin (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM / Metanol 20%, pH 8.3) por lo menos 10 minutos.

Se realizó una transferencia semi-seca usando una cámara de transferencia (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell por BIORAD). Las condiciones de la transferencia fueron de 200 mAmp constantes y un límite de 20 voltios por 1 hora.

La membrana fue lavada con agua destilada y se incubó durante 1 hora o toda la noche en agitación gentil a temperatura ambiente, con 10 mL de solución de bloqueo (PBS 1X / Tween 0.5 %, con leche descremada al 5% (Svelty® de Nestle®)). Se lavó la membrana 3 veces con Solución de Lavado (PBS 1X / Tween 0.5 %), posteriormente se incubó con 5 mL de Solución de anticuerpo anti HA (PBS 1X / Tween 0.5 %, con leche descremada al 1%, más anticuerpo anti-HA-HRP en una dilución 1:3000) durante 1 hora en agitación gentil a temperatura ambiente. Se descartó el anticuerpo y se realizaron tres lavados con Solución de Lavado (PBS 1X / Tween 0.5 %), incubando 10 minutos entre ellos, con agitación gentil a temperatura ambiente. Finalmente las proteínas fueron detectadas por colorimetría agregando 150  $\mu\text{L}$  del reactivo DAB Substrate Kit (Thermo Scientific) en PBS 1X, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%. La reacción de revelado se detuvo descartando la solución DAB substrate y agregando agua a la membrana.

### **6.11. Diálisis de fracciones de VNAR purificado**

Previo a la diálisis, se juntaron las eluciones donde se encontraba la proteína más pura, de acuerdo a los resultados del SDS-PAGE y Western Blot. Las eluciones recuperadas se colocaron en una membrana tubular SnakeSkin™ Dialysis tubing 3500 MVCO (ThermoScientific) y se dializó contra PBS en una relación 1:200 (muestra:PBS). Se colocó en un agitador magnético por 6 horas a 4° C, se realizó un recambio de solución PBS y se colocó la membrana nuevamente en el agitador magnético por 6 horas a 4° C. Se realizó un último recambio de solución de PBS y se dejó en agitación por 6 horas o toda la noche a 4° C. Al día siguiente se recuperó la proteína dializada y se almacenó en tubos nuevos en alícuotas de 1 mL, se midió la concentración por nanodrop y se almacenó a -20 °C.

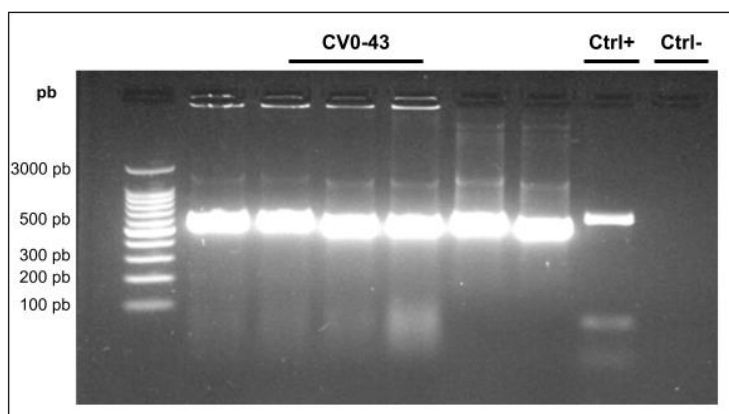
### **6.12. ELISA para evaluar el reconocimiento de los CV0-43 contra CEA**

En una microplaca de ELISA de alta unión con fondo redondo se colocaron por triplicado 250 ng del antígeno (CEA), BSA 1% / PBS 1X (como control negativo) y PBS 1X como blanco. Se fijó el antígeno incubando la placa toda la noche a 4° C. Se eliminó la solución por inversión y se bloquearon los pozos con 150 µL de solución de bloqueo (BSA 3% / PBS 1X) incubando la placa 1 hora a 37° C. Se eliminó la solución y se realizaron cinco lavados con 200 µL de solución de lavado (PBS 1X / Tween 0.5 %). Se añadieron 50 µL/pozo de CV0-43 puro, se incubó durante 1 hora a 37° C. Se eliminó la solución y a cada pozo se agregaron 50 µL de anticuerpo anti-HA-HRP (BSA 1% / PBS 1X) en una relación 1:3000, incubando por 1 hora a 37° C. Se eliminó la solución y se realizaron cinco lavados con 200 µL de solución de lavado (PBS 1X / Tween 0.5 %). Se agregó a los pozos 50 µL de solución de revelado (1-Step™ TMB-Blotting Substrate Solution, ThermoFisher) y se incubó la placa por 30 minutos a 37° C. Finalmente se agregaron a los pozos 50 µL de solución stop (HCl 10%) y se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Transformación de células bacterianas con el plásmido pComb3X-CV0-43 y evaluación mediante la PCR de colonia

Se transformaron células BL21-DE3 de *E. coli* con el plásmido pComb3x que tenía clonada la secuencia de la proteína CV0-43. Se seleccionaron al azar y se sembraron 6 colonias transformadas, que fueron posteriormente evaluadas por PCR de colonia. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. A partir de las seis colonias evaluadas se amplificó exitosamente un fragmento del tamaño esperado, de aproximadamente de 550 pares de bases (pb), correspondiente al gen de la proteína CV0-43 (Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019). Como control positivo se utilizó el VNAR T1 anti TGF $\beta$  clonado en pComb3x.

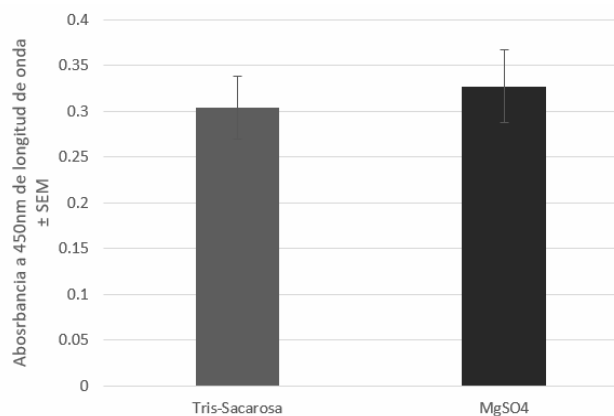


**Figura 1.** Evaluación por PCR de colonias transformadas con pComb3x-CV0-43. CV0-43: Colonias transformadas evaluadas; Ctrl+: (pComb3x-T1); Ctrl- (agua). Gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio.

### 7.2. Expresión de VNAR recombinante

Para evaluar la expresión de los anticuerpos como proteína recombinante, se realizó un ensayo de ELISA utilizando el anticuerpo anti-HA-HRP, que reconoce a la etiqueta HA contenida en la proteína recombinante. Se evaluaron los dos extractos procedentes de la extracción periplásmica (Tris-Sac y MgSO<sub>4</sub>) para determinar la presencia del VNAR

recombinante en ambas soluciones y seleccionar cuál extracto se utilizaría durante la purificación posterior. Se realizó un análisis estadístico de T-Student para comparar los niveles de absorbancia obtenidos en el ELISA entre los dos extractos y saber si se encontraba alguna diferencia significativa entre ambos. Los resultados mostraron (Figura 2) que ambos extractos exhibieron niveles similares de absorbancia, sin que se observara ninguna diferencia significativa entre ellos. Por ello, se decidió combinar los extractos para su posterior purificación.



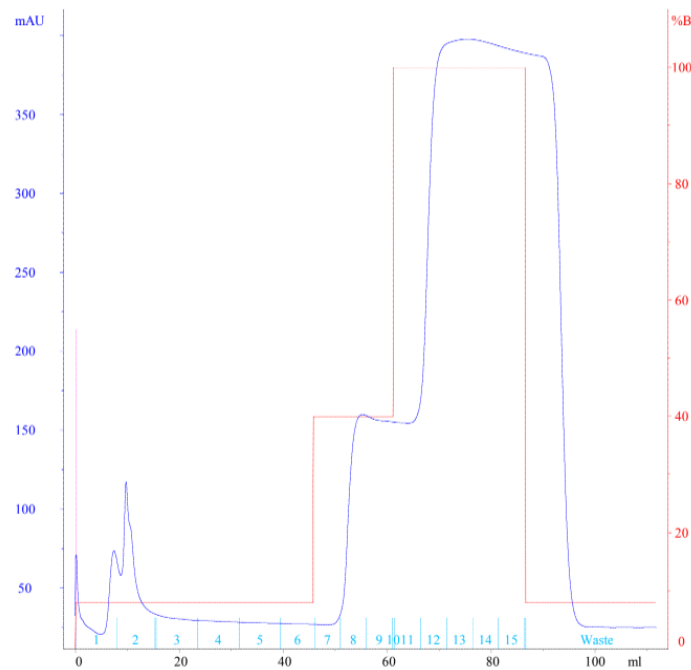
**Figura 2.** Ensayo ELISA para evaluar expresión del VNAR CV0-43. Se evaluaron los extractos periplásmicos Tris-Sacarosa y MgSO4. Para ambos extractos se observó una expresión positiva del mismo rango sin ninguna diferencia significativa. [  $t(22) = 1.41$ ,  $p < 0.155$  ]

Se midió la concentración de proteína del extracto total en el Nanodrop, y se obtuvo una concentración de 46.451 mg/mL de proteína total por cada 500 mL de cultivo bacteriano.

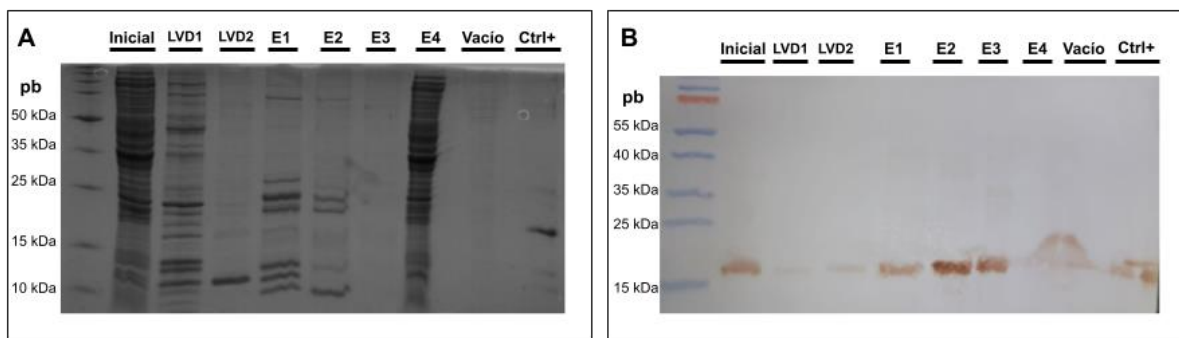
### 7.3. Primera purificación mediante IMAC

Se llevó a cabo una purificación de prueba de CV0-43 a partir de los extractos periplásmicos combinados. Se cargaron 100 mL de muestra en la columna, y se lavó con cuatro fracciones de 5 mL de imidazol a una concentración de 200 mM, seguido de una elución en cinco fracciones de 5 mL de imidazol a una concentración de 500 mM (Figura 3). Las muestras fueron precipitadas con TCA y concentradas 20 veces.

El resultado de la purificación evaluando mediante un gel desnaturalizante teñido con azul de Coomassie (SDS-PAGE) y Western Blot mostró que CV0-43 eluyó en las 4 fracciones evaluadas (Figura 4B), sin embargo, continúan apareciendo gran cantidad proteínas inespecíficas en las eluciones, contaminando la pureza del anticuerpo. Estos resultados resaltaron la necesidad de seguir evaluando diferentes condiciones de lavado/elución durante la purificación de CV0-43. Durante la precipitación de proteínas previa al análisis en SDS-PAGE, se enfrentó un problema con la elución 4. Esto resultó en que la muestra no fuera adecuada para el análisis en SDS-PAGE/Western Blot.



**Figura 3.** Cromatograma de la primera purificación de CV0-43 cargando con 100 mL de extracto periplásmico crudo.



**Figura 4.** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida las proteínas para evaluar la pureza de CV0-43. A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie; B) Western Blot utilizando anti-HA-HRP. Carril inicial: extracto periplásmico; LVD1-LVD2: lavado a 200 mM de imidazol; E1-E4: eluciones 1-4 con 500 mM de imidazol; Vacío: 5  $\mu$ L de Buffer de Carga Laemmli; Ctrl+: VNAR T1.

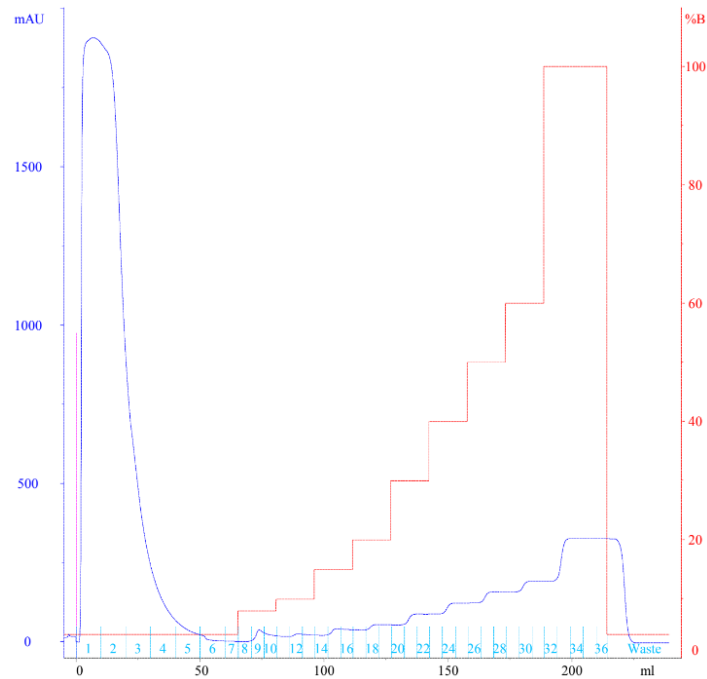
A partir de este punto, previo a la purificación, se adicionó al extracto periplásmico una solución compuesta por un 2% de Triton X-100 y un 10% de glicerol, con el fin de interrumpir las interacciones de proteínas no específicas con la columna utilizada.

#### 7.4. Purificación en forma de gradiente lineal mediante IMAC

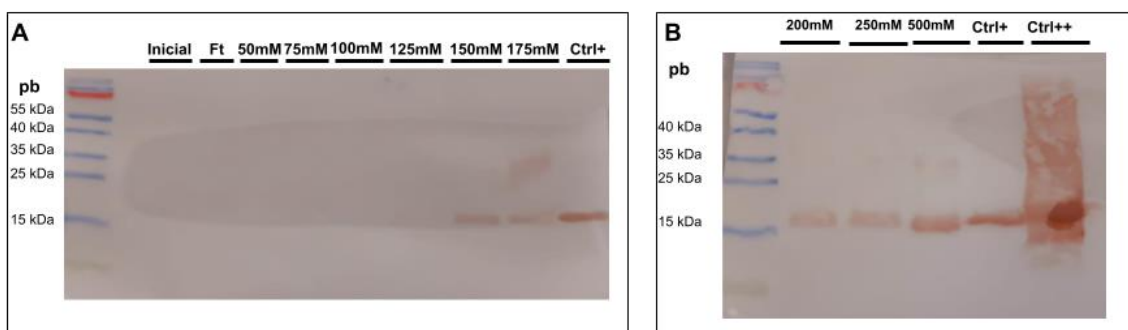
Se llevó a cabo una purificación mediante un gradiente para determinar la concentración óptima de imidazol para eluir al VNAR CV0-43, cargando 200 mL de muestra en la columna. El gradiente se inició con cinco fracciones de imidazol a una concentración de 50 mM, incrementando la concentración en escalones de 50 mM hasta alcanzar los 200 mM (Figura 5). Posteriormente, se agregaron cinco fracciones de imidazol con una concentración de 250 mM, concluyendo finalmente con una concentración de imidazol de 500 mM. Las muestras fueron precipitadas con TCA y concentradas 20 veces para su evaluación por Western Blot.

La figura 6 muestra los resultados obtenidos al evaluar por Western Blot a CV0-43 purificado utilizando 2% de Triton X-100 y un 10% de glicerol. Se observa que la proteína empieza a eluir a una concentración igual y mayor de 125 mM de imidazol.

Aunque los resultados de elución de la proteína fueron mejores que en la primera prueba de purificación (Figura 4), no se logró visualizar correctamente al VNAR CV0-43 en gel SDS-PAGE teñido con Coomassie, por lo que la incógnita de qué tan pura estaba la proteína, continuaba.



**Figura 5.** Cromatograma de la purificación de CV0-43 en forma de gradiente cargando la columna con 200 mL de muestra.



**Figura 6.** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida de CV0-43 purificado mediante IMAC en forma de gradiente. Western blot del anticuerpo purificado en forma de gradiente. Carril inicial: extracto periplásmico; Ft: fracción no retenida; Ctrl+: (VNAR T1), Ctrl++ (VNAR P98Y). Se observó que la proteína empieza a eluir a concentraciones mayores a 125 mM.

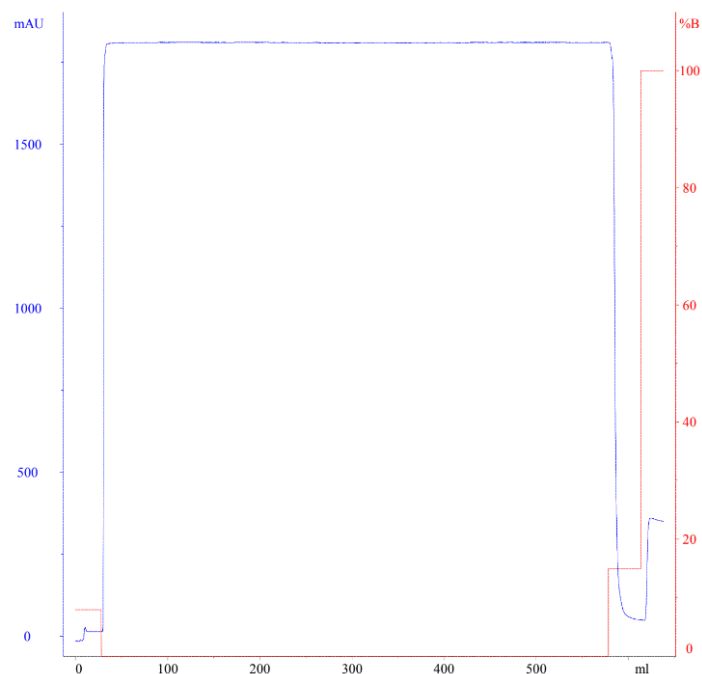
Con base en los resultados obtenidos de la purificación por gradiente, se procedió a purificar la proteína utilizando lavados con concentraciones menores de 125 mM de imidazol y eluciones con concentraciones mayores de 125 mM de imidazol.

### **7.5. Purificación final mediante IMAC**

Se llevó a cabo una purificación de la proteína utilizando los extractos periplásmicos a los cuales se agregó una solución de 2% de Triton X-100 y un 10% de glicerol.

Se realizó una purificación de la proteína utilizando 200 mL de los extractos periplásmicos a los cuales se agregó una solución de 2% de Triton X-100 y un 10% de glicerol, y cargando de nuevo con el flujo no retenido (o "*flow through*") dos veces, con el objetivo de maximizar la retención de la cantidad de VNAR en la columna.

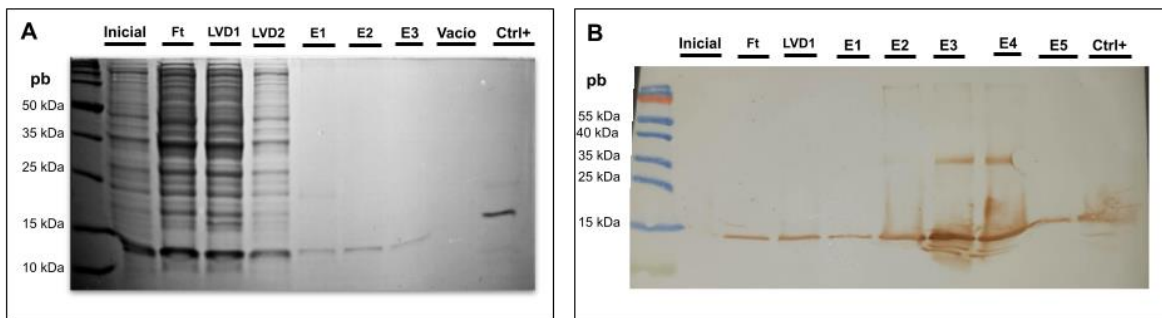
Se realizó un lavado con siete VC de 5 mL de imidazol a una concentración de 75 mM, seguido de una elución en cinco VC de 5 mL de imidazol a una concentración de 500 mM. Posteriormente, las muestras fueron precipitadas y concentradas 20 veces para su evaluación por gel desnaturizante teñido con azul de Coomassie y Western Blot.



**Figura 7.** Cromatograma de la purificación final de CV0-43 cargando con 200 mL de muestra, pero pasando el *flow through* dos veces más por la bomba peristáltica.

El análisis mediante gel de Coomassie (Figura 8A) indica que las proteínas están presentes con un alto grado de pureza, aunque aparentemente se encuentran en una concentración muy diluida.

El análisis por Western Blot (Figura 8B) reveló una pérdida de proteína durante el proceso de lavado, sin embargo, se observó una concentración significativa de la proteína en las fracciones finales de la elución.



**Figura 8.** Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida la proteína VNAR CV0-43 recombinante purificadas mediante IMAC. A) SDS-PAGE; B) Western Blot. Carril inicial: extracto periplásmico; LVD1-LVD2: lavado a 125 mM de imidazol; E1-E5: eluciones 1-5 a 500 mM de imidazol; Vacío: 5  $\mu$ L de Buffer de Carga Laemmli; Ctrl+: VNAR T1.

Con en los resultados obtenidos en la purificación (Figura 8) se decidió juntar las eluciones de la 1 a la 5 para sus análisis posteriores, ya que todas mostraron alto grado de pureza. Las muestras fueron dializadas contra PBS y se cuantificó la concentración final del anticuerpo. Se obtuvo un rendimiento de 3 mg por 1 L de cultivo.

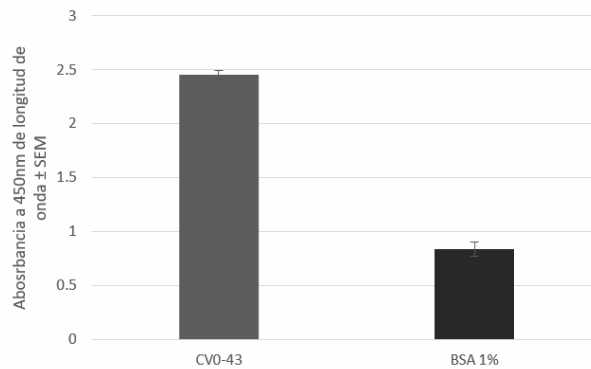
Las muestras fueron dializadas y se cuantificó la concentración final del anticuerpo resultando en 151  $\mu$ g/mL a partir de 1 L de cultivo.

## 7.6. ELISA de reconocimiento contra CEA

Para evaluar si los anticuerpos recombinantes puros no perdieron su funcionalidad al utilizar por primera vez una solución de 2% de Triton X-100 y un 10% de glicerol durante la purificación, se realizó un ensayo de ELISA contra el antígeno CEA. Se realizó un análisis estadístico de T-Student para comparar los niveles de absorbancia entre la muestra dializada y el control negativo (BSA) y blanco para saber si se encontraba alguna diferencia significativa entre ambos.

El resultado mostró que el anticuerpo no perdió su funcionalidad después del proceso de purificación y mostró una diferencia significativa entre el control negativo y la muestra blanco, estos resultados sugirieron que el uso de una solución de 2% de Triton X-100 y un 10%

de glicerol durante la purificación, aumenta el grado de pureza de la muestra sin comprometer la funcionalidad del anticuerpo CV0-43.



**Figura 9.** Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento de CV0-43 contra CEA. Ctrl (-): BSA 1%; Blanco: PBS 1X. [  $t(4) = 36.66, p < 0.001$  ].

## 8. DISCUSIONES.

En este trabajo se desarrolló un protocolo estandarizado para la purificación eficiente de un dominio VNAR nombrado CV0-43, que reconoce al antígeno carcinoembrionario (CEA). Se logró obtener un alto nivel de pureza de la proteína de interés. Este alto nivel de pureza es crucial para garantizar la eficacia biológica y la confiabilidad en posibles aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico del VNAR. A pesar de los buenos resultados de pureza obtenidos, el bajo rendimiento de la proteína purificada presenta un desafío que podría afectar la escalabilidad y la aplicación práctica de este protocolo.

El equilibrio entre pureza y rendimiento en protocolos bioquímicos es un desafío bien documentado (Berthold & Walter, 1994; Bogard *et al.*, 1989; Hussian & Leong, 2023). Lograr una alta pureza a menudo da como resultado rendimientos más bajos, ya que los procesos de purificación necesarios para una alta pureza pueden provocar la pérdida del producto deseado. Esto puede deberse a varios factores, como la pérdida de proteína durante los pasos de purificación, la especificidad de las condiciones de unión y elución que podrían no favorecer

las altas tasas de recuperación o la estabilidad de la proteína durante el proceso de purificación (Falconer *et al.*, 2017; Matthiesen *et al.*, 1996).

En trabajos previos, CV0-043 había sido purificado mediante cromatografía de flujo por gravedad (Cabanillas-Bernal, 2019), una técnica que garantiza niveles elevados de pureza, aunque a expensas de una capacidad de carga de muestra reducida y tiempos prolongados en el proceso, útil para aplicaciones a pequeña escala. La cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) representa un método alternativo que ofrece un alto rendimiento, una capacidad de carga notable y una reducción en el tiempo requerido para todo el proceso, y particularmente útil para la purificación de proteínas debajo de 15 kDa (Sheehan & O'Sullivan, 2004). El uso de FPLC es importante para facilitar las aplicaciones de este anticuerpo a gran escala, ya que se necesita simplificar el tiempo y esfuerzo en la producción de los VNAR.

Los primeros intentos de purificación fueron fallidos, ya que la proteína blanco se perdía durante los lavados con bajas concentraciones de imidazol, y surgían contaminantes asociados con los anticuerpos en las eluciones. Con base en esos resultados, se infiere que esto se debió a interacciones de proteínas no específicas con la columna. Siguiendo las recomendaciones del manual de la columna Histrap™ FF (catálogo #11-0008-88 AF, GE Healthcare), se probó por primera vez para la purificación de este VNAR, la adición de 2% Triton X-100 y 10% glicerol a la muestra a purificar (extracto periplásmico), con la intención de interrumpir las interacciones no específicas. La adición de detergente es crucial para evitar interacciones no específicas, Deschamps (1986) y Robinson *et al.* (1980) destacan la importancia de adicionar detergentes durante el protocolo de purificación para mejorar la separación de proteínas inespecíficas de la proteína blanco y facilitar también la elución de esta última. Poetsch *et al.* (1999) describe el gran impacto positivo que tienen los detergentes en la pureza del producto final.

En la purificación de anticuerpos VNAR, la cromatografía por afinidad es la técnica comúnmente empleada, donde a menudo se consiguen niveles de pureza bastante altos. Zhao *et al.* (2022) logró purificar un VNAR anti-TNF $\alpha$  murino que contenía una etiqueta His mediante el uso de resina de níquel, cargando su muestra con glicerol 10% y eluyendo de forma gradual con distintas concentraciones de imidazol, de 25 a 500 mM. Gauhar *et al.* (2021) purificó un VNAR neutralizante de SARS-CoV-2 con una etiqueta 6xHis, eluyendo a 500 mM de imidazol después de un lavado extenso. Feng *et al.* (2019) uso la misma columna que el presente trabajo purificando a una concentración elevada de imidazol no especificada. Todos los autores describen sus resultados mayores o iguales a un 90% de pureza mediante análisis cualitativos.

Aunque las condiciones utilizadas en este trabajo lograron una alta pureza, aún es posible que se requiera pequeños ajustes para mejorar el rendimiento final, principalmente en las concentraciones de imidazol de los lavados. Lin (1992) describe cómo la simplificación de los pasos intermedios puede aumentar el rendimiento final de la proteína purificada (e.g. más de un paso en lavados o elución). Dado que las condiciones de purificación se han simplificado a solo unos pocos pasos, con un solo lavado y una sola elución, sería prudente inferir que el equipo de FPLC y la columna de níquel no hayan interferido con el rendimiento final de VNAR.

En este estudio, el uso de un vector fagémido en lugar de uno de expresión pudo haber limitado la capacidad de nuestra célula huésped para producir la proteína de interés en cantidades detectables. Esto habría afectado directamente la cantidad de proteína disponible para la purificación, lo que explicaría los resultados con bajas concentraciones observadas.

Los vectores fagémidos están diseñados principalmente para la selección de péptidos y proteínas con propiedades deseadas, como el aislamiento de específicos anticuerpos (Pande *et*

*al.*, 2010), mientras que los vectores de expresión se optimizan para mejorar la expresión de la proteína codificada por el gen insertado; suelen contener promotores fuertes, que son secuencias de ADN que facilitan el inicio de la transcripción, y otros elementos reguladores que aseguran la traducción eficiente del ARNm en proteína (Berrow, 2009). Esta distinción es crucial para lograr altos rendimientos de proteínas funcionales, especialmente en el contexto de aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico como las que involucran dominios VNAR.

El rendimiento de expresión de CV0-43 fue aproximadamente de 3 mg a partir de 1 L de cultivo de *E. coli*. Feng *et al.* (2020) logró un rendimiento de 3 mg/L de cultivo, utilizando el vector pComb3x, el mismo utilizado en este experimento. Por otro lado, Nuttall *et al.* (2004) obtuvo un rendimiento de 5 mg/L utilizando el plásmido pGCS, conocido como un vector multipropósito en la clonación y expresión de ARN mensajero o proteínas en células bacterianas y de mamífero. Zhao *et al.* (2022) logró un rendimiento de ~10.8 mg/L de cultivo utilizando la cepa bacteriana BL21(DE3). Además, English, Hong & Ho (2020) describen cómo cambiando el vector utilizado por Feng *et al.* (pComb3x) a un vector casero optimizado para sus necesidades resultó en un rendimiento de ~20 mg por litro de cultivo. Estos resultados destacan la importancia de la elección del vector y como el uso de un vector de clonación podría conducir a niveles de expresión insuficientes de los VNAR, necesarios para aplicaciones posteriores eficaces, como la purificación y ensayos funcionales.

El bajo rendimiento de producción de una proteína recombinante no solo afecta la cantidad de proteína disponible para futuros estudios y aplicaciones, sino que también afecta la viabilidad general del proyecto desde una perspectiva de eficiencia de costos y tiempo. Para aplicaciones terapéuticas, donde se requieren grandes cantidades de proteína de alta pureza, el uso de un vector de expresión apropiado es fundamental.

Para abordar estos desafíos, se podría considerar cambiar el gen de CV0-43 a un vector de expresión que contenga un promotor optimizado para el sistema de expresión. Además, se podrían explorar otras estrategias, como la de probar otros métodos de extracción periplásmica, optimizar los codones del gen VNAR para que coincida con el uso del huésped o el uso de diferentes cepas del huésped que sean más adecuadas para la expresión de proteínas de alto nivel.

## **9. CONCLUSIONES.**

En este estudio se presenta un protocolo robusto para la purificación eficiente del VNAR CV0-43, que muestra especificidad para CEA. A través de IMAC y la optimización de condiciones, logramos obtener una proteína purificada con un grado de pureza alto. Esta pureza es fundamental para garantizar la fiabilidad y eficacia de futuras aplicaciones terapéuticas y diagnósticas del VNAR.

Este trabajo evaluó por primera vez el uso de una solución de 2% de Triton X-100 y un 10% de glicerol durante la purificación de CV0-43, y encontró que el uso de esta solución aumenta el grado de pureza de la muestra sin comprometer la funcionalidad del anticuerpo CV0-43.

A pesar de los resultados prometedores en cuanto a pureza, nos enfrentamos al desafío del bajo rendimiento de la proteína purificada con un rendimiento de 3 mg/lit, lo que podría limitar su escalabilidad y aplicabilidad práctica.

## 10. REFERENCIAS.

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology*. Tenth edition. Elsevier Saunders.
- Ackaert, C., Smiejkowska, N., Xavier, C., Sterckx, Y. G. J., Denies, S., Stijlemans, B., Elkrim, Y., Devoogdt, N., Caveliers, V., Lahoutte, T., Muyldermans, S., Breckpot, K., & Keyaerts, M. (2021). Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies. *Frontiers in immunology*, *12*, 632687. doi.org/10.3389/fimmu.2021.632687
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2013). *Essential cell biology (4th ed.)*. Garland Publishing.
- Arbabi-Ghahroudi M. (2022). Camelid Single-Domain Antibodies: Promises and Challenges as Lifesaving Treatments. *International journal of molecular sciences*, *23*(9), 5009. doi.org/10.3390/ijms23095009
- Bannas, P., Hambach, J., & Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, *8*. doi:10.3389/fimmu.2017.01603
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Bates, A., & Power, C. A. (2019). David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies*, *8*(2), 28. doi:10.3390/antib8020028
- Berrow, N. S., Alderton, D., & Owens, R. J. (2009). The Precise Engineering of Expression Vectors Using High-Throughput In-Fusion™ PCR Cloning. *High Throughput Protein Expression and Purification*, 75–90. doi:10.1007/978-1-59745-196-3\_5
- Berthold, W., & Walter, J. (1994). Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, *22*(2), 135–150. https://doi.org/10.1006/biol.1994.1020
- Bogard, W. C., Jr, Dean, R. T., Deo, Y., Fuchs, R., Mattis, J. A., McLean, A. A., & Berger, H. J. (1989). Practical considerations in the production, purification, and formulation of monoclonal antibodies for immunoscintigraphy and immunotherapy. *Seminars in nuclear medicine*, *19*(3), 202–220. https://doi.org/10.1016/s0001-2998(89)80014-5
- Bojalil, R., Mata-González, M. T., Sánchez-Muñoz, F., Yee, Y., Argueta, I., Bolaños, L., ... Paniagua-Solís, J. F. (2013). Anti-tumor necrosis factor VNAR single domains reduce lethality and regulate underlying inflammatory response in a murine model of endotoxic shock. *BMC Immunology*, *14*(1), 17. doi:10.1186/1471-2172-14-17
- Brekke, O. (2003). New technologies in therapeutic antibody development. *Current Opinion in Pharmacology*, *3*(5), 544–550. doi:10.1016/j.coph.2003.05.002

- Burgess, S. G., Oleksy, A., Cavazza, T., Richards, M. W., Vernos, I., Matthews, D., & Bayliss, R. (2016). Allosteric inhibition of Aurora-A kinase by a synthetic vNAR domain. *Open biology*, *6*(7), 160089. doi.org/10.1098/rsob.160089
- Byrne, H., Conroy, P. J., Whisstock, J. C., & O’Kennedy, R. J. (2013). A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications. *Trends in Biotechnology*, *31*(11), 621–632. doi:10.1016/j.tibtech.2013.08.007
- Cabanillas Bernal, O. (2019). Generación y caracterización de tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos basadas en tres marcos de anticuerpos vNAR [Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. Tesis - Ciencias de la Vida. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3571>
- Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T., & Licea-Navarro, A. F. (2019). Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLOS ONE*, *14*(6), e0213394. doi:10.1371/journal.pone.0213394
- Cabanillas-Bernal, O., Valdovinos-Navarro, B. J., Cervantes-Luevano, K. E., Sanchez-Campos, N., & Licea-Navarro, A. F. (2023). Unleashing the power of shark variable single domains (VNARs): broadly neutralizing tools for combating SARS-CoV-2. *Frontiers in immunology*, *14*, 1257042. doi.org/10.3389/fimmu.2023.1257042
- Cai H. H. (2021). Therapeutic Monoclonal Antibodies Approved by FDA in 2020. *Clin Res. Immunol*, *4*(1), 1–2.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, *157*(2), 220–233. doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
- Che Hussian, C. H. A., & Leong, W. Y. (2024). Factors affecting therapeutic protein purity and yield during chromatographic purification. *Preparative biochemistry & biotechnology*, *54*(2), 150–158. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2217507>
- Cheong, W. S., Leow, C. Y., Abdul Majeed, A. B., & Leow, C. H. (2020). Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody. *International journal of biological macromolecules*, *147*, 369–375. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.039
- Chiu, Goulet, Teplyakov, & Gilliland. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, *8*(4), 55. doi:10.3390/antib8040055
- Deschamps, J. R. (1986). Detergent Mediated Effects on the High-Performance *Liquid Chromatography of Proteins*. *Journal of Liquid Chromatography*, *9*(8), 1635–1653. doi:10.1080/01483918608076709

- EmergenResearch. (2023, noviembre 28). *Monoclonal Antibodies Market Size Worth USD 572.62 Billion in 2032*. Emergen Research. <https://www.emergenresearch.com/industry-report/monoclonal-antibodies-market>
- English, H., Hong, J., & Ho, M. (2020). Ancient species offers contemporary therapeutics: an update on shark VNAR single domain antibody sequences, phage libraries and potential clinical applications. *Antibody therapeutics*, *3*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa001>
- Falconer, I. B., Mant, C. T., McKnight, C. J., Vugmeyster, L., & Hodges, R. (2017). Optimized purification of a fusion protein by reversed-phase high performance liquid chromatography informed by the linear solvent strength model. *Journal of chromatography. A*, *1521*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.080>
- Feng, M., Bian, H., Wu, X., Fu, T., Fu, Y., Hong, J., Fleming, B. D., Flajnik, M. F., & Ho, M. (2019). Construction and next-generation sequencing analysis of a large phage-displayed VNAR single-domain antibody library from six naïve nurse sharks. *Antibody therapeutics*, *2*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/abt/tby011>
- Fernández-Quintero, M. L., Fischer, A. M., Kokot, J., Waibl, F., Seidler, C. A., & Liedl, K. R. (2022). The influence of antibody humanization on shark variable domain (VNAR) binding site ensembles. *Frontiers in immunology*, *13*, 953917. [doi.org/10.3389/fimmu.2022.953917](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.953917)
- Fernández-Quintero, M. L., Pomarici, N. D., Fischer, A. M., Hoerschinger, V. J., Kroell, K. B., Riccabona, J. R., Kamenik, A. S., Loeffler, J. R., Ferguson, J. A., Perrett, H. R., Liedl, K. R., Han, J., & Ward, A. B. (2023). Structure and Dynamics Guiding Design of Antibody Therapeutics and Vaccines. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, *12*(4), 67. [doi.org/10.3390/antib12040067](https://doi.org/10.3390/antib12040067)
- Flaherty, D. (2012). *Immunology for Pharmacy*, 102–109. Tenth edition. Elsevier Health Sciences. [doi:10.1016/b978-0-323-06947-2.10013-6](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-06947-2.10013-6)
- Gauhar, A., Privezentzev, C. V., Demydchuk, M., Gerlza, T., Rieger, J., Kungl, A. J., Walsh, F. S., Rutkowski, J. L., & Stocki, P. (2021). Single domain shark VNAR antibodies neutralize SARS-CoV-2 infection in vitro. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *35*(11), e21970. [doi.org/10.1096/fj.202100986RR](https://doi.org/10.1096/fj.202100986RR)
- Gilliland, G. L., Luo, J., Vafa, O., & Almagro, J. C. (2011). Leveraging SBDD in Protein Therapeutic Development: Antibody Engineering. *Structure-Based Drug Discovery*, 321–349. [doi:10.1007/978-1-61779-520-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-520-6_14)
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. New York: Garland Science

- Jeong, H., Kim, H. J., & Lee, S. J. (2015). Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. *Genome Announcements*, 3(2). doi:10.1128/genomea.00134-15
- Jiang, X., Sun, L., Hu, C., Zheng, F., Lyu, Z., & Shao, J. (2023). Shark IgNAR: The Next Broad Application Antibody in Clinical Diagnoses and Tumor Therapies?. *Marine drugs*, 21(9), 496. doi.org/10.3390/md21090496
- Jiang, X., Sun, S., Li, Z., & Chen, M. (2023). Isolation and Characterization of Targeting-HBsAg VNAR Single Domain Antibodies from Whitespotted Bamboo Sharks (Chiloscyllium plagiosum). *Marine drugs*, 21(4), 237. doi.org/10.3390/md21040237
- Juma, S. N., Gong, X., Hu, S., Lv, Z., Shao, J., Liu, L., & Chen, G. (2021). Shark New Antigen Receptor (IgNAR): Structure, Characteristics and Potential Biomedical Applications. *Cells*, 10(5), 1140. doi:10.3390/cells10051140
- Khalid, Z., Chen, Y., Yu, D., Abbas, M., Huan, M., Naz, Z., Mengist, H. M., Cao, M. J., & Jin, T. (2022). IgNAR antibody: Structural features, diversity and applications. *Fish & shellfish immunology*, 121, 467–477. doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.027
- Kinoshita, S., Nakakido, M., Mori, C., Kuroda, D., Caaveiro, J. M. M., & Tsumoto, K. (2022). Molecular basis for thermal stability and affinity in a VHH: Contribution of the framework region and its influence in the conformation of the CDR3. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(11), e4450. doi.org/10.1002/pro.4450
- Lin, S.-X., Sailofsky, B., Lapointe, J., & Zhou, M. (1992). Preparative fast purification procedure of various proteins for crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 122(1-4), 242–245. doi:10.1016/0022-0248(92)90252-e
- Liu, J. K. H. (2014). The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113–116. doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1). doi:10.1186/s12929-019-0592-z
- Matamoros, Esther & Gonzalez, Maily. (2021). Study review of camelid and shark antibodies for biomedical and biotechnological applications. *Bionatura*. 6. 2331-2340. 10.21931/RB/2021.06.04.31.
- Matthiesen, F., Hejnaes, K. R., & Skriver, L. (1996). Stabilization of recombinantly expressed proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 782, 413–421. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb40579.x
- Manzanares-Guevara LA, Gasperin-Bulbarela J, Cabanillas-Bernal O, Renteria-Maciél M, Licea-Claverie A, et al. (2024) Preparation of pH-sensitive nanogels bioconjugated with

- shark antibodies (VNAR) for targeted drug delivery with potential applications in colon cancer therapies. *PLOS ONE*, *19(1)*: e0294874. doi.org/10.1371/journal.pone.0294874
- Monnier, Philippe; Vigouroux, Robin; Tassew, Nardos (2013). In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments. *Antibodies*, *2(2)*, 193–208. doi:10.3390/antib2020193
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, *82(1)*, 775–797. doi:10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Muyldermans, S., & Vincke, C. (2016). Structure and Function of Camelid VHH. *Encyclopedia of Immunobiology*, 153–159. doi:10.1016/b978-0-12-374279-7.05019-0
- Nuttall, S. D., Humberstone, K. S., Krishnan, U. V., Carmichael, J. A., Doughty, L., Hattarki, M., ... Hudson, P. J. (2004). Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting Plasmodium falciparum AMA1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *55(1)*, 187–197. doi:10.1002/prot.20005
- Ortega-Monge, C., Arce-Rodríguez, N., Santamaría-Muñoz, M. ., Chavarría-Rojas, M., Rojas Salas, M. F. ., Baltodano Viales, E., & Madrigal Redondo, G. L. (2022). Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, *63(2)*, 189–203. doi.org/10.30827/ars.v63i2.22199
- Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, *28(6)*, 849–858. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.004
- Poetsch, A., Seelert, H., Meyer zu Tittingdorf, J., & Dencher, N. A. (1999). Detergent Effect on Anion Exchange Perfusion Chromatography and Gel Filtration of Intact Chloroplast H<sup>+</sup>-ATP Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *265(2)*, 520–524. doi:10.1006/bbrc.1999.1688
- Posner, J., Barrington, P., Brier, T., & Datta-Mannan, A. (2019). Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *260*, 81–141.. doi:10.1007/164\_2019\_323
- Pothin, E., Lesuisse, D., & Lafaye, P. (2020). Brain Delivery of Single-Domain Antibodies: A Focus on VHH and VNAR. *Pharmaceutics*, *12(10)*, 937. doi.org/10.3390/pharmaceutics12100937
- Qiagen (2003). *The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. Third edition. Qiagen Worldwide
- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. (2011). Engineering Escherichia coli BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination

- after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4634–4646. doi.org/10.1128/AEM.00119-11
- Robinson, J. B., Strottmann, J. M., Wick, D. G., & Stellwagen, E. (1980). Affinity chromatography in nonionic detergent solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(10), 5847–5851. doi:10.1073/pnas.77.10.5847
- Rossotti, M. A., Bélanger, K., Henry, K. A., & Tanha, J. (2022). Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *The FEBS journal*, 289(14), 4304–4327. doi.org/10.1111/febs.15809
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368–379. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2
- Sheehan, D., & O'Sullivan, S. (2004). Fast protein liquid chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 244, 253–258. https://doi.org/10.1385/1-59259-655-x:253
- Streltsov, V. A., Carmichael, J. A., & Nuttall, S. D. (2005). Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 14(11), 2901–2909. doi.org/10.1110/ps.051709505
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., ... Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), 157–174. doi:10.1007/s00430-009-0116-7
- Zhao, L., Chen, M., Wang, X., Kang, S., Xue, W., & Li, Z. (2022). Identification of Anti-TNF $\alpha$  VNAR Single Domain Antibodies from Whitespotted Bambooshark (*Chiloscyllium plagiosum*). *Marine drugs*, 20(5), 307. doi.org/10.3390/md20050307
- Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Könning, D., Barelle, C. J., & Kolmar, H. (2015). Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs*, 7(1), 15–25. doi.org/10.4161/19420862.2015.989032