

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biotecnología Marina**

Efecto de un VNAR anti-VEGF₁₆₅ en el tratamiento del cáncer

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Doctor
en Ciencias

Presenta:
Dalia Vanessa Millán Gómez

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

Dalia Vanessa Millán Gómez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Dr. Marco Antonio de León Nava

Dr. Ernesto García Mendoza

Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Dalia Vanessa Millán Gómez © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Dalia Vanessa Millán Gómez** como requisito parcial para la obtención del grado Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Efecto de un VNAR anti-VEGF₁₆₅ en el tratamiento del cáncer

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Los VNARs se han probado como nuevos entes terapéuticos, basados en su estabilidad, capacidad de unión y penetración en los tejidos. El V13, un VNAR que reconoce al VEGF, se utilizó como molécula parental en la cual se insertaron cambios de aminoácidos *in silico*. Se generaron cinco mutantes de VNAR *in silico* para modificar el reconocimiento por el VEGF. Se seleccionaron dos modelos *in silico* con una única mutación para aumentar el reconocimiento de VEGF y dos modelos con una única mutación para disminuir su reconocimiento por VEGF. Adicionalmente se probó un modelo en el que se combinaron las dos primeras mutaciones para mejorar su unión al VEGF. En comparación con el VNAR V13 parental, las mutaciones P98Y y L99K mejoraron el reconocimiento y la neutralización del VEGF *in vitro*. Por tanto, estas moléculas poseen un potencial terapéutico en la neutralización del VEGF durante la angiogénesis.

Palabras clave: VNAR; VEGF₁₆₅; *in silico*; angiogénesis; *in vitro*; *in vivo*

Abstract of the thesis presented **Dalia Vanessa Millán Gómez** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Effect of a VNAR anti-VEGF₁₆₅ in the treatment of cancer

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

VNARs have been tested as novel therapeutics, based on their stability, binding, and penetration into tissue. V13, a VNAR clone that recognizes VEGF, was used as a parental molecule into which *in silico* amino acids changes were inserted. Five *in silico* VNAR mutants were generated to alter the *in vitro* recognition of VEGF. Two *in silico* models with a single mutation were selected to increase the recognition of VEGF and two models with a single mutation were chosen for their lower affinity to VEGF. An additional model was included with two mutations combined to improve its binding VEGF. Compared with the parental V13 clone, mutations P98Y and L99K improved the recognition and neutralization of VEGF *in vitro*. These molecules thus have therapeutic potential in neutralizing VEGF during angiogenesis.

Keywords: VNAR; VEGF₁₆₅; *in silico*; angiogenesis; *in vitro*; *in vivo*

Dedicatoria

Para mamá, papá y hermanita, por todo su apoyo y dedicación.

Y para los que ya no están, eternamente agradecida... †

—¿Podrías decirme, por favor, qué camino debo seguir para salir de aquí?

—Esto depende en gran parte del sitio al que quieras llegar —dijo el Gato.

—No me importa mucho el sitio... —dijo Alicia.

—Entonces tampoco importa mucho el camino que tomes —dijo el Gato.

—... siempre que llegue a alguna parte —añadió Alicia como explicación.

—¡Oh, siempre llegarás a alguna parte

—aseguró el Gato—, si caminas lo suficiente!

LEWIS CARROLL, ALICIA EN EL PAÍS DE LAS MARAVILLAS

Agradecimientos

Al Dr. Alexei Licea, por su aceptación , apoyo, asesoría y regaños, necesarios para llegar a este día.

A los miembros del comité de tesis, por cada una de sus valiosas aportaciones, por su apoyo y correcciones siempre acertadas:

Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

Dr. Marco Antonio D'León

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Dr. Ernesto García Mendoza

Gracias.

Al Dr. Marco Ramos por su orientación y hospitalidad durante mi estancia de investigación en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías en la UABC Tijuana.

A la Dra. Noemí Sánchez por su apoyo y dedicación a este proyecto.

A Adriana Mejía y Gabriela Altamirano por la tramitología requerida durante todo este periodo.

Al M. en C. Jahaziel Gasperín por la asesoría en las técnicas realizadas.

Al M. en C. Salvador Dueñas por el entendimiento y contribución *in silico* de este proyecto.

Al M. en C. Florian Drescher, por su apoyo y asesoría en las técnicas *in vitro*.

A todos y cada uno de mis amigos y compañeros que hicieron de mi estancia una aventura, por la sonrisa otorgada, por el abrazo dado, por el regaño merecido. Sin ustedes esta historia no estaría completa.

A Óscar Ferniza, porque estuviste ahí siempre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiv
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Estructura y función de los anticuerpos	1
1.1.2 Aplicaciones biomédicas de los anticuerpos	3
1.1.3 Ingeniería de los anticuerpos.....	4
1.1.4 IgNAR.....	6
1.1.5 VNAR.....	10
1.1.6 Factor de crecimiento endotelial vascular como proteína blanco.....	11
1.1.7 Angiogénesis y cáncer	15
1.1.8 Tratamientos anti-angiogénicos	17
1.2 Justificación.....	18
1.3 Hipótesis	18
1.4 Objetivos	19
1.4.1 Objetivo general.....	19
1.4.2 Objetivos específicos.....	19
Capítulo 2 Metodología.....	20
2.1 Antecedentes	20
2.1.1 Origen del VNAR.....	20
2.1.2 Generación de mutantes dirigidas contra el VEGF	20

2.2 Obtención del plásmido pComb3x.....	21
2.3 Electroforesis en gel de agarosa	21
2.4 Amplificación de las secuencias mutantes de VNAR por PCR	21
2.5 Digestión enzimática de los VNAR y vectores	22
2.6 Purificación de los productos de digestión	23
2.7 Ligación	23
2.8 Preparación de células competentes.....	23
2.9 Transformación de <i>E. coli</i>	24
2.10 PCR de colonia.....	24
2.11 Secuenciación.....	25
2.12 Expresión de las proteínas.....	25
2.13 Extracción periplásmica.....	26
2.14 Purificación de proteínas.....	26
2.14.1 Diálisis.....	26
2.14.2 Concentración de proteínas.....	27
2.14.3 Purificación por FPLC.....	27
2.14.4 Cuantificación de proteínas	28
2.15 Análisis de la expresión	28
2.15.1 Preparación de la muestra.....	28
2.15.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	28
2.15.3 Western blot	29
2.15.4 ELISA de expresión	29
2.16 Reconocimiento del VEGF por las mutantes VNAR.....	30
2.17 Producción masiva de anticuerpos.....	30
2.17.1 Pruebas de expresión a dos temperaturas diferentes	30

2.17.2 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)	31
2.17.3 Cuantificación de las proteínas	31
2.17.4 Estudio de estabilidad térmica.....	31
2.18 Ensayo de proliferación de células HUVEC	32
2.19 Ensayo de angiogénesis	33
2.20 Evaluación del efecto de los VNAR <i>in vivo</i>	35
Capítulo 3 Resultados.....	36
3.1 Resultado de la clonación de las mutantes VNAR	36
3.2 Resultado de la expresión de las mutantes VNAR en pComb3x	40
3.3 Resultado del reconocimiento del VEGF por las mutantes VNAR	47
3.4 Resultado de la producción masiva de anticuerpos.....	49
3.4.1 Resultado de las pruebas de expresión a dos temperaturas diferentes	49
3.4.2 Resultado de la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC)	51
3.4.3 Resultado de la cuantificación de las proteínas.....	53
3.4.4 Resultado del estudio de estabilidad térmica.....	54
3.5 Resultado del ensayo de proliferación celular de HUVEC	56
3.6 Resultado del ensayo de angiogénesis	59
3.7 Resultado de la evaluación del efecto de los VNAR <i>in vivo</i>	67
Capítulo 4 Discusión	71
4.1 Mutaciones <i>in silico</i> y el sistema de expresión	71
4.2 Reconocimiento <i>in vitro</i> del VEGF₁₆₅.....	74
4.3 Evaluación <i>in vivo</i> de la neutralización del VEGF₁₆₅	75
Capítulo 5 Conclusiones	77
Literatura citada	78

Anexos	83
Modelación de la mutación dirigida del gen V13	83
Material	88
Cepas bacterianas, líneas celulares	88
Plásmidos	88
Enzimas, marcadores de ADN y proteínas	90
Oligonucleótidos.....	90
Soluciones, buffers y medios de cultivo.....	90

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de una IgG convencional (Modificado de Deng <i>et al.</i> , 2012).	2
Figura 2 Representación esquemática de los fragmentos que se pueden obtener a partir de una IgG convencional (Saerens <i>et al.</i> , 2008)	4
Figura 3 Diagrama de los tejidos primarios y secundarios en los peces cartilagosos (Rumfelt <i>et al.</i> , 2002).	7
Figura 4 Configuraciones esquemáticas de los translocos y los cluster aparecidos en diferentes grupos animales (Dooley y Flajnik, 2006).	7
Figura 5 Estructura de las Ig de cadena pesada IgM, IgW e IgNAR en forma secretoria y transmembranal (Smith <i>et al.</i> , 2015).....	8
Figura 6 Estructura hipotética del IgNAR (Zielonka <i>et al.</i> , 2015).....	9
Figura 7 Representación estructural de un VNAR (Zielonka <i>et al.</i> , 2015).....	10
Figura 8 Isoformas del VEGF y su interacción con los receptores de VEGF (modificado de Ferrara <i>et al.</i> , 2003).	14
Figura 9 Proceso de neovascularización tumoral que involucra la liberación de factores pro-angiogénicos por células tumorales (como el VEGF) causando el crecimiento de vasos sanguíneos y posterior metástasis (Spannuth <i>et. al.</i> , 2008).....	16
Figura 10 Principales terapias anti-cancerígenas con propiedades anti-angiogénicas aprobadas en Estados Unidos (modificado de www.angio.org).	18
Figura 11 Proceso de digestión del plásmido y las mutantes.....	22
Figura 12 Disposición en placa de 96 pozos para ensayo de proliferación de células HUVEC.	33
Figura 13 Vector pComb3x purificado visto en un gel de agarosa al 08%. Carril 1: Escalera de ADN. Carril 1,2,3: pComb3x purificado de tres cultivos diferentes y con el peso molecular esperado.....	36
Figura 14 Estado inicial y re-amplificación de las mutantes de V13.	37
Figura 15 Amplificación teórica de las mutantes realizada con SnapGene. Esta amplificación inserta las regiones de corte para la enzima Sfil.	37
Figura 16 Construcción del mapa de expresión de las mutantes de V13 con pComb3x.	38
Figura 17 PCR de colonias con los primers omseq y gback. Carril 1: Escalera de ADN. Carril 2: mutante L99K. Carril 3: mutante R90A. Carril 4: R97A. Carril 5: gen parental. Carril 6: mutante P98Y. Carril 7: control negativo.	39

Figura 18 Secuencias obtenidas a partir de los plásmidos extraídos de una colonia por mutante.....	39
Figura 19 ELISA de expresión. Realizado a partir del extracto periplásmico de cada cultivo por mutante.	40
Figura 20 Gel SDS-PAGE al 12%. Se evaluaron los dos extractos obtenidos por proceso en cada mutante.	41
Figura 21 Western blot de extractos donde se muestran las bandas esperadas en un peso molecular de 16 kDa aproximadamente.	41
Figura 22 Western blot de las eluciones (E) de los VNAR P98Y, L99K Y P98Y-L99K obtenidas durante la purificación.	42
Figura 23 Western blot de las eluciones (E) de las mutantes R90A y R97A obtenidas durante la purificación.	42
Figura 24 Western blot: P3 (pase 3), L1 (lavado 1), L2 (lavado 2).	43
Figura 25 Cromatograma correspondiente a la purificación de un VNAR por FPLC. A: pico de desecho inicial. B: lugar donde debía estar el pico del VNAR purificado.....	43
Figura 26 Western blot de las muestras agrupadas obtenidas a partir de la purificación por FPLC. Carril 10: filtrado final. Carril 1: desecho.....	44
Figura 27 Western blot de fracciones que componen el carril 1 de la figura 26 correspondiente al desecho. Carril 3 y 4: fracciones de desecho.....	45
Figura 28 Análisis de la expresión de las proteínas. A: Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. B: Western blot. Las flechas indican el peso de las proteínas obtenidas.	46
Figura 29 ELISA de expresión de las proteínas después de ser purificadas.	46
Figura 30 Disposición de los pozos en placa para ELISA de reconocimiento.	47
Figura 31 ELISA de reconocimiento de dos lotes diferentes.	48
Figura 32 ELISA de reconocimiento con titulación para los VNAR.	48
Figura 33 Análisis de la expresión de los cinco mutantes de anti-VEGF. Las muestras corresponden en cada caso al extracto total control sin inducir (U), al extracto total transcurrido el tiempo de inducción (TE), a la fracción soluble tras la lisis de las células (S) y a la fracción insoluble resultante de la lisis (I). En los geles se cargaron los mismos volúmenes de extracto celular.....	50
Figura 34 A) Cromatogramas IMAC superpuestos de las purificaciones realizadas a partir de la fracción soluble de las sobreexpresiones a dos temperaturas diferentes de la mutante P98Y+L99K. B) Gel SDS-PAGE correspondiente a la electroforesis de las purificaciones cuyos cromatogramas se muestran. Las fracciones cargadas son el pellet insoluble tras la lisis (P), en el cual se aprecia que está la mayor parte de la proteína sobreexpresada; la fracción soluble obtenida tras centrifugar el lisado celular (S), el flow-through que contiene las proteínas que no se unen a la columna (F),	

y las dos fracciones que acumulan el 99% del pico de elución en cada caso (5 y 6, o 6 y 7). De las fracciones de elución se cargaron 20 μ L en el gel. El resto de mutantes mostraron un perfil muy similar a esta.	51
Figura 35 A) Cromatogramas IMAC de las purificaciones a partir de la fracción insoluble de las sobreexpresiones a dos temperaturas diferentes del mutante R90A. B) Geles correspondientes a electroforesis de las purificaciones cuyos cromatogramas se muestran. A la izquierda las figuras corresponden a la purificación a partir de la sobreexpresión a 30°C durante 18 h, y a la derecha corresponden a la purificación a partir de la sobreexpresión a 37°C durante 4 h. Se cargaron 10 μ L de las fracciones indicadas. El resto de mutantes mostraron un perfil muy similar al del mutante que se muestra aquí a modo de ejemplo.	52
Figura 36 Geles correspondientes a la electroforesis de las preparaciones finales de cada purificación junto a un patrón de BSA para estimar los rendimientos por densitometría de bandas. En el caso de las muestras solubles, las fracciones de ambas expresiones (30°C y 37°C) fueron combinadas para la cuantificación de la proteína total.	53
Figura 37 Ejemplo de gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie con estándares de VNAR para cuantificación de proteína. 1) 1 μ g. 2) 0.75 μ g. 3) 0.5 μ g. 4) 0.25 μ g. 5) Proteína 2 μ L. 6) Proteína 1 μ L.	54
Figura 38 Representación de la estabilidad de una de las proteínas sometida a diferentes temperaturas.	55
Figura 39 Análisis de la presencia de la etiqueta 6-His.	55
Figura 40 Ensayo de proliferación de HUVEC, probado diferentes composiciones del medio de cultivo. T representa cada tiempo de cultivo evaluado. MC: medio de cultivo completo. M1: medio de cultivo sin factores de crecimiento pero con VEGF. M2: medio de cultivo sin factores de crecimiento y sin VEGF. M3: medio de cultivo sin factores de crecimiento, sin suero fetal bovino pero con VEGF. M4: medio de cultivo sin factores de crecimiento, sin suero fetal bovino y sin VEGF.	57
Figura 41 Proliferación de células HUVEC en presencia y ausencia de los factores de crecimiento. MC: medio de cultivo completo. M1: medio de cultivo con VEGF pero sin otros factores de crecimiento. M2: medio de cultivo sin VEGF pero con los demás factores de crecimiento. M3: medio de cultivo sin VEGF y sin los demás factores de crecimiento.	57
Figura 42 Proliferación de células HUVEC a diferentes concentraciones de VEGF y en ausencia de otros factores de crecimiento. MC: medio de cultivo completo. M1: con 6 μ L de VEGF. M1A: con 12 μ L de VEGF. M1B: con 18 μ L de VEGF. M3: sin VEGF.	59
Figura 43 Inhibición del crecimiento y formación de tubos. Imágenes correspondientes a los controles utilizados.	60
Figura 44 Inhibición del crecimiento y formación de tubos. Imágenes tomadas 240 horas después de haber sido sembradas.	61
Figura 45 Inhibición del crecimiento y formación de tubos. Imágenes tomadas 240 horas después de haber sido sembradas.	62

Figura 46 Efectos del tratamiento en la longitud de los tubos. Se monitoreó por 240 horas. Después de 48 horas de incubación, se agregaron los VNAR y el VEGF.	63
Figura 47 Efectos del compuesto tratamiento en los puntos de ramificación. Se monitoreó por 240 horas y los puntos son el promedio de 3 pozos.	64
Figura 48 Efectos del tratamiento en la longitud de los tubos. Se monitoreó por 240 horas. Después de 48 horas de incubación, se agregaron los VNAR y el VEGF.	65
Figura 49 Efectos del tratamiento en los puntos de ramificación. Se monitoreó por 240 horas. Después de 48 horas de incubación, se agregaron los VNAR y el VEGF.	66
Figura 50 Fluorescencia de la angiogénesis tumoral en ratones desnudos transgénicos ND-GFP.	69
Figura 51 Comparación porcentual del crecimiento vascular con respecto al control. L99K muestra una reducción de casi el 50% del crecimiento vascular con respecto a VNAR parental, seguido del P98Y cuya efectividad se reflejó también en los experimentos in vitro.	70
Figura 52 Imagen tridimensional de los principales residuos en la interacción del complejo AMA1-IgNAR.	83
Figura 53 Superposición de la estructura inicial (gris) y final de la dinámica (cian) de VEGF.	84
Figura 54 Modelo 1 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).	85
Figura 55 Modelo 2 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).	85
Figura 56 Modelo 3 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).	86
Figura 57 Modelo 4 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).	86
Figura 58 Vector pComb3x. http://www.creative-biogene.com/pComb3X-vector-VPT4012-1232908-74.html	89
Figura 59 Mapa de expresión del vector pET-28a(+).	89

Lista de tablas

Tabla 1 Dominios VNAR aislados y publicados contra diferentes blancos (Kovaleva et. al., 2014).....	6
Tabla 2 Clasificación de los factores de crecimiento endotelial vascular (modificado de Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006)	12
Tabla 3 Condiciones de PCR para amplificación.	22
Tabla 4 Soluciones utilizadas en el FPLC.	27
Tabla 5 Composición de los medios de cultivo utilizados.	32
Tabla 6 Esquema experimental de la placa para la evaluación de los VNAR en angiogénesis.....	34
Tabla 7 Cuantificación relativa de las proteínas por fracción.	53
Tabla 8 Concentraciones de VNAR obtenidas.	54
Tabla 9 Composición de los medios de cultivo para HUVEC.	56
Tabla 10 Evaluación de diferentes concentraciones de VEGF en el medio de cultivo.....	58
Tabla 11 Comparación de los valores de IC50 de la angiogénesis.....	67
Tabla 12 Conformaciones tomadas por VNAR V13 a lo largo de la simulación.	84
Tabla 13 Resumen de las mutantes propuestas para se evaluadas.	87

Capítulo 1 Introducción

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. El factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (por sus siglas en inglés), pertenece a una gran familia que junto con sus receptores son reguladores esenciales de la angiogénesis y de la permeabilidad vascular. La sobreexpresión del VEGF ha sido correlacionada con la metástasis, y existen estudios que demuestran que la inhibición de su producción por medio de la administración de anticuerpos anti-VEGF produce una reducción del crecimiento neoplásico. Los tratamientos utilizados en el combate del cáncer incluyen radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estos actúan de manera inespecífica sobre todas las células, resultando tóxicas para las células sanas. Una alternativa de co-tratamiento es el uso de VNAR anti-VEGF, que auxiliaría en la neutralización de la citocina VEGF165 en células tumorales, suprimiendo su crecimiento, haciéndolas candidatas a una extirpación quirúrgica. Un requerimiento para los medicamentos basados en anticuerpos es el desarrollo de proteínas que puedan unirse con alta afinidad a epítopos específicos relacionados a sitios críticos de actividad. Esto puede ser logrado con un diseño *in silico* que mejore su afinidad.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Estructura y función de los anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que pertenecen al sistema inmune adaptativo de los vertebrados cuando hay una exposición de estructuras extrañas conocidas como inmunógenos. Los anticuerpos son expresados como receptores en las superficies de las células B, cada uno de ellos con una especificidad distinta. En los seres humanos existen cinco tipos de anticuerpos, clasificados de acuerdo a la cadena pesada de sus dominios constantes, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. El isotipo IgG es el más utilizado como anticuerpo terapéutico. Los IgG son grandes proteínas de 152 kDa, compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (Figura 1). La unidad estructural básica de un anticuerpo está compuesta de dos cadenas pesadas idénticas. Las regiones variables N-terminal de las cadenas pesadas y ligeras forman los sitios de unión al antígeno (parátopo), mientras que las regiones constantes C-terminal de las cadenas pesadas interactúan funcionalmente con otras moléculas en el sistema inmune. Dentro de cada dominio

variable se encuentra tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), que determinan la unión al antígeno. Por lo tanto, existen un total de seis CDRs que contribuyen a la unión al antígeno.

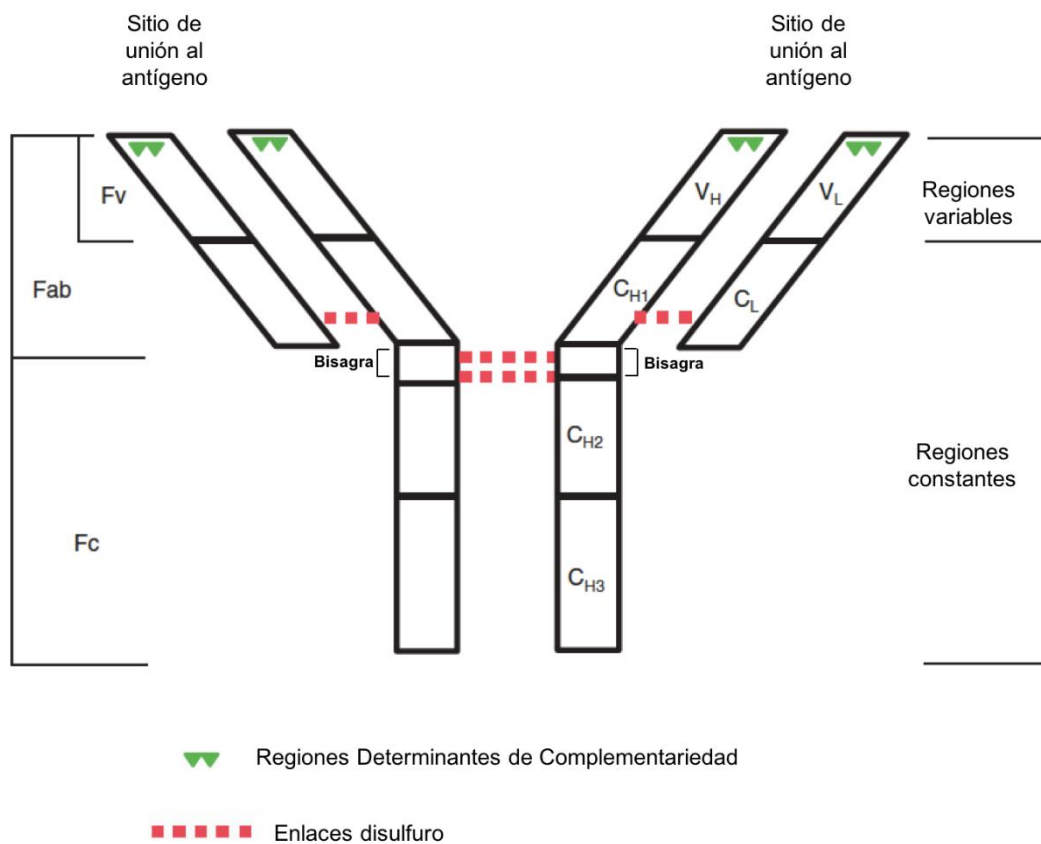


Figura 1. Estructura de una IgG convencional (Modificado de Deng *et al.*, 2012).

Las interacciones que los anticuerpos forman con el antígeno son del tipo no covalentes. Los anticuerpos, como parte del sistema inmune adaptativo, tienen la capacidad de unirse a los antígenos para neutralizarlos. El complejo antígeno-anticuerpo que se forma es el detonante de una cascada de reacciones que degradan este complejo (Abbas *et al.*, 2012). Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B activados y se encuentran unidos a membrana o de forma soluble. Representan la fase efectora de la respuesta inmune humoral. En la fase efectora de la respuesta inmune adaptativa, los anticuerpos secretados se unen al antígeno y activan varias respuestas para eliminar al antígeno, neutralizarlos y marcarlos para que sean eliminados, ya sea promoviendo la fagocitosis o despertando la respuesta de mediadores inflamatorios (Abbas *et al.*, 2004).

1.1.2 Aplicaciones biomédicas de los anticuerpos

Dentro del mercado farmacéutico, los entes biológicos han tenido un crecimiento sustancial exitoso. Existen aproximadamente 40 anticuerpos en el mercado (aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos, FDA por sus siglas en inglés) y cientos de ellos se encuentra en desarrollo clínico, haciendo el valor económico y terapéutico de los anticuerpos monoclonales muy evidente. Desde su aparición durante la década 1980-89, los anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón crearon la expectativa de revolucionar el tratamiento de enfermedades, debido a su gran especificidad y homogeneidad. Bajo ciertas circunstancias, la eficacia de diagnóstico y terapéutica de los anticuerpos monoclonales puede estar limitada por atributos inherentes como su tamaño y su complejidad estructural. Sin embargo, las primeras aplicaciones terapéuticas mostraron como limitación el desarrollo de respuesta inmune contra secuencias de las regiones constantes por los pacientes tratados. Esta respuesta, conocida como HAMA (human anti-mouse antibodies) tiene efectos patogénicos expresados en inflamación articular, eritema cutáneo y falla renal, entre otros. Se caracteriza además, por aumentar con la administración de dosis repetidas, teniendo como consecuencia una reducción de la actividad benéfica del mAb. Así, los anticuerpos monoclonales de ratón sólo hallaron aplicación en los campos del diagnóstico clínico, análisis biológico e investigación (Aguillon *et al.*, 2003). El límite de los anticuerpos monoclonales puede estar basado en su incapacidad para acceder a ciertos epítomos críticos o sitios activos enzimáticos, así como por su movilidad y penetración en los tejidos.

El rediseño de anticuerpos murinos dentro de la biología molecular, plantea la incorporación de aminoácidos humanos funcionalmente equivalentes, inicialmente mediante la sustitución de los dominios constantes con equivalentes humanos, reduciendo así la inmunogenicidad de la molécula (Knight *et al.*, 1995). Lo anterior es conocido como anticuerpos quiméricos, e incluyen al infliximab y rituximab. Sin embargo, se desarrolla inmunogenicidad por anticuerpos quiméricos humanos, así como hipersensibilidad que forman parte de las advertencias de estos medicamentos, resultando en una falta de eficacia. Así surge la nueva generación de anticuerpos monoclonales humanizados, con el mínimo de aminoácidos murinos en sus secuencias. Actualmente, existen diferentes tratamientos basados en anticuerpos humanizados aprobados para artritis reumatoide como tocilizumab, un anticuerpo anti-IL-6R, golimumab, adalimumab certolizumab, trastuzumab y bevacizumab para cáncer, omalizumab para asma y natalizumab para esclerosis múltiple (Campbell *et al.*, 2010). Las tecnologías utilizadas para el desarrollo de anticuerpos recombinantes de origen totalmente humano han sido realizadas con dos tecnologías alternativas, despliegue de fagos y ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulinas

humanas (Lonberg *et al.*, 1994). Existen también técnicas que permiten fragmentar a los anticuerpos en unidades tan pequeñas que no pueden ser detectados por el sistema inmune.

1.1.3 Ingeniería de los anticuerpos

Uno de los principales objetivos de la ingeniería de anticuerpos es minimizar el tamaño de las inmunoglobulinas para el desarrollo de fármacos y, de esta manera, utilizar los fragmentos de anticuerpos como herramientas terapéuticas (Sandhu, 1992). Posteriormente se desarrollaron a partir de la inmunoglobulina de 150 kDa bivalente intacta, pequeños fragmentos de unión al antígeno como el Fab (*Fragment antigen-binding*) y el Fv (*Fragment variable*). El Fab, de 50 kDa, está formado por los dominios VH, VL y los dominios constantes CH1 y CL. El Fv, de 25 kDa, está formado por los dominios variables de ambas cadenas. Los dominios del fragmento Fv se disocian fácilmente y requieren el agregado de un “linker” o enlaces disulfuro para vincular ambas cadenas, formando así un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv: single chain Fv) (Figura 2).

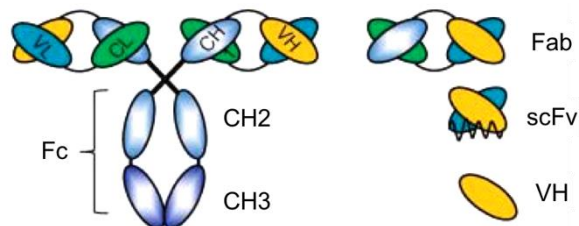


Figura 2 Representación esquemática de los fragmentos que se pueden obtener a partir de una IgG convencional (Saerens *et al.*, 2008)

También pudieron ser aislados el VH y el VL como dominios únicos monoméricos, denominándose anticuerpos de dominio único (sdAb: single domain antibody) (Roovers *et al.*, 2007).

Los avances tecnológicos en el diseño de fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de alguna manera intentan imitar las estrategias de selección empleadas por el sistema inmune. A partir de las bibliotecas de expresión, es posible aislar anticuerpos contra virtualmente cualquier antígeno. Una de las

herramientas más empleadas a partir de bibliotecas es el uso del despliegue en fagos utilizando un bacteriófago filamentoso de *E. coli* (Smith, 1985). Mediante esta técnica, los fragmentos de anticuerpos son expuestos sobre la superficie del fago y los mismos pueden ser seleccionados por unión al antígeno. Luego, estos fagos son utilizados para infectar bacterias donde los fragmentos de anticuerpos son expresados (Hoogenboom *et al.*, 1998). Una de las aplicaciones más exitosas de esta técnica de despliegue en fagos, ha sido el aislamiento de anticuerpos monoclonales a partir de grandes bibliotecas de fagos (Winter *et al.*, 1994). A partir del ADN genómico y del ADNc pueden amplificarse repertorios grandes y diversos de Fab, scFv o sdAbs para la construcción de bibliotecas y su posterior selección.

En los nuevos receptores de antígeno de dominio variable (VNAR) se han encontrado una fuente de moléculas que pueden ser utilizadas para nuevas terapias y diagnóstico. La simplificación del formato estructural, puede ser una alternativa a aquellos biológicos que existen actualmente en el mercado. Existen dos formas disponibles para el aislamiento de VNARs. La primera se basa en el sistema inmune adaptativo de los tiburones, donde es tomada una muestra de sangre después de un proceso de inmunización, se hace extracción de ARN y la amplificación del repertorio de los VNAR a partir del ADNc generado. Posteriormente, haciendo uso del despliegue de fagos, se obtienen los VNARs. La segunda forma de aislar VNAR es mediante la construcción de una biblioteca naïve o semisintética por medio del despliegue de fagos. Esta se basa en dominios naturales de VNAR que con frecuencia incluyen diversidad adicional por medio de ingeniería de las regiones CDR (Liu *et al.*, 2014). Ambos métodos han sido utilizados exitosamente para aislar diferentes dominios contra distintos blancos (Tabla 1).

Por su alta afinidad, selectividad, estabilidad, solubilidad, capacidad de plegamiento y soporte de altas temperaturas y pH, pero sobre todo por su tamaño pequeño, los VNARs pueden ser buenos candidatos para su desarrollo terapéutico y no sólo de diagnóstico.

Tabla 1 Dominios VNAR aislados y publicados contra diferentes blancos (Kovaleva et. al., 2014).

Blanco	Aplicación	Fuente
VHSV	Anti-viral	Semi-sintético, banded houndshark
HEL	Concepto de prueba	Semi-sintético, banded houndshark
TNF-a	Shock endotóxico	Inmunizado, horn shark
HSA	Extensión de la vida media	Inmunizado, spiny dogfish
HBeAg de HBV	Anti-viral	Semi-sintético, wobbecong
Virus del ébola	Inmunodiagnóstico	Inmunizado, nurse
Toxina del cólera	Biosensor	Naïve, spiny dogfish
Enterotoxina B stafilococa	Sensor	Semi-sintético, spiny dogfish
Ricino	Sensor	Semi-sintético, spiny dogfish
Toxina botulínica	Sensor	Semi-sintético, spiny dogfish
Leptina	Concepto de prueba	Semi-sintético, nurse
AMA1	Diagnóstico de malaria	Semi-sintético, wobbecong
Tom70	Diagnóstico y terapia	Semi-sintético, wobbecong
HEL	Concepto de prueba	Inmunizado, nurse
Proteasa K	Concepto de prueba	Naïve, semi-sintético, wobbecong

1.1.4 IgNAR

Las inmunoglobulinas (Ig) y los receptores de células T (TCR) constituyen el sistema inmunológico adaptativo en vertebrados, donde la especificidad y la memoria la proveen los dominios variables en ambas moléculas (Criscitiello *et al.*, 2006). Los peces cartilaginosos (tiburones, rayas, mantas y quimeras) son el grupo más distante relacionado a los mamíferos, filogenéticamente hablando, que divergieron de un ancestro común hace aproximadamente 450 millones de años. Estos peces no poseen médula ósea, pero poseen un equivalente en el órgano epigonal y órgano de Leydig (Figura 3; Rumfelt *et al.*, 2002). El sistema linfático es importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, y transporta a los antígenos-patógenos y linfocitos de un sitio de infección en tejidos distantes hacia los órganos linfoides secundarios, donde la respuesta adaptativa puede ser activada.

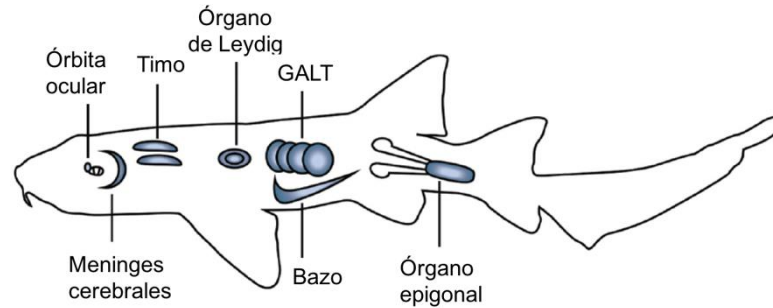


Figura 3 Diagrama de los tejidos primarios y secundarios en los peces cartilaginosos (Rumfelt et al., 2002).

A diferencia de los seres humanos, los peces cartilaginosos poseen *mini-loci* múltiples o *clusters* donde se encuentran los genes que codifican a los diferentes anticuerpos (Figura 4). Cada *cluster* contiene un solo segmento V, uno o más segmentos D, un segmento J y un grupo de exones de regiones constantes. La evidencia disponible indica que el arreglo de los genes VDJ/VJ ocurre exclusivamente dentro de un *cluster* y no entre *clusters* (Greenberg, 1995; Dooley y Flaknij, 2006).

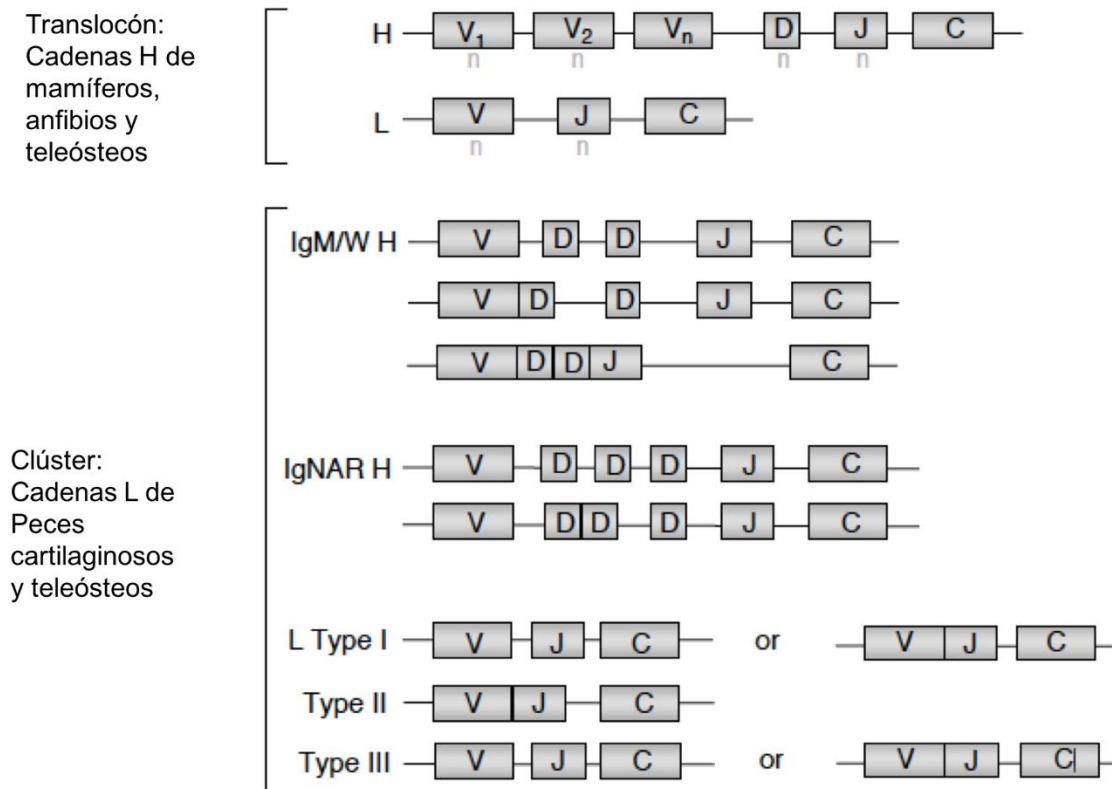


Figura 4 Configuraciones esquemáticas de los translocones y los cluster aparecidos en diferentes grupos animales (Dooley y Flajnik, 2006).

En los elasmobranquios se han identificado tres isotipos de inmunoglobulina de cadena pesada, IgW, IgM e IgNAR (Figura 5), y se ha propuesto que la IgM pentamérica, es la que confiere la respuesta humoral primaria, mientras que la IgM monomérica, IgW e IgNAR puedan ser las verdaderas mediadoras de la respuesta adaptativa en peces cartilaginosos (Dooley *et al.*, 2005). En algunos peces cartilaginosos, su sistema inmunológico también se encuentra constituido por los receptores de células T (TCR) y el complejo principal de histocompatibilidad (Alzogaray, 2010).

Las IgM fueron las primeras inmunoglobulinas identificadas en peces cartilaginosos. IgM existe como monómero (7S) o como pentámeros (19S), al igual que las IgM de mamíferos, se asocian para formar multímeros. Está presente en sangre y tejidos (sólo si no está multimérica) y constituye cerca de la mitad de las proteínas séricas totales en un animal adulto (>20 mg/mL). La IgW existe en dos formas, una larga con siete dominios y una forma corta con tres dominios cortos, y se piensa que tiene existe un isotipo ortólogo en reptiles y peces (Ohta y Flajnik, 2006).

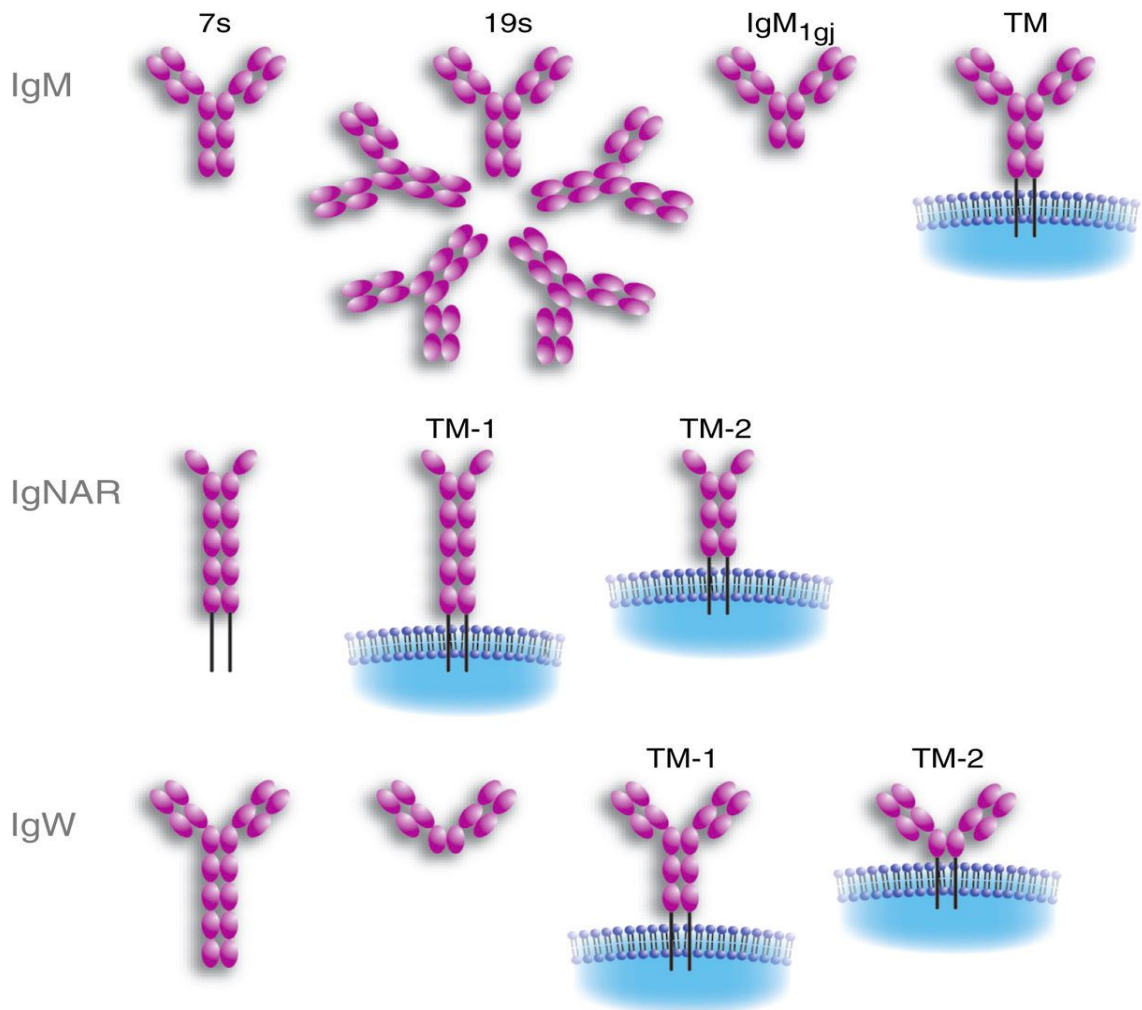


Figura 5 Estructura de las Ig de cadena pesada IgM, IgW e IgNAR en forma secretoria y transmembranal (Smith *et al.*, 2015)

Las IgNAR fueron descritas en el tiburón nodriza *Ginglymostoma cirratum* (Greenberg *et al.*, 1995). Las regiones variables de las IgNAR (VNAR) están unidas a los dominios constantes por medio de una región parecida a la bisagra de las Ig convencionales. Estructuralmente, la molécula intacta de IgNAR consiste de un dímero de dos proteínas unidas por enlaces disulfuro (Figura 6). Cada proteína cuenta con dominios de la súper familia de las inmunoglobulinas, uno variable y cinco constantes (Greenberg *et al.*, 1995; Nuttall *et al.*, 2002). El dominio variable contiene aminoácidos hidrofílicos que los hacen más solubles y sus enlaces disulfuro les dan más estabilidad (Nuttall *et al.*, 2004). Los niveles de IgNAR sérico van de 0.1 mg/mL a 1 mg/mL. Basándose en la resolución atómica estructural y el escaneo de rayos X, Feige y colaboradores (2009) fueron capaces de desarrollar un modelo estructural de molécula completa del IgNAR. Dentro de la molécula, los dominios C1 y C3 de cada cadena están involucrados en la dimerización del IgNAR. A pesar de la falta de regiones canónicas de unión, los dominios variables están suficientemente espaciados para unirse a múltiples epítopos, facilitado por el amplio ángulo de la interfase de dimerización de C1. Un pequeño ángulo entre los dominios C3, induce la formación de un tallo estrecho para la molécula IgNAR. Sin embargo, la flexibilidad del tallo es inducido por una unión disulfuro que conecta los dominios C3 y C4. Las moléculas de cadenas pesadas tienen torsión aproximadamente a la mitad de la molécula en la localización de la unión flexible, lo que causa su forma característica. Actualmente, no se sabe si alguna función efectora está mediada por la región constante del IgNAR. Es importante notar que la estructura de C5 mostrada en la Figura 4 es completamente hipotética. Esto es debido a la falta de datos estructurales en este dominio, el cual no exhibe plegamiento ni como proteína recombinante aislada, ni dentro de una construcción C4-C5 (Zielonka *et al.*, 2015).

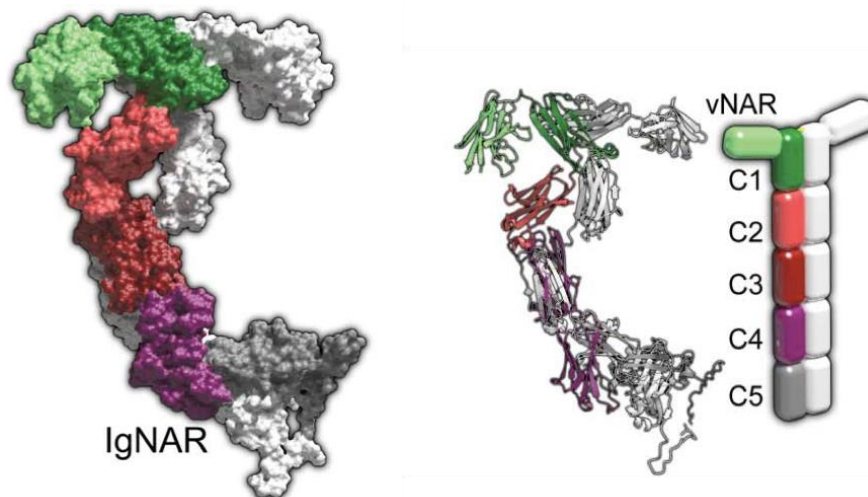


Figura 6 Estructura hipotética del IgNAR (Zielonka *et al.*, 2015)

Estos homodímeros despliegan características únicas que son responsables de la inhibición de un apareamiento con cadenas ligeras. En una interacción típica VH-VL existe una pobre conservación de residuos que media esta asociación en mamíferos. En lugar de esos aminoácidos hidrofóbicos típicos, son frecuentemente reemplazados por residuos cargados o polares. En los anticuerpos clásicos, un mecanismo especial asegura la formación de apareamientos de cadenas pesadas y ligeras. En el retículo endoplásmico la cadena pesada es atrapada por una proteína Ig-unión (BiP) vía interacción con el dominio CH1 (Feige *et al.*, 2009). Para la liberación, una cadena ligera debe desplazar a BiP y consecuentemente, sólo los anticuerpos pareados con cadenas pesadas y ligeras son secretados. Hsu y colaboradores (2006) hipotetizaron que durante la evolución, un *cluster* VNAR-D-J se combina con un *cluster* IgW, de manera que el cluster IgW pierde sus segmentos V-D-J y el primer exón C. En efecto, el dominio C1 del IgNAR es similar al dominio CH2 de IgW y pudiera derivarse de este dominio. Por lo tanto, los sitios de interacción BiP y cadena ligera no existen en el dominio C1 de IgNAR (Flajnik *et al.*, 2011).

1.1.5 VNAR

Los VNAR son dominios globulares con estructuras plegadas beta, sin embargo, comparados con los dominios variables de mamíferos, estructuralmente sólo tiene ocho láminas beta (Figura 7) en lugar de 10, debido a la escisión de la región CDR2, Framework (FW) 2 (Zielonka, 2015).

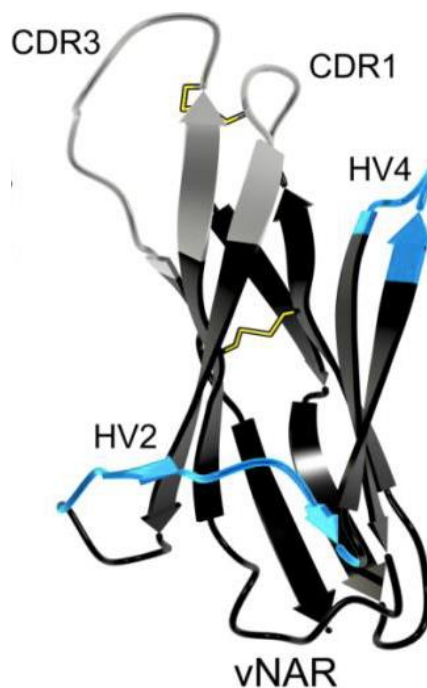


Figura 7 Representación estructural de un VNAR (Zielonka *et al.*, 2015)

Con una masa molecular de 12 kDa, los VNAR son los dominios de unión a antígenos más pequeños en el reino animal conocidos hasta la fecha (Stanfield *et al.*, 2004; Barelle *et al.*, 2009). Como consecuencia, contrario a los dominios variables de mamífero, los VNAR tienen solo dos regiones determinantes de complementariedad, CDR1 y CDR3. La diversidad del repertorio principal del VNAR se encuentra predominantemente en el CDR3. En el CDR1 se han observado grandes mutaciones somáticas después del contacto con el antígeno, en el *loop* perteneciente al CDR2 y en HV4 (Dooley *et al.*, 2006). De hecho, se han encontrado mutaciones somáticas dentro de HV4 que puede contribuir a la unión al antígeno (Stanfield *et al.*, 2007).

A pesar de tener un reducido número de posibles *loops* de unión al antígeno, comparado con los convencionales, los VNAR se unen al antígeno con sorprendente gran afinidad (Dooley *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2012). En los repertorios donde la afinidad está únicamente mediada por CDR3, las moléculas de VNAR contra un antígeno dado puede tener afinidades en el rango de picomolar (Barelle y Porter, 2015).

Los VNARs pueden ser clasificados en tres categorías principales, de acuerdo a los residuos de cisteínas no canónicas presentes en su estructura. Estas cisteínas forman enlaces disulfuro entre los CDRs y las regiones estructurales (FW). Se les llama isotipos I, II y III (Figura 4). El tipo I únicamente ha sido encontrado en el tiburón *Ginglymostoma cirratum*, y posee dos residuos de cisteínas en FWs 2 y 4, y dos cisteínas apareadas en el CDR3. El tipo II forma enlaces disulfuro intra-moleculares entre cisteínas en CDR1 y CDR3. En general este tipo de VNAR posee un CDR3 más corto que el tipo I (entre 15 y 21 residuos) (Kovaleva *et al.*, 2014). El tipo III sólo se encuentra en organismos menores de un año y presentan un residuo de triptófano conservado en el CDR1. Se menciona un dominio tipo IV, que son todos aquellos que carecen de enlaces disulfuro no canónicos (Zielonka *et al.*, 2015).

1.1.6 Factor de crecimiento endotelial vascular como proteína blanco

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus iniciales en inglés), es una familia de proteínas que regula el flujo sanguíneo, crecimiento y función en procesos fisiológicos normales y patológicos. Los procesos de vasculogénesis (formación *de novo* de vasos sanguíneos) y angiogénesis (formación de vasos sanguíneos a partir de ya preexistentes) se encuentran regulados por proteínas señalizadoras pertenecientes a la familia de factores de crecimiento, que se encuentra formada por el VEGF (o VEGF-A), VEGF-B, el factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-C y VEGF-D, así como sus

receptores VEGFR-1, -2 y -3 (Tammela *et al.*, 2005). La importancia de estos procesos recae en que son los pioneros de la formación del sistema circulatorio durante la embriogénesis en los vertebrados, para el correcto crecimiento y diferenciación de los tejidos, oxigenando y alimentando los nuevos órganos (Crivellato, 2011).

El VEGF es un mitógeno altamente específico para células endoteliales micro- y macrovasculares derivadas de arterias, venas y capilares linfáticos, sin actividad mitogénica aparente para otro tipo de células (Leung *et al.*, 1989). Pertenece a una súper familia de genes que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E (Shibuya, 2001). Sin embargo, de todos sólo el VEGF-A está relacionado con la regulación del crecimiento de vasos sanguíneos (Tabla 2).

Tabla 2 Clasificación de los factores de crecimiento endotelial vascular (modificado de Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006)

Tipo	Características		
VEGF-A	El más estudiado. Seis isoformas: 121, 145, 165, 183, 189 y 206.	Codificado por un sólo gen, con ocho exones y siete intrones.	Homodímero de 45 Da. Se une a VEGFR-1 y VEGFR-2.
VEGF-B	Dos isoformas: 167 y 186.	No es regulado por hipoxia. Estimula ligeramente la proliferación celular.	Es un ligando para VEGFR-1 y NRP-1. Se expresa en tejidos normales, principalmente miocardio.
VEGF-C	Asociado a células neuroendócrinas (NE).	Factor de permeabilidad.	Inicia como dímero pre-péptido de 61 kDa por subunidad. Madura en homodímero de 21 kDa. Se une a VEGF-3
VEGF-D	Asociado a células NE.	Mitógeno de ECs. Linfogeagénico.	Ligando para VEGFR-2 y VEGFR-3
VEGF-E		Induce la expresión del factor tisular (TF).	

El gen del VEGF, asignado al cromosoma 6p21.3 (Vicenti *et al.*, 1996), está organizado en ocho exones y separado por siete intrones, teniendo una región codificante de 14 kb aproximadamente (Ferrara, 1996). El análisis de las secuencias del cDNA de varios VEGF humanos indican que pueden existir cuatro especies moleculares diferentes, 121, 165, 189 y 206, que corresponde al número de aminoácidos que contienen (Leung *et al.*, 1989). Tischer y colaboradores (1991) clonaron y caracterizaron al gen del VEGF de células de músculo liso, encontrando que codifica para un polipéptido de 45 kDa con forma homodimérica.

El VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas. La unión a su receptor es mediada por el homodímero a través de la unión del núcleo de la proteína; la modulación de la actividad del VEGF está dada por la heparina, que resulta en una mayor eficiencia de la actividad de cinasa (Ito y Claesson-Welsh, 1999) y a carbohidratos en la superficie celular, con los dominios que se extienden a partir del núcleo del VEGF, los cuales son de distintos tamaños dependiendo de la isoforma de esta proteína (Goodsell, 2003).

El VEGF-A se empalma alternativamente para formar múltiples isoformas, divididas en dos subfamilias, que tienen funciones específicas. El *splicing* alternativo de los exones 5-7 del gen del VEGF genera formas con diferente biodisponibilidad y actividades, mientras que la selección del exón 8 genera proteínas proangiogénicas, llamados VEGF_{xxx}, o proteínas antiangiogénicas, llamadas VEGF_{xxx}b. A pesar de las isoformas del VEGF, cada una tiene una función. El VEGF-A es considerado proangiogénico y vasodilatador de la permeabilidad (Woolard *et al.*, 2009).

El VEGF responde a varios estímulos, como hipoxia/isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia (HIF-1), a distintos factores de crecimiento (EGF, TGF- α y β , KGF o factor de crecimiento derivado de queratinocitos, IGF-1 o factor de crecimiento insulínico tipo 1, FGF y PDGF), a oncogenes activados (por ejemplo Ras) así como a distintas citocinas (IL-1 y IL-6), p53 mutado, estrógeno y óxido nítrico (NO). Mediante estos estímulos, se aumenta la expresión del VEGF (Shibuya, 2001) resultando en la inducción de proliferación de células endoteliales (ECs) derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos (Ferrara *et al.*, 2003) así como la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales (Matsumoto y Claesson-Welsh, 2001).

El VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis, incrementa la conductividad hidráulica de microvasos aislados y vasodilatación, como resultado del NO derivado de ECs (Ferrara *et al.*, 2003), promueve la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis y en la linfagiogénesis (Nagy *et al.*, 2002). Cuando su regulación es normal, el VEGF contribuye al remodelamiento vascular durante el ciclo ovárico y la implantación embriónica, a la cicatrización y reparación, mientras que cuando es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis, además de participar en distintas condiciones como la psoriasis, artritis reumatoide, retinopatía diabética y diabetes mellitus (Ferrara, 2002).

El proceso de señalización que resulta de la angiogénesis se encuentra mediado por uniones de alta afinidad de los VEGFs con receptores específicos de actividad tirosina cinasa (RTKs) (Figura 8) localizados

tanto en la superficie de las ECs vasculares y en células derivadas de la médula ósea, como en forma soluble en circulación (Ferrara, 2002).

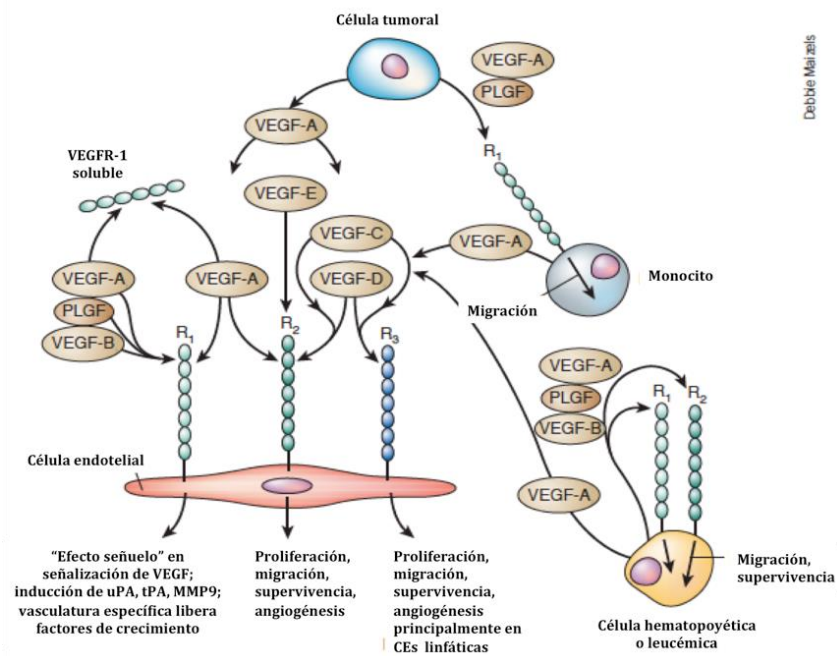


Figura 8 Isoformas del VEGF y su interacción con los receptores de VEGF (modificado de Ferrara et al., 2003).

Se ha caracterizado como un factor de crecimiento angiogénico unido a heparina, que tiene alta especificidad por células endoteliales (Ferrara y Henzel, 1989). El VEGF es también conocido como VPF o factor de permeabilidad vascular, esto basado en la habilidad de inducir permeabilidad de la piel en cobayo (Ferrara y Davis-Smith, 1997). Se encuentra codificado por un solo gen y sus isoformas son el producto de un *splicing* alternativo que forma homodímeros activos con uniones disulfuro (Leung et al., 1989).

Se considera al VEGF y a sus receptores los principales reguladores de las células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos (Carmeliet y Collen, 2000). De acuerdo con Ferrara (1996), el VEGF está íntimamente relacionado con la regulación de la angiogénesis, además existe evidencia que indica que nuevos vasos sanguíneos crecen y maduran gracias a procesos altamente complejos y coordinados, que requieren la activación de una serie de receptores por numerosos ligandos (Yancopoulos et al., 2000). En una revisión extensa hecha por Ferrara y Davis-Smyth (1997) se resalta la importancia del VEGF en la angiogénesis patológica, sobre todo su expresión en los tumores humanos.

La regulación del gen del VEGF está dada por dos factores: la tensión de oxígeno y los factores de crecimiento. Una de las respuestas se da por el factor inducible por hipoxia (HIF)-1 y el gen supresor VHL (von Hippel-Lindau), siendo este último un regulador negativo del VEGF y de los genes inducibles por hipoxia. HIF-1 está constitutivamente activado en líneas celulares de carcinoma renal (Semenza, 2002). El EGF, TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento de queratinocitos, FGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, regulan la expresión del VEGF, que de manera parácrina o autócrina liberan los factores en conjunto con la hipoxia del ambiente (Ferrara y Davis-Smyth, 1997).

Los receptores para VEGF se encuentran en la superficie de células endoteliales y células derivadas de la médula ósea, y son de tipo RTK, VEGFR-1 y VEGFR-2, y tienen siete dominios de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular, una sola región transmembranal y una secuencia consenso tirosina cinasa que está interrumpida por un dominio cinasa (Figura 8, Ferrara *et al.*, 2003).

Muchos han sido los estudios que se han llevado a cabo para demostrar la expresión del VEGF y de sus receptores en tejidos malignos y no malignos. La mayoría de esos estudios se han realizado en humanos, sin embargo, poco de esto se conoce en otras especies. No obstante, se ha visto que algunos tratamientos anti-VEGF para humanos no se unen a VEGF de origen murino (Fuh *et al.*, 2006).

1.1.7 Angiogénesis y cáncer

La angiogénesis es el proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Este proceso está formado por la migración y la proliferación de células endoteliales, la formación de estructuras tubulares que madurarán y darán paso a vasos sanguíneos estables (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006).

Existen distintos procesos relacionados que implican el crecimiento endotelial vascular, como lo es la linfangiogénesis (formación de nuevos vasos linfáticos), la arteriogénesis (formación de nuevas arterias) y la vasculogénesis (formación *de novo* de vasos sanguíneos en el embrión) (Dvorak, 2005). Los capilares son necesarios en todos los tejidos para el intercambio de nutrientes y metabolitos, el oxígeno juega un papel fundamental. El reciente interés en este tema ha sido el resultado de su uso como terapia contra el cáncer; su disminución o inhibición puede ser utilizado como tratamiento para cáncer, condiciones oftálmicas, artritis reumatoide, entre otras enfermedades (Adair y Montani, 2010).

La angiogénesis es necesaria para el crecimiento de tumores invasivos y metástasis, y constituye un punto importante en el control de la progresión del cáncer. Su inhibición puede ser valiosa en las investigaciones de terapia de cáncer. Los tumores no vasculares son severamente restringidos en su potencial de crecimiento debido a la falta de suministro de sangre. Frecuentemente, los tumores sobreexpresan los factores pro-angiogénicos, como el VEGF, permitiéndoles hacer el cambio angiogénico (Folkman, 2002).

Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor sólido, entrar en un vaso sanguíneo, y trasladarse a un sitio distante, donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis (Figura 9). El crecimiento subsecuente de estas metástasis también requerirá una fuente de alimentos y de oxígeno (Folkman y Klagsbrun, 1987).

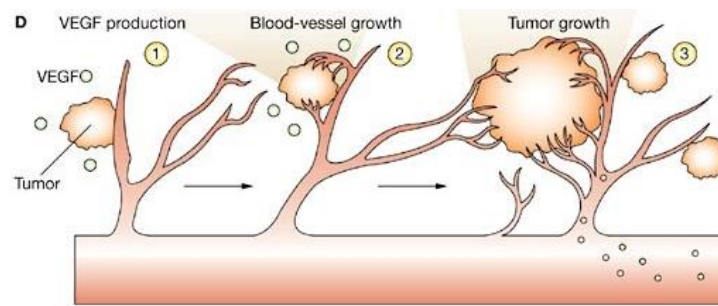


Figura 9 Proceso de neovascularización tumoral que involucra la liberación de factores pro-angiogénicos por células tumorales (como el VEGF) causando el crecimiento de vasos sanguíneos y posterior metástasis (Spannuth et. al., 2008).

Teniendo en cuenta que el oxígeno debe ser distribuido por la sangre a todas las células del cuerpo de un organismo, es necesario que las células estén localizadas entre 100 a 200 μm de un vaso sanguíneo para poder sobrevivir, por lo que es necesario promover la angiogénesis y así formar su propia fuente sanguínea (Zetter, 1998).

La angiogénesis, a través de las vías de señalización del VEGF y sus receptores, tienen un papel muy importante en las estrategias terapéuticas cuyo blanco son estas vías de señalización, con el fin de inhibir la angiogénesis. De hecho, esta misma estrategia puede ser utilizada en animales de compañía, pues se ha

visto que en carcinomas mamarios caninos, se incrementa la expresión del VEGF, así también se ha visto que la densidad de los capilares es mayor en seminomas en perros (Restucci *et al.*, 2003).

En la actualidad, existen muchos estudios relacionados con la síntesis de fármacos que bloquean al VEGF y sus receptores en patologías como el cáncer, que están enfocados a detener la proliferación celular y mejorar la supervivencia del paciente. En animales de compañía recientemente se ha incrementado la investigación en este campo.

1.1.8 Tratamientos anti-angiogénicos

Los VEGF y sus receptores, juegan un papel fundamental en distintas condiciones de cáncer y metástasis, por lo que su inactivación, resulta conveniente como estrategia anti-angiogénica en el cáncer. En el año 2004, se aprobaron los siguientes compuestos inhibidores del VEGF: avastin (bevacizumab), que es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra el VEGF-A₁₆₅, así como pegaptinib, un aptámero que bloquea al mismo factor y ranibizumab, que es un fragmento molecular de un anticuerpo monoclonal Fab que neutraliza a todas las isoformas del VEGF (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006).

De acuerdo a la FDA, Bevacizumab es el primer inhibidor de la angiogénesis que ha demostrado atrasar el crecimiento de tumores, así como alargar la vida de pacientes con algunos tipos de cáncer. También se han aprobado otros fármacos con actividad antiangiogénica, como sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®), pazopanib (Votrient®) y everolimus (Afinitor®), todos ellos para uso humano (Figura 10, www.angio.org). De hecho, existen cerca de 13 fármacos anti-cancerígenos con propiedades antiangiogénicas, cuyo objetivo es la interrupción de las vías de señalización involucradas en la angiogénesis tumoral y de crecimiento.

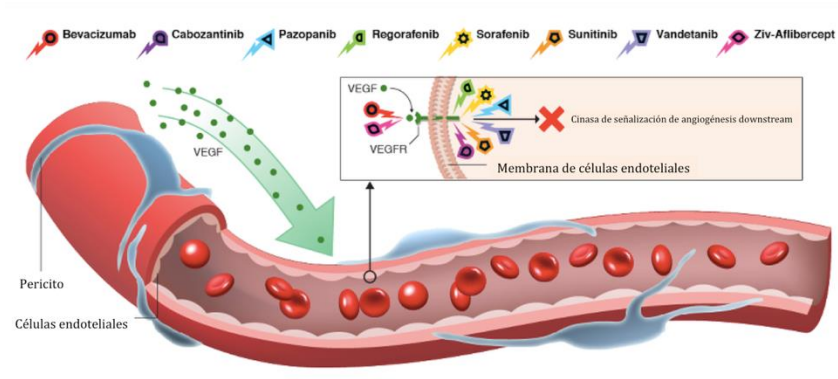


Figura 10 Principales terapias anti-cancerígenas con propiedades anti-angiogénicas aprobadas en Estados Unidos (modificado de www.angio.org).

1.2 Justificación

Los anticuerpos como moléculas terapéuticas y de diagnóstico han cobrado relevancia por su alta efectividad. Los IgNAR, en específico sus dominios variables (VNAR), han presentado características favorables de estabilidad y eficiencia de unión en un tamaño muy pequeño. El análisis *in silico* es una técnica que permite modificar la afinidad de una proteína, cambiando aminoácidos específicos para aumentar su interacción con el antígeno. Actualmente los tratamientos utilizados en el combate de esta enfermedad incluyen radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estos actúan de manera inespecífica sobre todas las células, resultando tóxicas para las células sanas. Una alternativa de co-tratamiento es el uso de VNAR anti-VEGF₁₆₅ que auxiliaría en la neutralización de la citocina VEGF₁₆₅ en células tumorales, suprimiendo su crecimiento, haciéndolas candidatas a una extirpación quirúrgica. A partir de un VNAR anti-VEGF₁₆₅ humano, se realizaron modificaciones *in silico* para obtener VNARs más eficientes y utilizarlos como co-tratamiento en la angiogénesis tumoral.

1.3 Hipótesis

Las modificaciones *in silico* de un VNAR pueden aumentar o disminuir la capacidad de reconocimiento y neutralización de su molécula blanco, el VEGF₁₆₅.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar los efectos anti-angiogénicos de las modificaciones *in silico* de un VNAR anti-VEGF₁₆₅ como tratamiento de cáncer.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar qué cambio de aminoácidos podrían incrementar o disminuir la afinidad de un VNAR anti-VEGF₁₆₅ con base en un modelado *in silico*.
- Obtener las proteínas diseñadas *in silico* previa clonación y expresión de los genes codificantes del modelado computacional.
- Determinar la capacidad neutralizante contra el VEGF por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 2 Metodología

2.1 Antecedentes

2.1.1 Origen del VNAR

Se tomó como base un gen VNAR anti-VEGF denominado V13, el cual fue producido en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Departamento de Innovación Biomédica del Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. por Camacho-Villegas (2007). De manera general, se trata del producto de inmunizaciones de un tiburón *Heterodontus francisci*, con la citocina humana VEGF (Peprotech) durante tres meses por vía intravenosa. Cumplido ese tiempo, obtuvieron el bazo para la extracción del ARN y su posterior retrotranscripción y amplificación por la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

2.1.2 Generación de mutantes dirigidas contra el VEGF

El análisis de la unión del VNAR V13 con el VEGF₁₆₅ para la generación de mutantes fue realizado por la empresa Teraclón. El objetivo fue analizar la unión del V13 optimizado con el VEGF. Particularmente, el estudio pretendió determinar las estructuras tridimensionales del V13 optimizado por medio del modelado en simulaciones dinámicas. La estructura cristalográfica del VEGF utilizada ya se encuentra publicada (Muller *et al.*, 1997). Una vez teniendo ambas estructuras, se obtuvo la interacción del complejo proteína-proteína (*docking*) para encontrar zonas de unión y orientaciones, con mejor energía que la haga más estable. Para lograr este último punto, se establecieron tres filtros:

- Agrupación de complejos.
- Análisis energético de los mejores complejos.
- Dinámica molecular de los tres complejos proteína-proteína con mejor energía para uniones más estables.

Se utilizó un control de interacción utilizando un IgNAR con la proteína AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) de *Plasmodium falciparum*, (código PDB: 2Z8V) para así obtener la energía libre de unión que fue referencia para las demás interacciones.

Los resultados de este estudio se encuentran en el Anexo I.

2.2 Obtención del plásmido pComb3x

Se trabajó a partir del plásmido pComb3x que tenía unido un fragmento de relleno (*stuffer*). Para llevar a cabo la purificación del plásmido se utilizó el kit comercial QIAGEN Miniprep Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante y a partir de un cultivo de las células que lo contienen.

2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar el plásmido purificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE. Se cargaron 5 µL de la muestra obtenida por pozo y se corrió a 80 volts y 500 mA durante 1 h en buffer TBE 1X.

2.4 Amplificación de las secuencias mutantes de VNAR por PCR

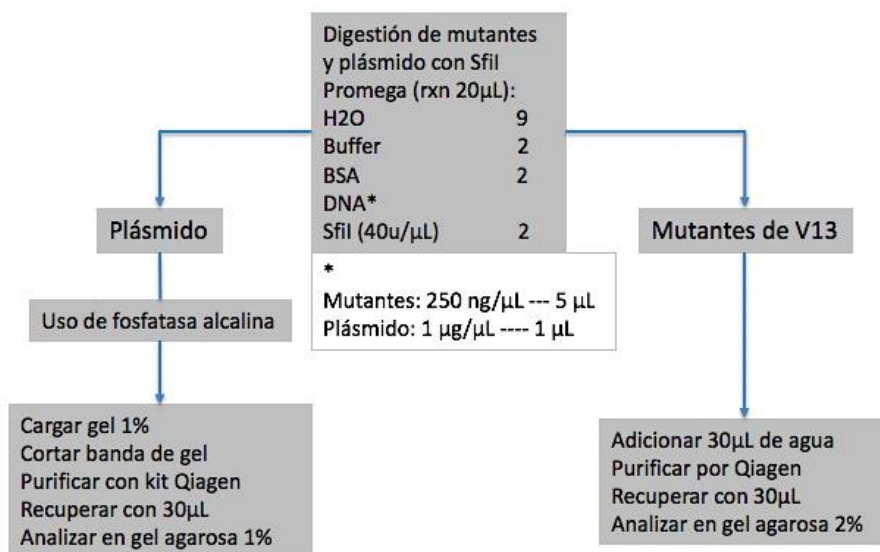
Las secuencias de cada VNAR mutante fueron sintetizadas por la empresa IDT© (Integrated DNA Technologies, Inc.). El formato elegido fue gBlocks® Gene Fragments. Cada uno de los genes mutantes fueron amplificados mediante la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos que tienen insertados sitios de restricción para la enzima SfiI. Las condiciones de PCR para la amplificación de los genes mutantes se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3 Condiciones de PCR para amplificación.

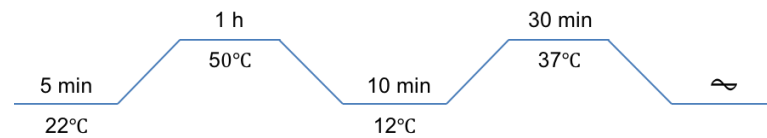
Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
1	95	5
30	95	1
	56	1
	72	1
1	72	7

2.5 Digestión enzimática de los VNAR y vectores

La digestión tanto de los genes mutantes como del plásmido pComb3x se llevó a cabo empleando la enzima Sfil HC (40 u/μl; Promega), siguiendo el procedimiento de la Figura 11.

**Figura 11** Proceso de digestión del plásmido y las mutantes.

La digestión se llevó a cabo aplicando las siguientes condiciones en un termociclador.



2.6 Purificación de los productos de digestión

Una vez concluida la digestión, tanto del plásmido como de cada gen mutante de VNAR, fueron purificados como se especifica a continuación. Para el plásmido pComb3x, se llevó a cabo una electroforesis en un gel preparativo al 0.8% de agarosa. La banda correspondiente al plásmido fue cortada y purificada con el kit QiAquick® Spin Gel Extraction (Qiagen®). Para los productos de la amplificación por PCR de los genes mutantes se limpiaron empleando el kit QiAquick® PCR Purification (Qiagen®). Ambos procedimientos fueron seguidos según las especificaciones del fabricante y eluidos con agua destilada.

2.7 Ligación

A partir del vector y los VNAR obtenidos en el apartado 2.3.4, se procedió a su ligación utilizando la enzima T4 Ligasa (Promega). La relación de concentración utilizada para esta reacción fue de 1:7 vector y VNARs, respectivamente. La reacción fue de 4 h a 16°C, siguiendo el procedimiento sugerido por la compañía.

2.8 Preparación de células competentes

Para la transformación de las células se utilizó la cepa *E. coli* ER2738 quimiocompetente. Se prepararon utilizando un cultivo *overnight* de 2 mL de medio SB con tetraciclina (12 µg/mL) y 20 µL de cultivo ER2738. Posteriormente, se puso un cultivo joven con 3 mL de medio SB y 30 µL del *overnight* por dos horas a 37°C y 300 rpm. Al término de ese tiempo, se tomó 1 mL y, en condiciones estériles, se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 500

μL de agua destilada estéril. Se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 500 μL de CaCl_2 500 mM estéril, incubando 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 100 μL de CaCl_2 500 mM y se incubó 5 minutos más en hielo.

2.9 Transformación de *E. coli*

Se adicionaron 2 μL de la ligación y se incubó por 30 minutos en hielo, para después hacer un choque térmico a 42°C por 90 segundos y dejar reposando 5 minutos en hielo. Al término de ese tiempo, se adicionó 1 mL de medio SOC y se incubó por una hora a 37°C. Posteriormente, se sembraron 50, 100 y 200 μL en medio sólido LB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De las colonias crecidas, se seleccionaron siete al azar y se hicieron cultivos de colonia, tomando una colonia seleccionada y poniéndola en medio SB líquido con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), hasta tener un crecimiento visible.

2.10 PCR de colonia

Los cultivos fueron utilizados para realizar PCR usando los oligonucleótidos Omseq y gback, específicos para el vector pComb3x. Las condiciones utilizadas para PCR fueron las mencionadas en la Tabla 3. Los productos de PCR se evaluaron en un gel de agarosa al 2%. De los resultados positivos, se tomó una colonia y los plásmidos se purificaron mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) como se describe a continuación.

A partir de una colonia de *E. coli* transformada con el plásmido pComb3x, se inició un cultivo en 10 mL de medio LB-LS suplementado con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37°C, 300 rpm durante 12 horas. Se tomaron 3 mL del cultivo y se centrifugaron durante 5 min, a 13000 rpm y temperatura ambiente (TA). Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 200 μL de solución 1 GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) adicionado con 4 μL de RNasa A (0.2 mg/mL). Se mezcló subiendo y bajando el volumen con la micropipeta. Posteriormente se agregaron 150 μL de solución 2 (NaOH 0.2 N y SDS 1% en proporción 1:1). Se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente y 5 minutos en hielo. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de solución fría de

KOAc 3M pH 4.8, se mezcló por inversión y se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó 15 min, a 13000 rpm y TA. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le adicionaron 800 μ L de etanol frío al 100%, se mezcló e incubó a -20°C durante 30 min. Se centrifugó por 15 min a 13000 rpm y TA, se eliminó el sobrenadante, se adicionó al botón celular 1 mL de etanol 70 % y se centrifugó 15 min a 13000 rpm y TA. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar el botón celular a temperatura ambiente. Una vez seco, el botón celular se resuspendió con 50 μ L de agua destilada estéril. Se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop y posteriormente fue almacenado a -20°C hasta su uso.

2.11 Secuenciación

Se obtuvo la secuencia para verificar que el inserto fuera correcto (SeqxCel[®], San Diego). El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el programa CLC Sequence Viewer 7.

2.12 Expresión de las proteínas

A partir de las secuencias correctas ya confirmadas, se procedió a transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) y NEB Express de acuerdo con el apartado 5.9, 5.10 y 5.11. Para poder discernir entre el uso de una cepa u otra, se hizo una expresión de proteínas a pequeña escala. Ya elegida la cepa de mejor expresión, se partió de 500 mL de medio SB con carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que fueron inoculados con 5 mL del cultivo *overnight* de cada una de las mutantes clonadas correctamente en *E. coli*. Se dejó crecer hasta una densidad óptica (O.D. de 0.6 a 600nm. Esto ocurrió aproximadamente a las tres horas de incubación a 37°C y 300 rpm. Una vez alcanzada la D.O. se indujo con IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1 mM (concentración final). El tiempo de inducción fue de cinco horas, al término del cual, se centrifugó el medio a 4000 xg por 15 minutos, obteniendo el pellet y congelando hasta su posterior uso.

2.13 Extracción periplásmica

Para la obtención de la proteína, se utilizó el método de extracción periplásmica, el cual consiste en resuspender el pellet en una solución de Tris-HCl (30 mM), glucosa (20%) y EDTA (1 mM) a pH 8 y agitar en hielo por 10 minutos. Posteriormente, se centrifuga a 8000 xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado para su análisis. El pellet fue resuspendido con 10 mL de MgSO₄ 5 Mm y se dejó agitando en hielo por 20 minutos. Finalmente, se centrifugó 8000 xg por 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante (el cual contiene las proteínas periplásmicas).

2.14 Purificación de proteínas

Los extractos periplásmicos se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metales empleando la resina Ni-NTA (Quiagen®) siguiendo las condiciones previamente estandarizadas (Martínez-Olivares, 2014). Esta técnica posee afinidad por la secuencia de histidinas que presenta la proteína VNAR.

En una columna de plástico con 15 ml de capacidad, se agregó 1 ml de resina Ni-NTA y se dejó sedimentar por gravedad. Una vez que se descartó el sobrenadante, la resina se lavó con 3 ml de PBS 1X y se equilibró con 20 ml de buffer de lavado 1 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 20 mM, pH 8). Posteriormente, la columna fue transferida a un cuarto frío (4°C) donde mediante gravedad se pasó tres veces el extracto periplásmico. Se procedió a el lavado de la columna con 15 ml de buffer de lavado 1 y posteriormente un segundo lavado de 10 mL con buffer de lavado 2 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 50 mM, pH 8). Se realizaron cinco eluciones de la proteína con buffer de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 250 mM, pH 8.0) en cinco fracciones de 0.5 ml cada uno (se dejó reposar 5 minutos entre elución). Finalmente la columna se lavó con 20 ml de buffer de lavado y se almacenó a 4°C con etanol al 20%. Todas las muestras obtenidas fueron guardadas a -20°C hasta su posterior análisis.

2.14.1 Diálisis

Los productos de las eluciones fueron dializadas contra PBS 1X en una membrana tubular Snake Skin Dialysis Tubing, 3500 MWCO (Thermo Scientific™). Las muestras se dializaron en una relación de volumen

1:300 (muestra:PBS 1X). Se colocaron en un agitador magnético por 2 horas a temperatura ambiente, después se realizó un recambio de PBS 1X, la membrana nuevamente se colocó en el agitador magnético por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizó un último recambio de PBS 1X y se colocó en el agitador magnético toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la muestra se colectó y almacenó a -20°C hasta su empleo posterior.

2.14.2 Concentración de proteínas

Las eluciones dializadas se concentraron utilizando filtros para centrifuga Corning® Spin-X UF de 10,000 MWCO. Se centrifugaron en un rotor de columpio a 4,400 xg durante 5 minutos, el tiempo varió en función del volumen de la muestra y la concentración de la proteína inicial.

2.14.3 Purificación por FPLC

Para poder obtener un perfil de elución de las proteínas, se utilizó el método de FPLC (fast protein liquid chromatography). La columna que se utilizó fue His Trap FF 5x5 mL, precargada con sefarosa de níquel de flujo rápido (GE HealthCare). Para ello, los extractos fueron previamente concentrados por medio de ultrafiltración, utilizando una membrana de 10 kD. Se pasó de un volumen de 500 mL de cada extracto a 15 mL ya concentrado. Cada concentrado fue dializado utilizando una membrana tubular Snake Skin Dialysis Tubing, 3500 MWCO (Thermo Scientific™). Las muestras se dializaron contra buffer de equilibrio (buffer A, Tabla 5) a 4°C y haciendo dos recambios las primeras dos horas y posteriormente dejando en agitación *overnight*. Una vez listas las muestras, se inyectaron en FPLC, a un flujo de 5 mL/min. Las soluciones para crear el gradiente se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Soluciones utilizadas en el FPLC.

Buffer	Imidazol	NaH ₂ PO ₄	NaCl	pH
A	10 mM	50 mM	300 mM	8
B	500 mM	50 mM	300 mM	8
EDTA	NaH ₂ PO ₄ (20 mM), NaCl (0.5 M), EDTA (0.5 M)			8
Solución Ni	NiSO ₄ (0.1 M)			

2.14.4 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se hizo por medio del espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. El blanco utilizado fue PBS 1X.

2.15 Análisis de la expresión

2.15.1 Preparación de la muestra

La preparación de las muestras para ser evaluadas en gel SDS-PAGE y Western blot, fueron procesadas de la siguiente manera. Se tomaron 2 muestras de 1 mL de los lavados en cada paso de la purificación, del sobrenadante sin purificar y del sobrenadante purificado. A cada 1 mL se le agregaron 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA 100%) para sedimentar las proteínas totales. Se incubaron 16 horas a -20°C. Posteriormente, se centrifugó 25 minutos a 4°C y 13,000 rpm. El sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó con 1 mL de acetona fría. Se centrifugó nuevamente por 25 minutos a 4°C y 13,000 rpm. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 μ L de buffer de carga SDS-PAGE 2X. Las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos.

Para las muestras de eluciones se tomaron 15 μ L de cada elución, se mezclaron con 15 μ L de buffer de carga 2X (SDS 4%, glicerol 20%, Tris-HCl 125 mM (pH 6.8), azul de bromofenol 0.05%, 2-mercaptoetanol 10%). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos momentos antes de ser cargadas en los carriles del gel.

2.15.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook y Russell (2001). Las condiciones de corrida fueron 50 mA con un voltaje constante de 150 Volts, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Los geles se tiñeron con solución de tinción (Coomassie brilliant blue R-250 0.1%, metanol 50%, ácido acético glacial 10%) toda la noche a temperatura

ambiente y agitación constante. El gel se destiñó con solución de desteñido (etanol 40%, ácido acético 10%) hasta obtener el contraste deseado.

2.15.3 Western blot

Los geles de poliacrilamida al 12% se transfirieron mediante electrotransferencia semiseca con el sistema Semi-Dry Electrobloetter (CLP) a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot® Transfer medium 0.45 µm (BioRad). Se utilizó buffer de transferencia semiseca (tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3) para humedecer por 10 minutos 6 papeles filtro, el gel de poliacrilamida al 12% y la membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó por 1 hora a 200 mA constantes y un voltaje de 20 Volts. La membrana se incubó 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante en solución de bloqueo (leche 5% en TBST). Se descartó la solución y se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Se agregó el anticuerpo anti-HA (Roche) diluido 1:1000 en TBST (leche al 3%). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se hicieron tres lavados de 10 minutos con TBST. Para el revelado por colorimetría se utilizó el kit DAB Substrate (Thermo Scientific™), se siguieron las recomendaciones del fabricante. Para el revelado por quimioluminiscencia se utilizó el kit Pierce™ Western Blot Signal Enhancer.

2.15.4 ELISA de expresión

Por triplicado, se pusieron 50 µL de cada sobrenadante crudo (obtenido en la extracción periplásmica de la proteína) en cada pozo de una placa de ELISA y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente, se descartó la solución y se bloquearon los pozos con 150 µL de BSA (albúmina de suero bovino) 3%-PBS 1X incubando 1 hora a 37°C. Se lavaron los pozos con Tween 0.05%-PBS 1X tres veces. Se agregaron 50 µL de anticuerpo anti-HA (ROCHE) diluido 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X, y se incubó 1 hora a 37°C. Se lavó tres veces con Tween 0.05%- PBS 1X y se añadieron 50 µL de sustrato para peroxidasa (ABTS 20 mg/mL, buffer de citratos 1X, H₂O₂ 0.3%). La placa fue leída después de 20 minutos a 405 nm en un lector de ELISA.

2.16 Reconocimiento del VEGF por las mutantes VNAR

Se inmovilizaron 50 μ L de VEGF de una alícuota de 5 μ g/mL en una placa de ELISA por triplicado, quedando 250 ng por pozo para cada clona. Se incubó 1 hora a 37°C. Se descartó el antígeno y se bloqueó la placa con 150 μ L de BSA 3% en PBS 1X, incubando 1 hora a 37°C. Se lavaron los pozos con Tween 0.05%-PBS 1X tres veces. Se agregaron 250 ng de cada proteína en 50 μ L de PBS y se incubó 1 hora a 37°C. Se decantó y lavó tres veces. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo anti-HA (ROCHE) diluido 1:1000 en BSA 1%-PBS 1X y se incubó 1 hora a 37°C. Se lavó tres veces y se añadieron 100 μ L de sustrato para peroxidasa (TMB). Se incubó 15 min y se adicionó 100 μ L de ácido sulfúrico. Se leyó la absorbancia a 450 nm.

2.17 Producción masiva de anticuerpos

La producción de los VNAR a mayor escala fue llevada a cabo por la compañía PROALT. El objetivo fue obtener mayor cantidad de proteínas para trabajar en los ensayos posteriores. Las secuencias fueron optimizadas para lograr una expresión óptima en BL21(DE3) utilizando el vector de expresión pET-28a (+) de Novagen.

2.17.1 Pruebas de expresión a dos temperaturas diferentes

Las pruebas de expresión se realizaron en cultivos de 50 mL y utilizando dos temperaturas diferentes, 30°C y 37°C, durante 18 y 4 horas, respectivamente. La inducción se realizó con 0.8 mM de IPTG. Una vez cumplidos los tiempos, las células se cosecharon y se analizó la expresión de las cinco mutantes en gel de Coomassie y western blot. Se probaron diferentes fracciones de cada proteína expresada: extracto total, fracción soluble (obtenida por lisis celular) y el control sin inducir.

2.17.2 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC)

La purificación de los VNAR obtenidos se llevó a cabo tomando en cuenta la fracción soluble (citoplasmática) y la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) utilizando cromatografía en condiciones desnaturizantes y replegamiento posterior en columna (*on-column refolding*) de la proteína.

2.17.3 Cuantificación de las proteínas

La concentración de proteína se determinó por densitometría de bandas de geles teñidos con Coomassie. Se tomaron imágenes de los geles por medio de la digitalización con un escáner Epson Perfection 3490 Photo. Para el calibrado densitométrico se utilizó una preparación de VNAR estándar (Genway) a 1mg/ml. La densitometría se realizó con el software Image J.

2.17.4 Estudio de estabilidad térmica

Se prepararon diferentes alícuotas de la preparación de cada VNAR y se conservaron a diferentes temperaturas durante una semana para estudiar su estabilidad térmica a corto plazo. Las temperaturas estudiadas fueron: RT, 4°C, -20°C y -80°C. La congelación a -20°C y a -80°C fue rápida y se realizó en un baño etanol-hielo seco. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se sometieron a centrifugación para descartar los agregados producidos en ese tiempo. Las muestras a -20°C y a -80°C se descongelaron en hielo antes de la centrifugación. Se analizaron volúmenes idénticos de estas muestras por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 15% PAGE-SDS. Posterior a la tinción con azul de Coomassie, se analizó la pérdida de proteína soluble por la formación de agregados en las distintas temperaturas de incubación. El western blot sirvió como análisis de identidad/integridad, para confirmar que estos anticuerpos contienen el tag de histidinas. La membrana se incubó secuencialmente con un anticuerpo anti-His y con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa.

2.18 Ensayo de proliferación de células HUVEC

Se evaluó el efecto de la presencia del VEGF en el medio de cultivo en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, ATCC® PCS-100-010™). Se utilizó el kit VEGF para crecimiento de células endoteliales (ATCC® PCS-100-041), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se formularon los medios para la evaluación de la proliferación (tabla 5).

Tabla 5 Composición de los medios de cultivo utilizados.

Componente	Medio Completo	Medio Incompleto 1	Medio Incompleto 2	Medio Incompleto 3	Medio Incompleto 4
VEGF	+	+	-	+	-
EGF	+	-	-	-	-
FGF	+	-	-	-	-
IGF	+	-	-	-	-
L-glutamina	+	+	+	+	+
Heparina sulfato	+	+	+	+	+
Hemisuccinato de hidrocortisona	+	-	-	-	-
Suero fetal bovino	+	+	+	-	-
Ácido ascórbico	+	+	+	+	+
Antibióticos	+	+	+	+	+
Medio Basal	+	+	+	+	+

Las células HUVEC se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro, en medio completo y utilizando células en fase 4. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de 24 horas, se observaron al microscopio para determinar el porcentaje de confluencia. Se removió el medio de cultivo y se cambió por medio fresco. Se incubó con las mismas condiciones hasta que se alcanzó una confluencia del 80%. Se aspiró cuidadosamente el medio de cultivo de la placa, cuidando de no remover la monocapa celular. Se lavó dos veces con PBS 1X y posteriormente, se adicionaron 2 mL de Tripsina-EDTA hasta que todas las células se despegaron. Se adiciona la misma cantidad de solución neutralizante y se transfiere toda la solución celular a un tubo de 15 mL. Se estimó el número de células utilizando azul tripano 0.4% en una cámara de Neubauer. Posteriormente, se usaron tres placas de 96 pozos, en las cuales se sembraron 5,000 células

HUVEC por pozo en medio completo. Se incubaron con 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas. Al cabo de ese tiempo, se cambió el medio de cultivo de dos placas por los medios incompletos (Figura 12) e incubadas con las mismas condiciones. Una placa fue revelada utilizando 20 µL por pozo del reactivo MTS (PROMEGA), tomándose como tiempo 0. Las placas con cambio de medio se revelaron a las siguientes 48 y 96 horas con el mismo reactivo. Como control negativo se revelaron pozos con PBS 1X. Las placas se leyeron a 490 nm.

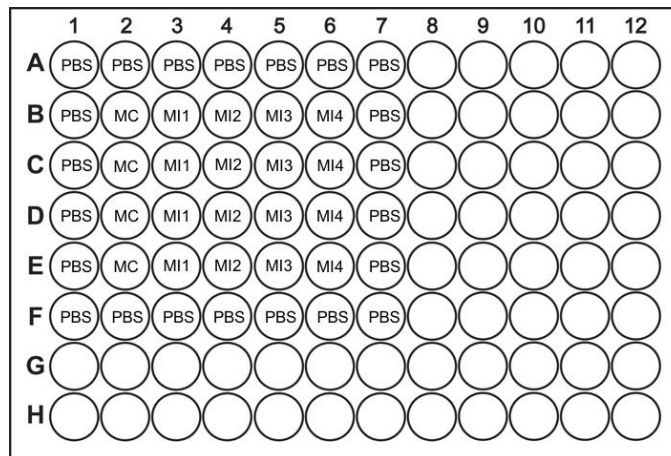


Figura 12 Disposición en placa de 96 pozos para ensayo de proliferación de células HUVEC.

2.19 Ensayo de angiogénesis

Como parte del kit para evaluación de la angiogénesis (Essen Bioscience, 4452), se realizó un co-cultivo de células NHDF (fibroblastos dérmicos humanos) y células HUVEC marcadas con GFP (proteína verde fluorescente) en placas de 96 pozos. El kit está complementado con el medio de cultivo de siembra, medio de crecimiento y el medio de ensayo.

Se llevó a cabo la siembra del co-cultivo, descongelando los viales de ambas células y siendo suspendidas en 12 mL de medio de siembra. Cada pozo fue sembrado con 100 µL de la suspensión celular y posteriormente incubada a temperatura ambiente por una hora. Para marcar un tiempo cero, se adicionó el InuCyte ZOOM y se escaneó. Después de 24 h, el medio de cultivo fue reemplazado con 150 µL del medio de crecimiento.

A partir del día 2 y en los días 5, 7 y 9 se adicionó el VEGF al medio de cultivo a una concentración final de 4 ng/mL. Las proteínas VNAR se prepararon en stock con una concentración inicial de 150 µg/mL, a partir de eso se hicieron diluciones seriadas dando una concentración final de 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7, 2.3, 1.2 µg/mL. Las cinéticas de formación de tubos (derivados del proceso de angiogénesis) se realizaron en presencia de diferentes concentraciones de VNARs (Tabla 6).

Tabla 6 Esquema experimental de la placa para la evaluación de los VNAR en angiogénesis.

Sin tratamiento		VEGF 4 ng/mL		VEGF 4 ng/mL + Suramina 100 µM	
L99K 150 µg/mL +VEGF	L99K 75 µg/mL +VEGF	L99K 37.5 µg/mL +VEGF	L99K 18.8 µg/mL +VEGF	L99K 9.4 µg/mL +VEGF	L99K 4.7 µg/mL +VEGF
L99K 9.4 µg/mL +VEGF	L99K 4.7 µg/mL +VEGF	L99K 2.3 µg/mL +VEGF	L99K 1.2 µg/mL +VEGF	V13 100 µg/mL +VEGF	V13 75 µg/mL +VEGF
V13 100 µg/mL +VEGF	V13 75 µg/mL +VEGF	V13 37.5 µg/mL +VEGF	V13 18.8 µg/mL +VEGF	V13 9.4 µg/mL +VEGF	V13 4.7 µg/mL +VEGF
V13 9.4 µg/mL +VEGF	V13 4.7 µg/mL +VEGF	V13 2.3 µg/mL +VEGF	V13 1.2 µg/mL +VEGF	R90A 100 µg/mL +VEGF	R90A 75 µg/mL +VEGF
R90A 100 µg/mL +VEGF	R90A 75 µg/mL +VEGF	R90A 37.5 µg/mL +VEGF	R90A 18.8 µg/mL +VEGF	R90A 9.4 µg/mL +VEGF	R90A 4.7 µg/mL +VEGF
R90A 9.4 µg/mL +VEGF	R90A 4.7 µg/mL +VEGF	R90A 2.3 µg/mL +VEGF	R90A 1.2 µg/mL +VEGF		
Sin tratamiento		VEGF 4 ng/mL		VEGF 4 ng/mL + Suramina 100 µM	

Sin tratamiento		VEGF 4 ng/mL		VEGF 4 ng/mL + Suramina 100 µM	
R97A 100 µg/mL +VEGF	R97A 75 µg/mL +VEGF	R97A 37.5 µg/mL +VEGF	R97A 18.8 µg/mL +VEGF	R97A 9.4 µg/mL +VEGF	R97A 4.7 µg/mL +VEGF
R97A 9.4 µg/mL +VEGF	R97A 4.7 µg/mL +VEGF	R97A 2.3 µg/mL +VEGF	R97A 1.2 µg/mL +VEGF	P98Y 100 µg/mL +VEGF	P98Y 75 µg/mL +VEGF
P98Y 100 µg/mL +VEGF	P98Y 75 µg/mL +VEGF	P98Y 37.5 µg/mL +VEGF	P98Y 18.8 µg/mL +VEGF	P98Y 9.4 µg/mL +VEGF	P98Y 4.7 µg/mL +VEGF
P98Y 9.4 µg/mL +VEGF	P98Y 4.7 µg/mL +VEGF	P98Y 2.3 µg/mL +VEGF	P98Y 1.2 µg/mL +VEGF	P98Y-L99K 100 µg/mL +VEGF	P98Y-L99K 75 µg/mL +VEGF
P98Y-L99K 100 µg/mL +VEGF	P98Y-L99K 75 µg/mL +VEGF	P98Y-L99K 37.5 µg/mL +VEGF	P98Y-L99K 18.8 µg/mL +VEGF	R90A 9.4 µg/mL +VEGF	R90A 4.7 µg/mL +VEGF
R90A 9.4 µg/mL +VEGF	R90A 4.7 µg/mL +VEGF	R90A 2.3 µg/mL +VEGF	R90A 1.2 µg/mL +VEGF		
Sin tratamiento		VEGF 4 ng/mL		VEGF 4 ng/mL + Suramina 100 µM	

Se hicieron tres controles, medio sin VEGF, medio con VEGF, medio con VEGF y suramina 100 µM. Los mismos días (2, 5, 7 y 9) se adicionaron el VEGF y los VNAR. Cada 12 horas se escanearon las placas para obtener las imágenes del crecimiento.

2.20 Evaluación del efecto de los VNAR *in vivo*

Para evaluar la eficacia de los VNARs como inhibidores de la angiogénesis, la compañía AntiCancer Incorporated llevó a cabo experimentos que permitieron observar *in vivo* la acción de cada VNAR en un modelo de ratón transgénico. Este modelo se utiliza para la visualización de angiogénesis tumoral y son ratones desnudos ND-GFP (nestin-driven green fluorescent protein), lo cual permite que sea visible el crecimiento de vasos sanguíneos (Amoh *et al.*, 2005). El ND-GFP son proteínas que se expresan en las células endoteliales y los vasos sanguíneos nacientes, dando dos colores fluorescentes, y es posible comprobarlo con inmunohistoquímica con el antígeno CD31.

Los ratones contaban con seis semanas de vida, a partir de la cual fueron inoculados con células de cáncer de pulmón de Lewis (5×10^5 células en 25 μL). La implantación se hizo bajo la técnica de implantación de células de tumor *footpad* para cada uno de los ratones y se dejó crecer por 3 días. Se hicieron grupos de 8 ratones para evaluar cada VNAR. Posteriormente, se inició el tratamiento con cada uno de los VNARs en cada grupo de ratones. El objetivo fue crecer un tumor en los ratones y aplicar el tratamiento. El tratamiento consistió en seis dosis 180 μL de una solución de 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS de cada VNAR, dos dosis por semana. El grupo control se evaluó inyectando solo PBS. Los días 4, 11 y 18 se tomaron imágenes correspondientes a la angiogénesis y se calculó la densidad del largo total de los vasos sanguíneos dividido por área observada. Después de 18 días el estudio se concluyó y los ratones fueron sacrificados. Los tumores fueron extirpados y cortados a la mitad; una mitad fue congelada y la otra preservada en formalina al 10%.

Capítulo 3 Resultados

3.1 Resultado de la clonación de las mutantes VNAR

El vector pComb3x fue obtenido a partir de un cultivo de *E. coli* y purificado por kit de extracción de plásmido (Qiagen). Al ser evaluado en un gel de agarosa (0.8%), se constató la calidad del mismo (Figura 13). El gel no mostró degradación del plásmido así que se procedió a llevar a cabo la digestión con la enzima Sfil. En este paso, el vector que contiene un inserto distinto al deseado, se digirió para eliminar el *stuffer* y poder ligar los genes de interés.

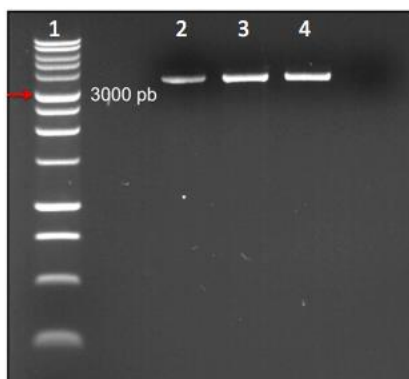


Figura 13 Vector pComb3x purificado visto en un gel de agarosa al 08%. Carril 1: Escalera de ADN. Carril 1,2,3: pComb3x purificado de tres cultivos diferentes y con el peso molecular esperado.

Los genes insertados fueron re-amplificados por PCR usando los *primers* del inciso 7.2.4. Ya que el análisis de las secuencias mostró que varias de las mutantes no tenían el sitio de corte Sfil, este paso fue crucial para poder ligarlo a pComb3x. De acuerdo a un gel de agarosa al 2%, las bandas que se muestran tienen el tamaño esperado (Figura 14).

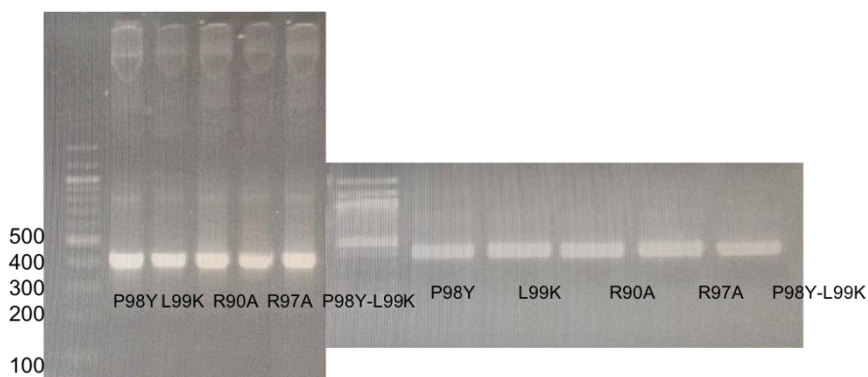


Figura 14 Estado inicial y re-amplificación de las mutantes de V13.

Es importante mencionar que antes de realizar cualquier amplificación, digestión o ligación, se realizaron predicciones de los tamaños esperados en cada proceso, utilizando los programas Serial Cloner y SnapGene. En el caso de la amplificación de las mutantes el tamaño esperado fue de 429 pb (Figura 15 y 16).

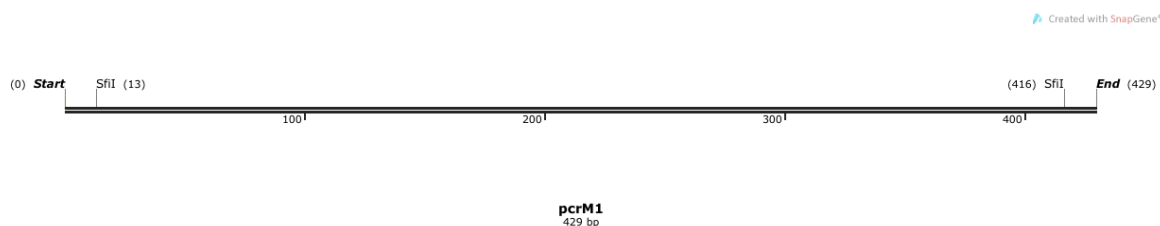


Figura 15 Amplificación teórica de las mutantes realizada con SnapGene. Esta amplificación inserta las regiones de corte para la enzima SfiI.

Una vez conocido el tamaño del fragmento esperado, la digestión del gen parental con SfiI dejaría un fragmento de 403 pb.

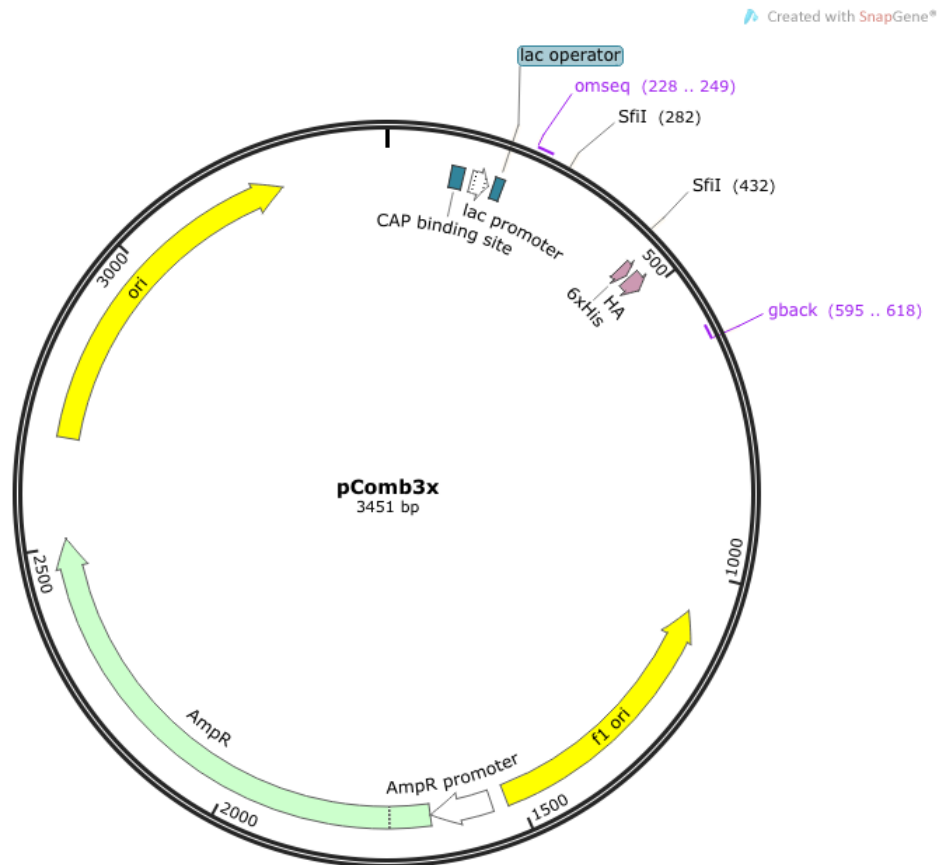


Figura 16 Construcción del mapa de expresión de las mutantes de V13 con pComb3x.

Ya realizada la ligación, esta fue transformada en la cepa de *E. coli* ER2738 y su crecimiento en colonias en placas con LB sólido y carbenicilina (resistencia dada por el vector pComb3x). Se seleccionaron siete colonias por cada mutante, y se crecieron en medio SB con antibiótico por 10 horas. Se les realizó PCR utilizando *primers* específicos del vector (omseq y gback). Y se cargaron en un gel de agarosa al 2%. El fragmento esperado era de 649 pb (Figura 17).

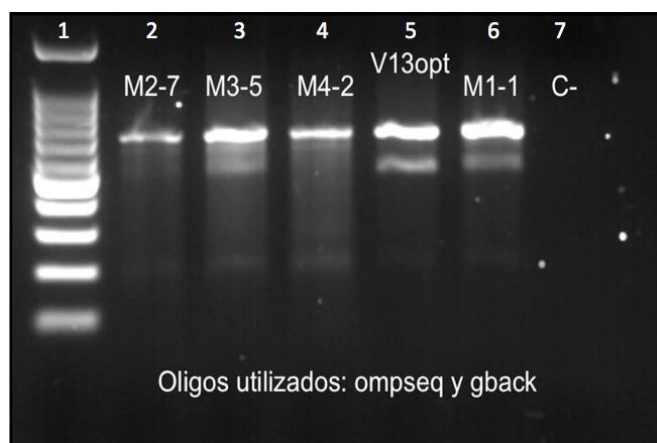


Figura 17 PCR de colonias con los primers omseq y gback. Carril 1: Escalera de ADN. Carril 2: mutante L99K. Carril 3: mutante R90A. Carril 4: R97A. Carril 5: gen parental. Carril 6: mutante P98Y. Carril 7: control negativo.

Las colonias que dieron positivas fueron: Mutante 1:3, Mutante 2:7, Mutante 3:5, Mutante 4:2 y Mutante 5:12. Una vez identificadas las colonias con el inserto positivo, se realizó la extracción del plásmido por el método de lisis alcalina. Los plásmidos extraídos fueron utilizados para transformar células para expresión de proteínas (NEB Express). Su secuencia correcta fue confirmada, según se muestra en la Figura 18.

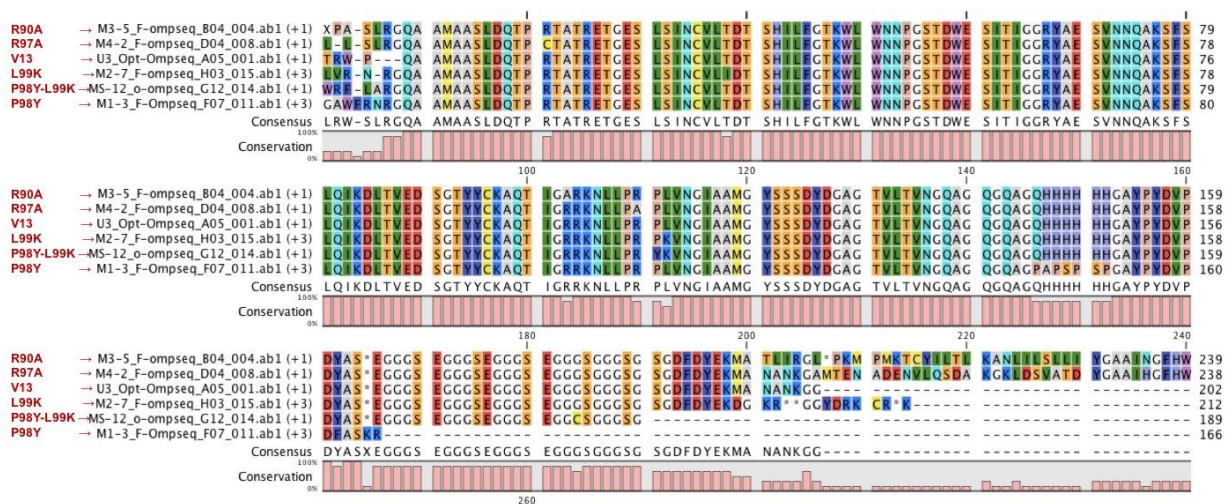


Figura 18 Secuencias obtenidas a partir de los plásmidos extraídos de una colonia por mutante.

3.2 Resultado de la expresión de las mutantes VNAR en pComb3x

Para la expresión de las proteínas se eligió la cepa NEB Express, basándose en sus características de producción similares a BL21(DE3) con la ventaja de tener mayores tasas de transformación. La primera evidencia de presencia de las proteínas fue por medio de un ELISA de expresión utilizando el mismo volumen de cada extracto periplásmico y utilizando un anticuerpo anti-HA con peroxidasa incorporada. En la Figura 19 se puede observar que las cinco mutantes, así como la cepa parental se expresaron correctamente, sin embargo, en la Figura 20 el análisis en gel de poliacrilamida al 12% de los extractos obtenidos no mostró las bandas de cada proteína, por lo que fue necesario realizar un western blot para la localización de las proteínas.

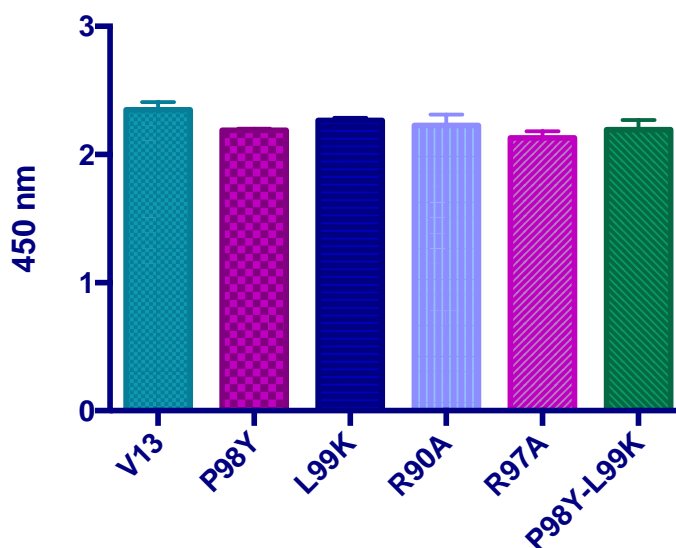


Figura 19 ELISA de expresión. Realizado a partir del extracto periplásmico década cultivo por mutante.

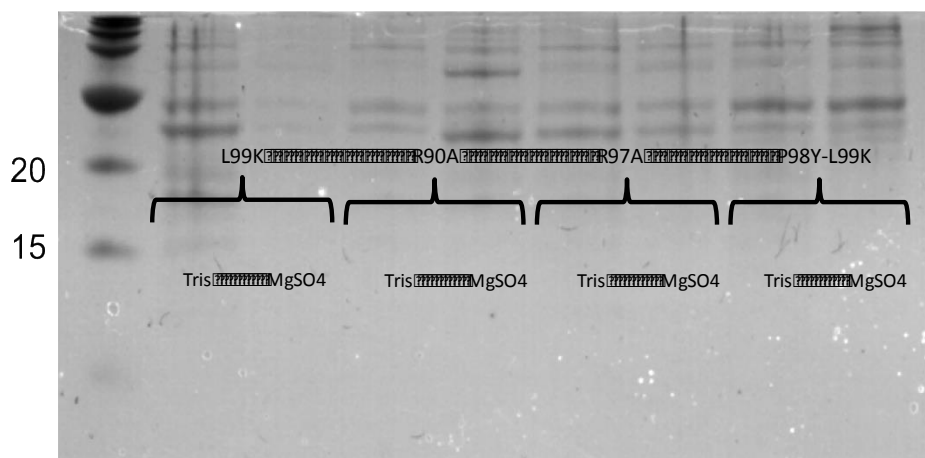


Figura 20 Gel SDS-PAGE al 12%. Se evaluaron los dos extractos obtenidos por proceso en cada mutante.

El Western blot se realizó empleando el anticuerpo anti-HA y se analizaron las mismas muestras que en el gel de poliacrilamida al 12%. En la Figura 21 es evidente la producción de proteína, sin embargo, esta se está dando en ambos extractos y con mayor concentración en el primer extracto, donde es utilizado el Tris-HCl 30 mM pH 8 y sacarosa 20%. De acuerdo a la técnica de extracción periplásmica, el segundo extracto (MgSO₄ 5mM) es donde se debería localizar la proteína de interés. Debido a estos resultados, se decidió que ambos extractos fueran utilizados para purificación de las proteínas. En un segundo lote que fue producido se repitieron los mismos resultados.

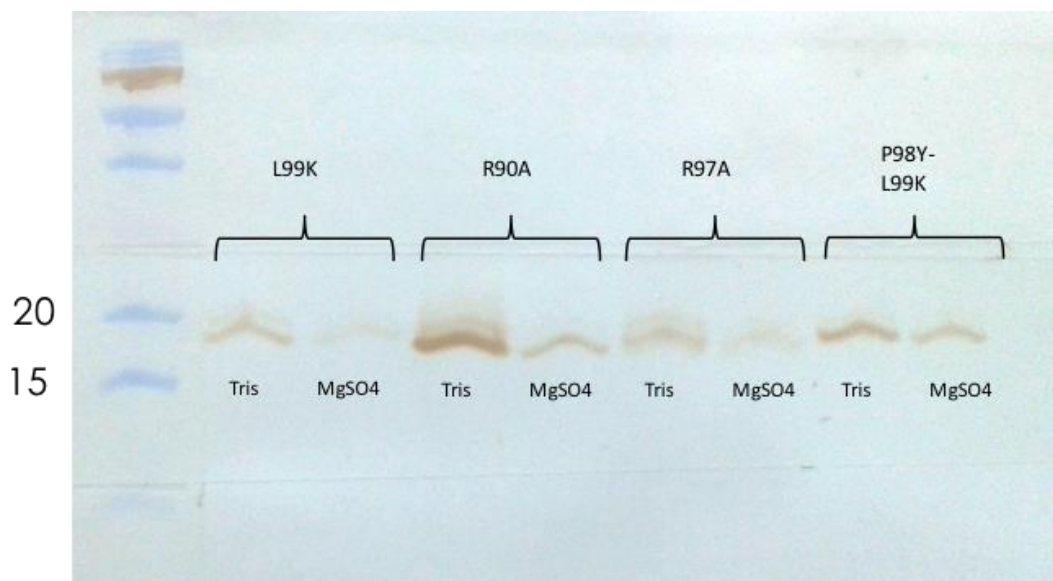


Figura 21 Western blot de extractos donde se muestran las bandas esperadas en un peso molecular de 16 kDa aproximadamente.

Una vez que la presencia de las proteínas provenientes de las mutantes de V13 fue corroborada, se procedió a su purificación a partir de los extractos. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron evaluadas mediante western blot. Primero se evaluaron las cinco eluciones de cada proteína mutante. De acuerdo a las Figuras 22 y 23, únicamente la mutante P98Y presentó proteína en la elución 2 (E2) sin embargo, no hubo proteína registrada en algún otro western blot de eluciones, por lo que se procedió a buscar en cuáles muestras se estaban quedando las proteínas.

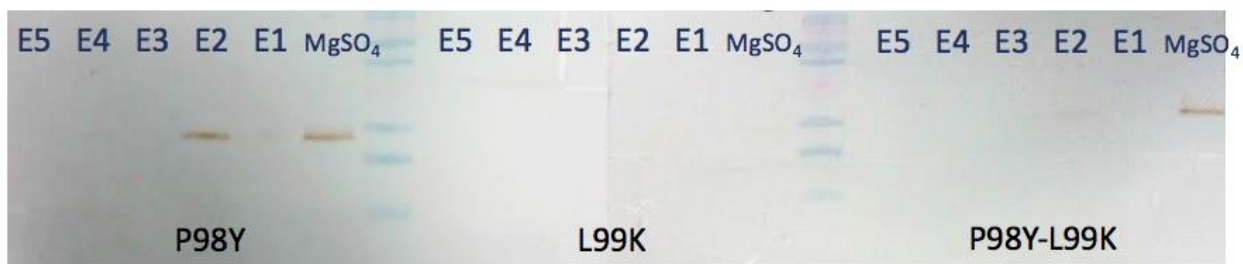


Figura 22 Western blot de las eluciones (E) de los VNAR P98Y, L99K Y P98Y-L99K obtenidas durante la purificación.

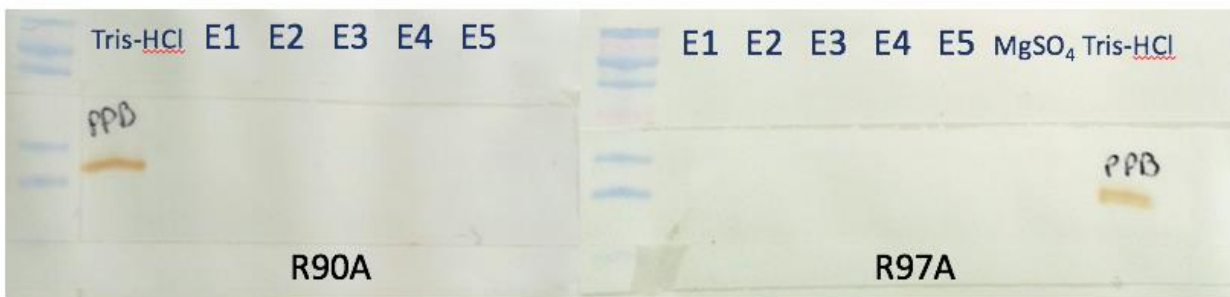


Figura 23 Western blot de las eluciones (E) de las mutantes R90A y R97A obtenidas durante la purificación.

Ya que en ninguna de las eluciones se encontraban las proteínas de interés, se procedió a evaluar las fracciones adicionales que se colectaron durante el proceso, entre ellas el tercer pase de la muestra (por si acaso esta no se estuviera pegando a la columna), y los lavados 1 y 2 (L1 y L2). La Figura 24 muestra que las proteínas se estaban eluyendo junto con los lavados.

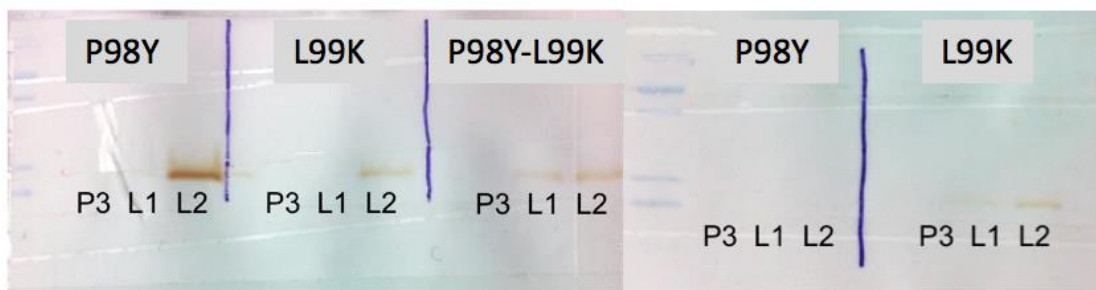


Figura 24 Western blot: P3 (pase 3), L1 (lavado 1), L2 (lavado 2).

Este resultado podría deberse a que la muestra no se difundió a través de la columna utilizando una solución de imidazol, ya que se ha visto que este ayuda a que las proteínas se fijen a la resina. Por tanto, se deberá probar esta condición.

El cromatograma obtenido en la cromatografía de FPLC, no indicó pico relevante alguno durante el gradiente de imidazol sin embargo, se colectaron automáticamente todas las fracciones obtenidas en la corrida. Como se puede ver en la Figura 25, el único pico relevante está formando parte de los desechos de lavado antes de iniciar el gradiente y por ello también se decidió colectar.

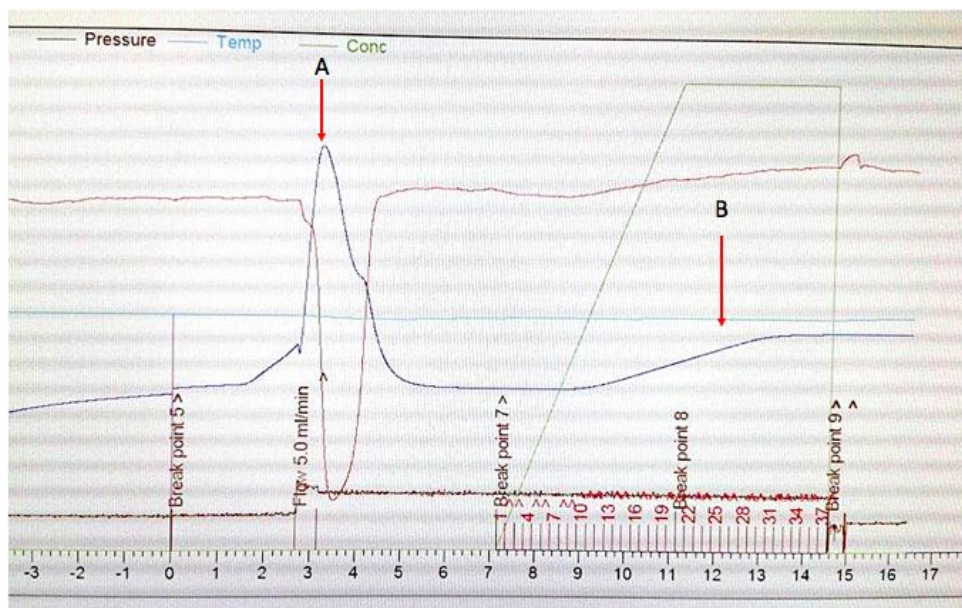


Figura 25 Cromatograma correspondiente a la purificación de un VNAR por FPLC. A: pico de desecho inicial. B: lugar donde debía estar el pico del VNAR purificado.

Se obtuvieron un total de 41 muestras, que fueron agrupadas en intervalos de seis, excepto el primer grupo que estuvo formado por las cinco muestras colectadas del desecho inicial. De cada muestra se tomaron 10 μ L y se mezclaron por grupos. Se adicionó el mismo volumen final de buffer de carga y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12%. También fueron cargadas muestras correspondientes al desecho de ultrafiltración y el filtrado final, esto como evidencia de presencia de proteína. Con este gel se realizó un western blot (Figura 26).

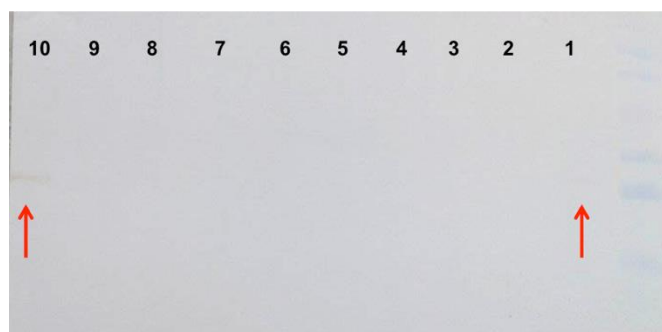


Figura 26 Western blot de las muestras agrupadas obtenidas a partir de la purificación por FPLC. Carril 10: filtrado final. Carril 1: desecho.

El western blot reveló dos bandas, una muy tenue correspondiente al grupo de muestras de desecho y otra más marcada que correspondía al filtrado final. Con este resultado, se realizó otro western blot, ahora utilizando las cinco muestras de desecho y así detectar qué fracción tenía la proteína. La figura 27 muestra las fracciones de desecho, e indicó que la 3 y 4 tenían la proteína de interés. A pesar de haber localizado a la proteína, esta no debería estar en los desechos pues indica que no se está adhiriendo a la columna y por tanto, no es posible llevar a cabo el gradiente con imidazol para su purificación.

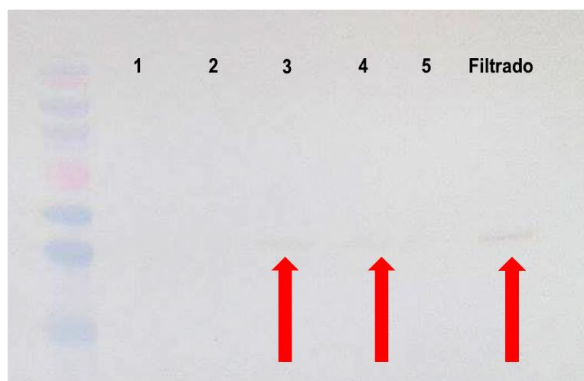


Figura 27 Western blot de fracciones que componen el carril 1 de la figura 26 correspondiente al desecho. Carril 3 y 4: fracciones de desecho.

Con estos resultados como evidencia, se determinó volver a producir las proteínas y purificarlas por lotes de 100 mL de extracto periplásmico. Así se evitaría la saturación de la columna y se obtendrían más proteína purificada.

Para cada muestra se obtuvieron 3 mL de proteína eluída. El perfil de elución de cada una permaneció y se eligió la elución 1 como la de mayor concentración de proteína. Las eluciones se dializaron y cuantificaron. El resultado fue analizado mediante un gel SDS-PAGE y en un western blot (Figura 28) y el grosor de las bandas se comparó con un ELISA de expresión realizado con los mismos extractos (Figura 29).

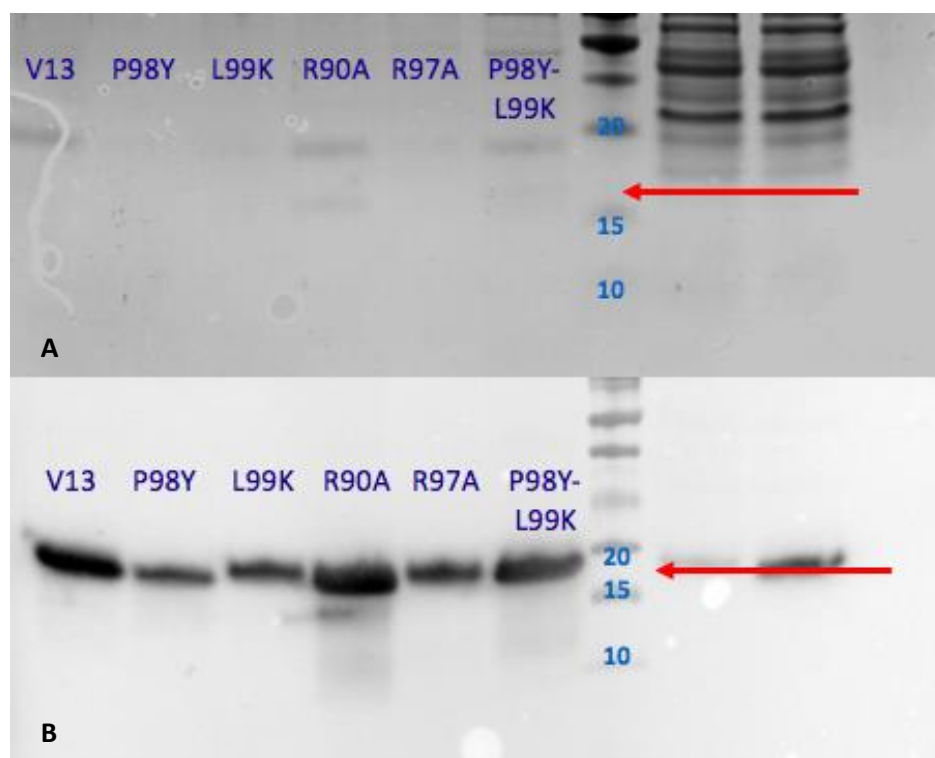


Figura 28 Análisis de la expresión de las proteínas. A: Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. B: Western blot. Las flechas indican el peso de las proteínas obtenidas.

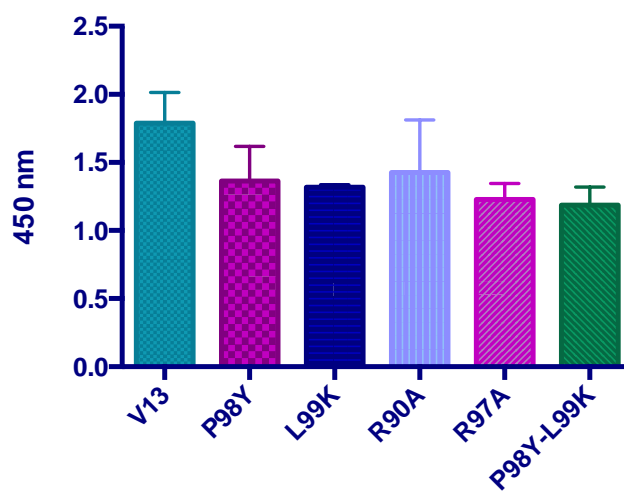


Figura 29 ELISA de expresión de las proteínas después de ser purificadas.

3.3 Resultado del reconocimiento del VEGF por las mutantes VNAR

Una vez que la presencia de las proteínas fue evidenciada por ambos procedimientos, se determinó realizar un ELISA de reconocimiento (Figura 30). Se cuantificaron las proteínas con NanoDrop y se colocó la misma cantidad de proteína por pozo que citocina, es decir 250 ng por pozo de VNAR y de VEGF. Como control negativo se utilizó PBS en lugar de VEGF.

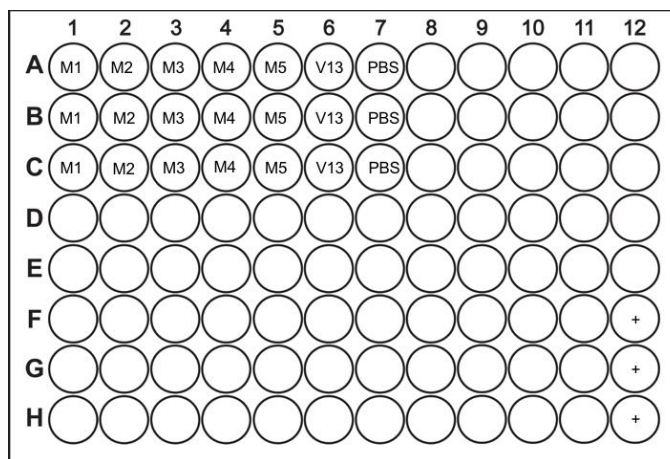


Figura 30 Disposición de los pozos en placa para ELISA de reconocimiento.

Los resultados obtenidos muestran que existe una fuerte tendencia positiva de la mutante P98Y por el VEGF₁₆₅, mismo reconocimiento que se observa por la doble mutante. La proteína parental retiene el reconocimiento por el VEGF, sin embargo, es menor que las mencionadas con anterioridad, y también en algunas consideradas “negativas”, se puede observar el reconocimiento (Figura 31).

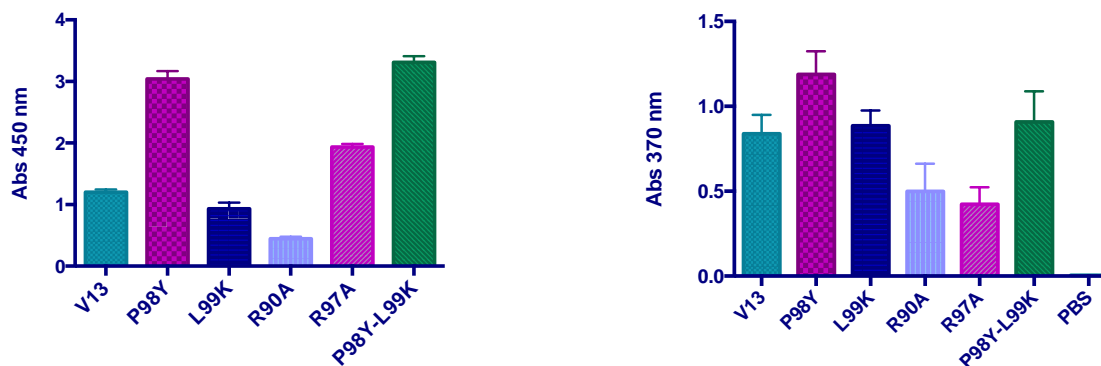


Figura 31 ELISA de reconocimiento de dos lotes diferentes.

Se realizó el reconocimiento del VEGF por diferentes concentraciones de VNAR, a modo de titulación para encontrar la concentración a la que puede haber un mejor reconocimiento. En la Figura 32 se observa que la mutante P98Y mantiene un perfil de reconocimiento más alto por arriba de las demás mutantes, sobre todo a concentraciones menores de VNAR.

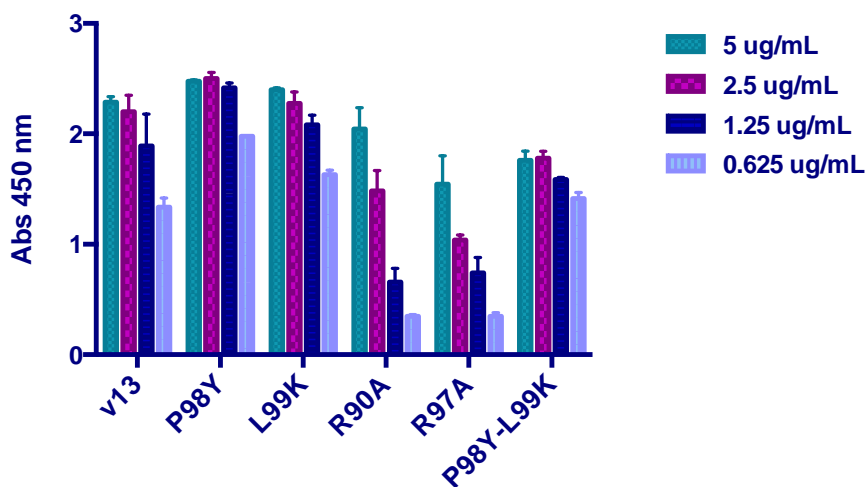


Figura 32 ELISA de reconocimiento con titulación para los VNAR.

3.4 Resultado de la producción masiva de anticuerpos

Como resultado de la optimización de las secuencias y el cambio de vector, fue posible obtener concentraciones de VNAR apropiadas para realizar los ensayos posteriores. El vector de expresión pET-28a(+) (Novagen) fue especialmente diseñado para realizar la expresión de proteínas recombinantes, por lo tanto, sus rendimientos se consideran altos. La etiqueta utilizada para los genes fueron la 6xHis en el extremo C-terminal.

3.4.1 Resultado de las pruebas de expresión a dos temperaturas diferentes

El primer estudio aplicado para producción de proteínas se realizó con el objetivo de probar las diferentes condiciones de llevar a cabo la expresión: 30°C por 18 horas y 37°C por 4 horas. Los geles teñidos con Coomassie y western blot obtenidos se pueden observar en la Figura 33. Las fracciones recuperadas fueron extracto total, fracción soluble (obtenida por lisis celular) y el control sin inducir. La Figura 33 demuestra que la proteína se está produciendo en una fase insoluble, por lo que fue necesario realizar la purificación a partir de condiciones desnaturalizantes.

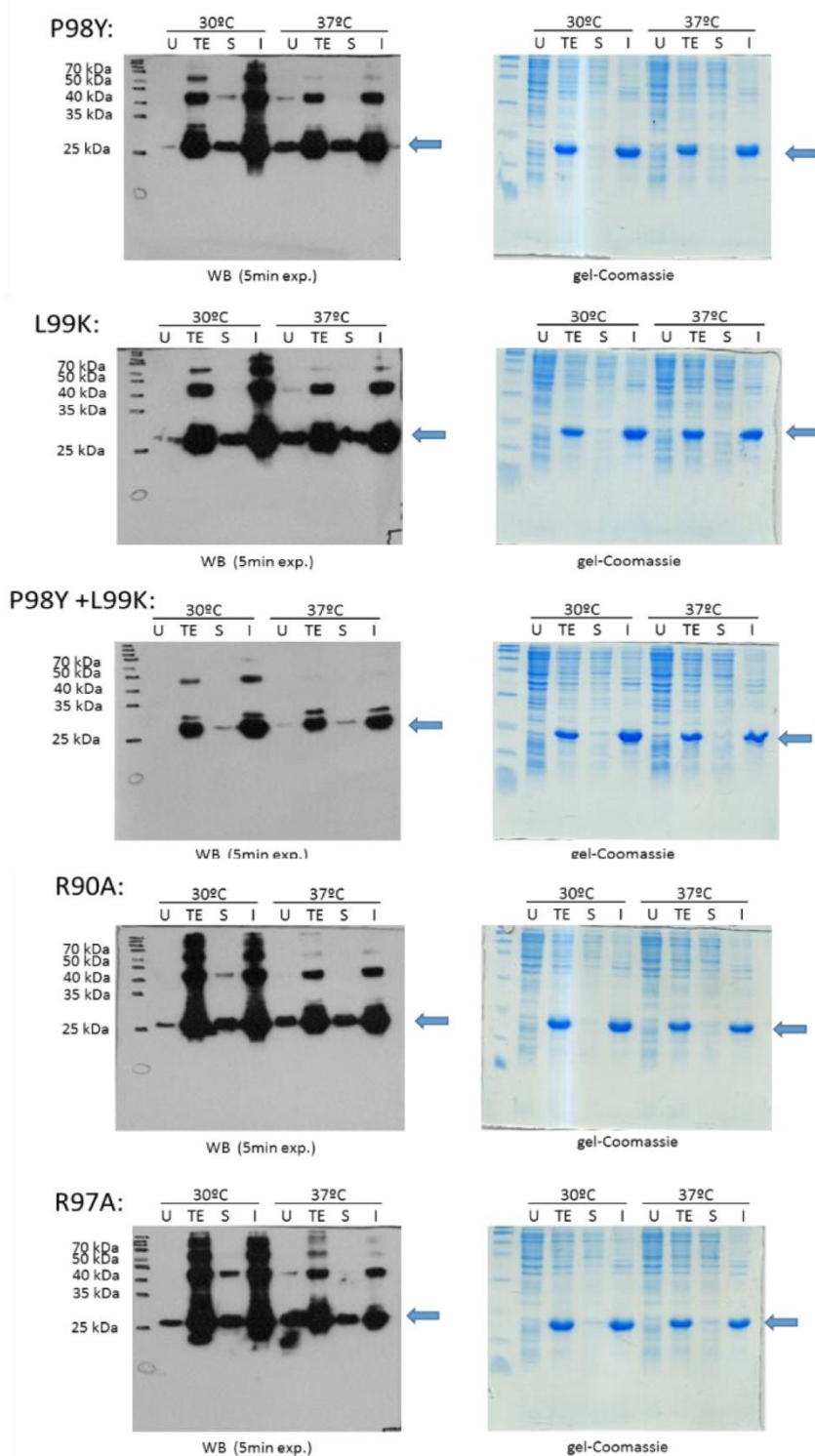


Figura 33 Análisis de la expresión de los cinco mutantes de anti-VEGF. Las muestras corresponden en cada caso al extracto total control sin inducir (U), al extracto total transcurrido el tiempo de inducción (TE), a la fracción soluble tras la lisis de las células (S) y a la fracción insoluble resultante de la lisis (I). En los geles se cargaron los mismos volúmenes de extracto celular.

3.4.2 Resultado de la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC)

A la vista de los resultados obtenidos en las pruebas de expresión (Figura 33), en todos los casos la cantidad de proteína purificada a partir de la fracción soluble fue considerablemente menor que la obtenida a partir de la fracción insoluble por el método *on-column refolding*. También se observa que al comparar las dos temperaturas de inducción, la cantidad de proteína obtenida de la expresión a 30°C durante 18 h es mucho mayor que la obtenida a 37°C durante 4 h. En las Figuras 34 y 35 se muestran, a modo de ejemplo, imágenes obtenidas de los perfiles cromatográficos y geles teñidos con Coomassie correspondientes.

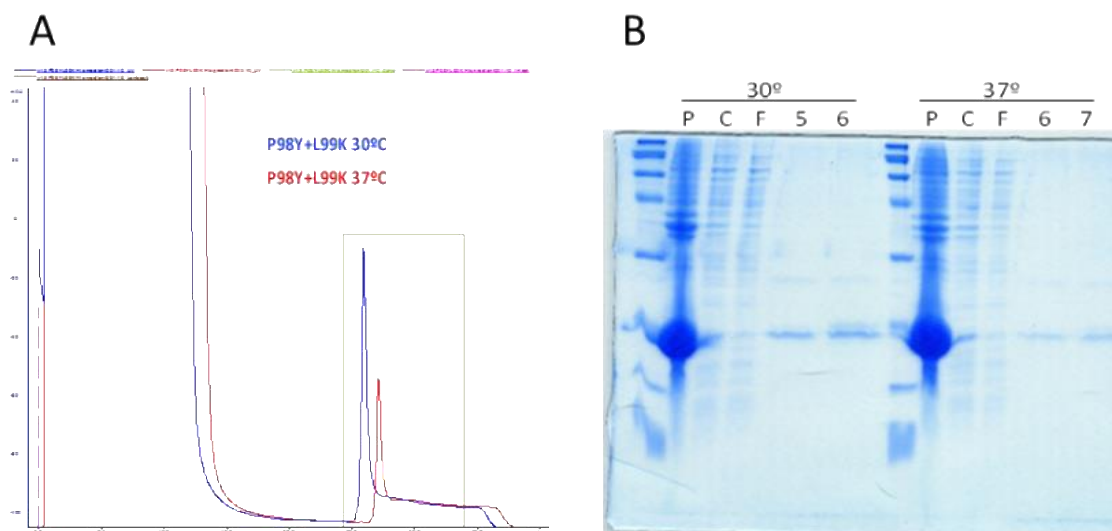


Figura 34 A) Cromatogramas IMAC superpuestos de las purificaciones realizadas a partir de la fracción soluble de las sobreexpresiones a dos temperaturas diferentes de la mutante P98Y+L99K. B) Gel SDS-PAGE correspondiente a la electroforesis de las purificaciones cuyos cromatogramas se muestran. Las fracciones cargadas son el pellet insoluble tras la lisis (P), en el cual se aprecia que está la mayor parte de la proteína sobreexpresada; la fracción soluble obtenida tras centrifugar el lisado celular (S), el flow-through que contiene las proteínas que no se unen a la columna (F), y las dos fracciones que acumulan el 99% del pico de elución en cada caso (5 y 6, o 6 y 7). De las fracciones de elución se cargaron 20µL en el gel. El resto de mutantes mostraron un perfil muy similar a esta.

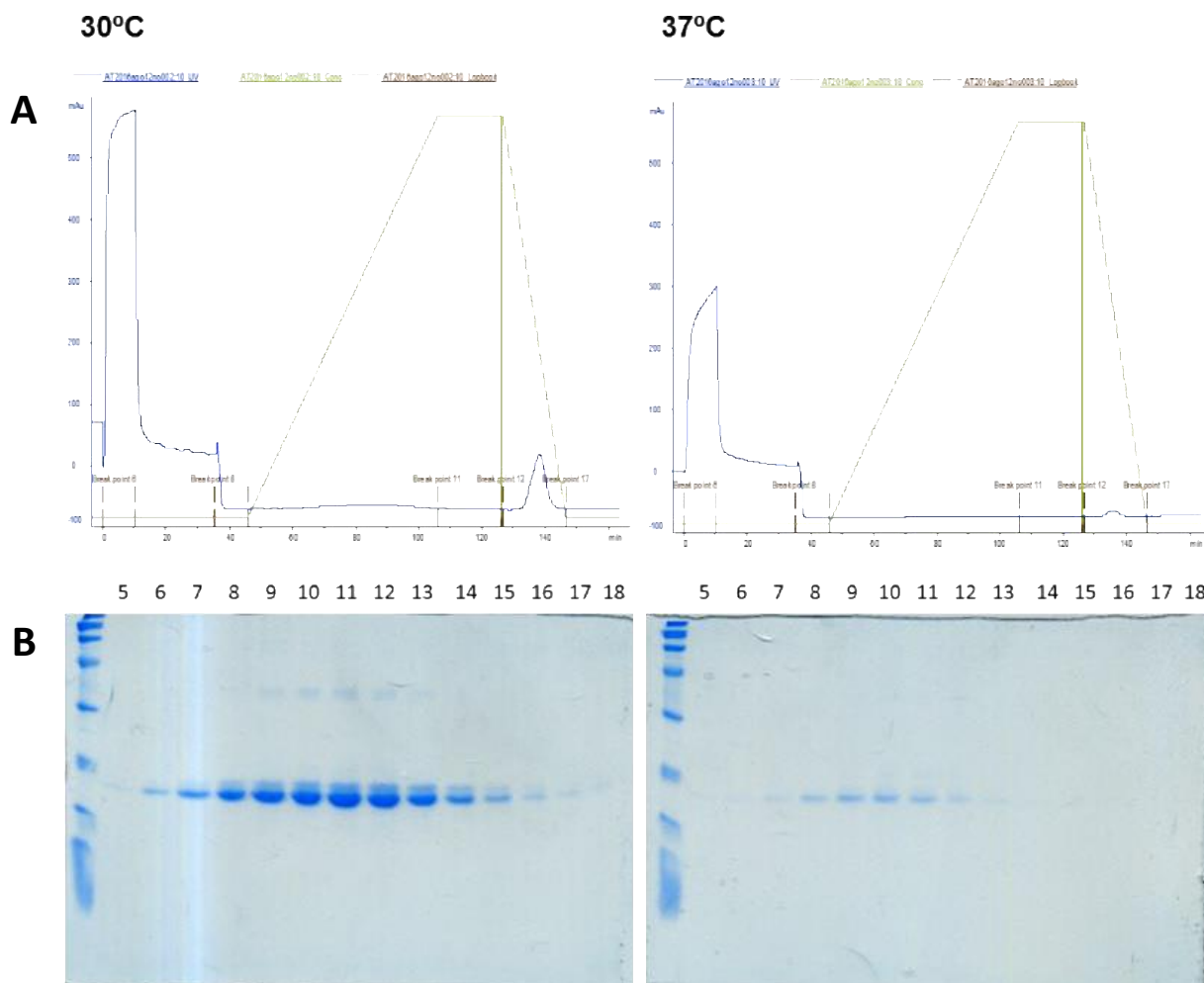


Figura 35 A) Cromatogramas IMAC de las purificaciones a partir de la fracción insoluble de las sobreexpresiones a dos temperaturas diferentes del mutante R90A. B) Geles correspondientes a electroforesis de las purificaciones cuyos cromatogramas se muestran. A la izquierda las figuras corresponden a la purificación a partir de la sobreexpresión a 30°C durante 18 h, y a la derecha corresponden a la purificación a partir de la sobreexpresión a 37°C durante 4 h. Se cargaron 10ul de las fracciones indicadas. El resto de mutantes mostraron un perfil muy similar al del mutante que se muestra aquí a modo de ejemplo.

Tras las purificaciones correspondientes por cromatografía IMAC, se juntaron aquellas fracciones que contenían el 99% de la proteína (visualizada en los geles), y se analizaron los *pool* resultantes de nuevo por electroforesis en geles SDS-PAGE, para estimar los rendimientos finales de cada proteína (Figura 36 y Tabla 7).

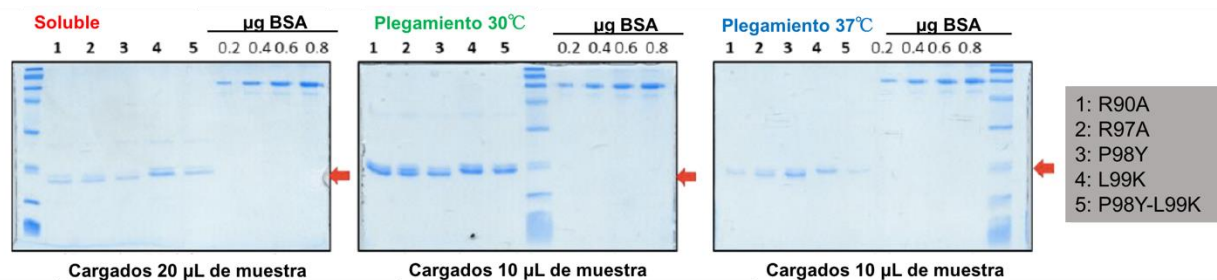


Figura 36 Geles correspondientes a la electroforesis de las preparaciones finales de cada purificación junto a un patrón de BSA para estimar los rendimientos por densitometría de bandas. En el caso de las muestras solubles, las fracciones de ambas expresiones (30°C y 37°C) fueron combinadas para la cuantificación de la proteína total.

Derivado de la Figura 36, la tabla 7 muestra la calidad de proteína que se obtuvo posterior al plegamiento. El plegamiento a 30°C resultó en un rendimiento mayor que a 37°C pues bajo esta condición la concentración de proteína fue muy baja y no se detectó por el método de Bradford.

Tabla 7 Cuantificación relativa de las proteínas por fracción.

Proteína	Soluble (total 30°C/37°C)	Plegamiento a 30°C	Plegamiento a 37°C
P98Y	+/-	+++++	++
L99K	+	+++++	+
R90A	+/-	+++++	-
R97A	+/-	+++++	+
P98Y-L99K	+/-	+++++	-

3.4.3 Resultado de la cuantificación de las proteínas

La cuantificación se hizo mediante densitometría de bandas a los geles teñidos con azul de Coomassie. La digitalización de las imágenes de los geles dio como resultado un área en píxeles, a la cual se le dio un valor con respecto al estándar utilizado en diferentes concentraciones (Figura 37). El software otorgó el valor correspondiente a cada banda de VNAR obtenida (Tabla 8)

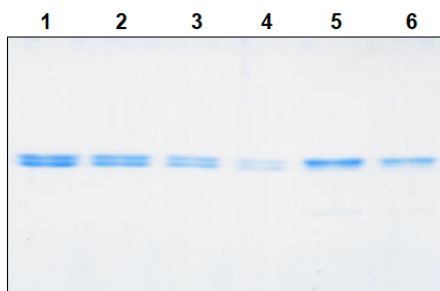


Figura 37 Ejemplo de gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie con estándares de VNAR para cuantificación de proteína. 1) 1 µg. 2) 0.75 µg. 3) 0.5 µg. 4) 0.25 µg. 5) Proteína 2 µL. 6) Proteína 1 µL.

Tabla 8 Concentraciones de VNAR obtenidas.

VNAR	Concentración (mg/mL)
V13	0.45
P98Y	0.24
L99K	0.75
P98Y-L99K	0.28
R90A	0.5
R97A	0.59

3.4.4 Resultado del estudio de estabilidad térmica

Cada VNAR evaluado presentó una estabilidad térmica diferente para cada temperatura (Figura 38). El V13 presenta buena estabilidad a todas las temperaturas probadas, excepto a temperatura estándar (20°C), donde es posible observar menor cantidad de proteína. El P98Y mostró buena estabilidad térmica a 4°C, sin embargo, a temperatura estándar esta disminuye notablemente. El L99K demostró tener buena estabilidad a 4°C y -20°C, aunque esta se ve reducida tanto a -80°C como a temperatura estándar. El P98Y-L99K sólo mostró una estabilidad térmica reducida a temperatura estándar, este caso se repitió con R97A. El R90A presentó mejor estabilidad a 4°C, y esta se vio disminuida en las demás temperaturas de prueba.

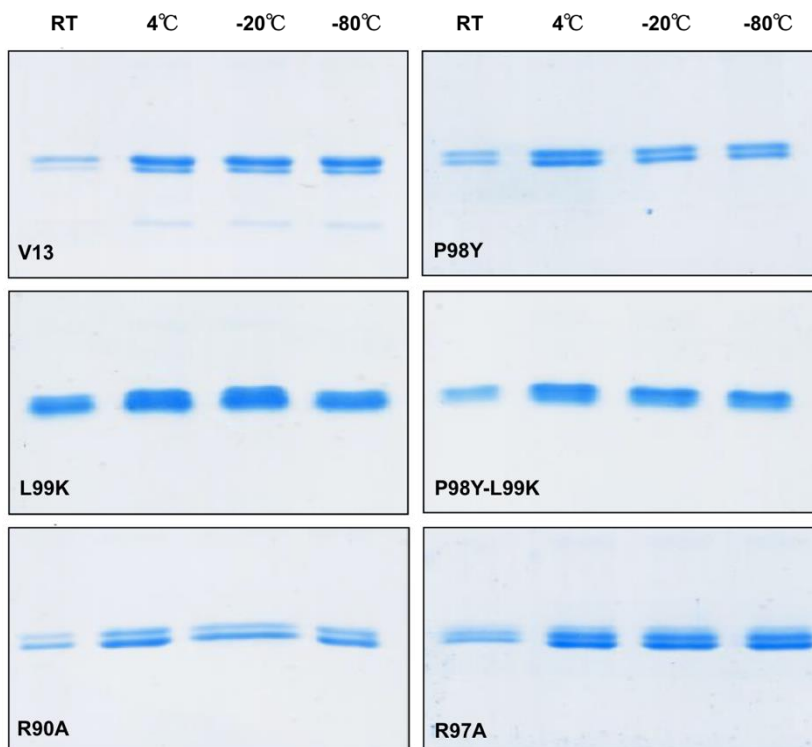


Figura 38 Representación de la estabilidad de una de las proteínas sometida a diferentes temperaturas.

El análisis por western-blot con los VNARs como prueba de identidad/integridad, se hizo para confirmar que estos anticuerpos contienen la cola de histidinas. El revelado de la membrana se muestra en la Figura 39.

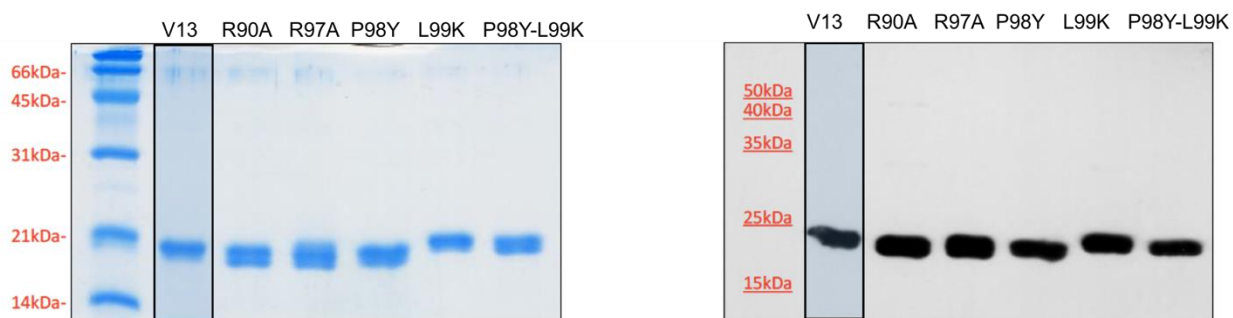


Figura 39 Análisis de la presencia de la etiqueta 6-His.

3.5 Resultado del ensayo de proliferación celular de HUVEC

El objetivo de este ensayo fue determinar que componentes en el kit-VEGF Endothelial Cell Growth (ATCC) eran necesarios para la proliferación de las células HUVEC, esto con la intención de determinar si el suero fetal bovino y el VEGF no se contraponían, en caso de un resultado falso positivo. Se investigaron todos los componentes del kit y se determinó tener un medio completo (como lo especifica el fabricante) y cuatro medios llamados incompletos, ya que algunos de sus componentes iniciales se eliminaron (Tabla 9). Después de alcanzar una confluencia del 80%, se realizó la digestión trípica de las células, colocando 5000 células por pozo en medio completo por 12 horas. Al término de ese tiempo, se hizo el cambio de medio y se colocó el medio completo y los medios incompletos. Como se observa en la Figura 40, los tiempos medidos fueron 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

Tabla 9 Composición de los medios de cultivo para HUVEC.

Componente	Medio Completo	Medio Incompleto1	Medio Incompleto2	Medio Incompleto3	Medio Incompleto4
VEGF	+	+	-	+	-
EGF	+	-	-	-	-
FGF	+	-	-	-	-
IGF	+	-	-	-	-
L-glutamina	+	+	+	+	+
Heparina sulfato	+	+	+	+	+
Hemisuccinato de hidrocortisona	+	+	+	+	+
Suero fetal bovino	+	+	+	-	-
Ácido ascórbico	+	+	+	+	+
Antibióticos	+	+	+	+	+
Medio Basal	+	+	+	+	+

En este experimento se evaluó la presencia y ausencia del suero fetal bovino (Figura 40) , y la importancia del VEGF en ausencia de otros factores de crecimiento (Figura 41). Era importante establecer el alcance del suero fetal bovino ya que el componente clave (VEGF) también se encuentra presente en él (así como los demás factores de crecimiento) y se debía evaluar la forma en que afectaría el experimento.

Por otro lado, la eliminación de otros factores de crecimiento se da como resultado de una exhaustiva revisión bibliográfica, donde se menciona que el EGF es un mitógeno más fuerte que el VEGF. Inicialmente, se probó la presencia y ausencia de estos factores de crecimiento (datos no mostrados), y lo que se encontró fue que la ausencia del VEGF no limitaba el crecimiento de las células si estaban presentes los otros factores de crecimiento. Es así como el suero fetal bovino suple esa deficiencia y es posible ver proliferación celular.

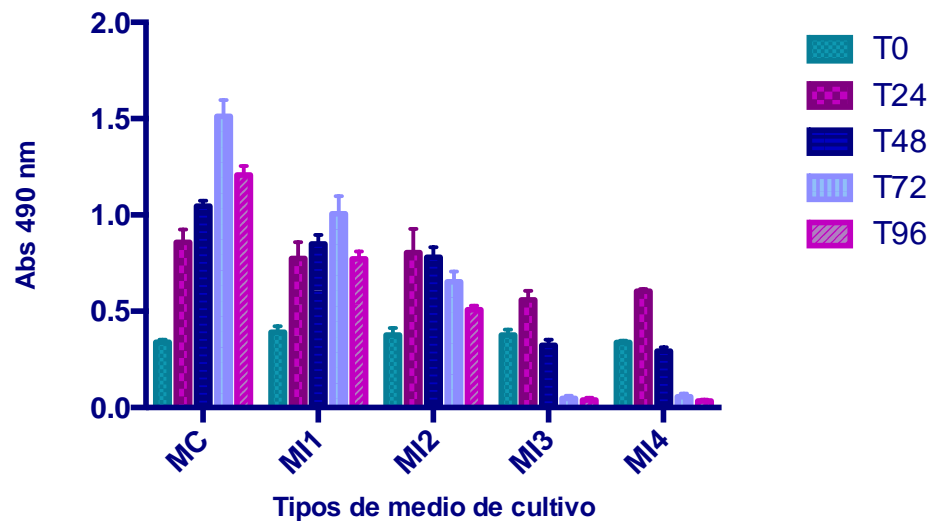


Figura 40 Ensayo de proliferación de HUVEC, probado diferentes composiciones del medio de cultivo. T representa cada tiempo de cultivo evaluado. MC: medio de cultivo completo. MI1: medio de cultivo sin factores de crecimiento pero con VEGF. MI2: medio de cultivo sin factores de crecimiento y sin VEGF. MI3: medio de cultivo sin factores de crecimiento, sin suero fetal bovino pero con VEGF. MI4: medio de cultivo sin factores de crecimiento, sin suero fetal bovino y sin VEGF.

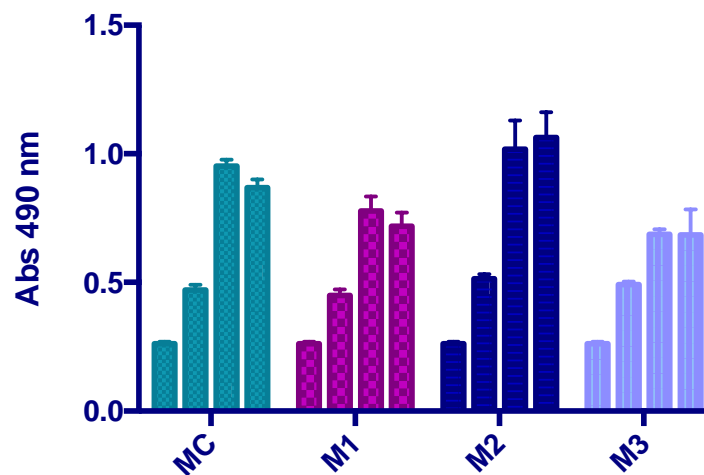


Figura 41 Proliferación de células HUVEC en presencia y ausencia de los factores de crecimiento. MC: medio de cultivo completo. M1: medio de cultivo con VEGF pero sin otros factores de crecimiento. M2: medio de cultivo sin VEGF pero con los demás factores de crecimiento. M3: medio de cultivo sin VEGF y sin los demás factores de crecimiento.

Una vez establecida la importancia que tiene la presencia de componentes como el suero fetal bovino y el VEGF, se procedió a evaluar la afectación de utilizar diferentes concentraciones de VEGF (Tabla 10). Camacho (2007) encontró que para ensayos de proliferación utilizando VEGF, la dosis efectiva 50 (DE₅₀) era de 5.5 ng/mL, que coincide con la concentración que sugiere el kit de proliferación de la ATCC utilizado. De acuerdo a la Figura 42, utilizar doble concentración de VEGF o triple no marca una gran diferencia con respecto a la concentración inicial, no obstante, si lo hace en cuestiones económicas pues el VEGF es una citocina costosa y utilizar más de lo necesario sin diferencias resulta innecesario. Los experimentos posteriores se realizaron con el medio M1 como consecuencia de lo anterior.

Tabla 10 Evaluación de diferentes concentraciones de VEGF en el medio de cultivo.

Componente	Medio Completo	M1	M1A	M1B
VEGf	.	1x	2x	3x
EGF	.			
FGF	.			
IGF	.			
L-glutamina
Heparina
Hidrocortisona
Suero fetal bovino
Ácido ascórbico
Antibióticos
Medio Basal

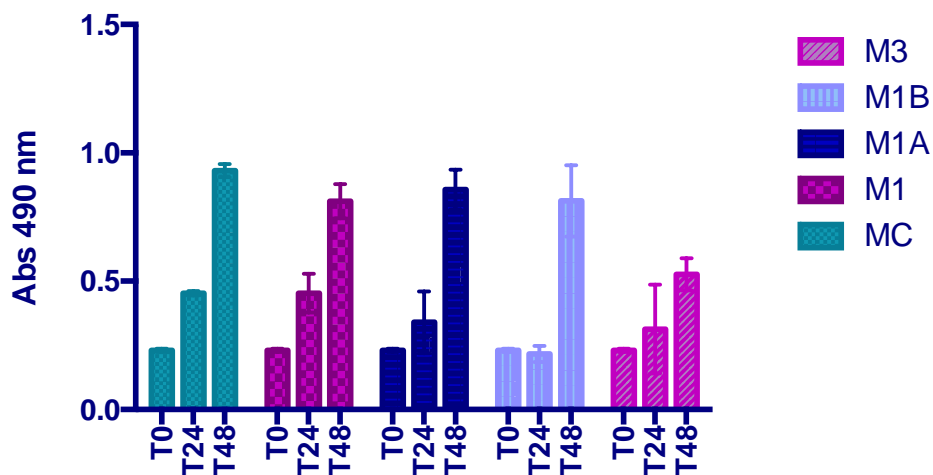


Figura 42 Proliferación de células HUVEC a diferentes concentraciones de VEGF y en ausencia de otros factores de crecimiento. MC: medio de cultivo completo. M1: con 6 μ L de VEGF. M1A: con 12 μ L de VEGF. M1B: con 18 μ L de VEGF. M3: sin VEGF.

3.6 Resultado del ensayo de angiogénesis

Los resultados obtenidos fueron comparados con los controles utilizados, en este caso las células sin VNAR, células solo con VEGF en el medio de cultivo, y el control positivo dado por la presencia de suramina (Figura 43). De acuerdo a los resultados obtenidos, fue posible observar un crecimiento considerable en las células estimuladas por el VEGF. Mismo crecimiento que se vio inhibido por la presencia de suramina en el control positivo. Aquellas células sin VEGF tuvieron poco crecimiento (Figura 43).

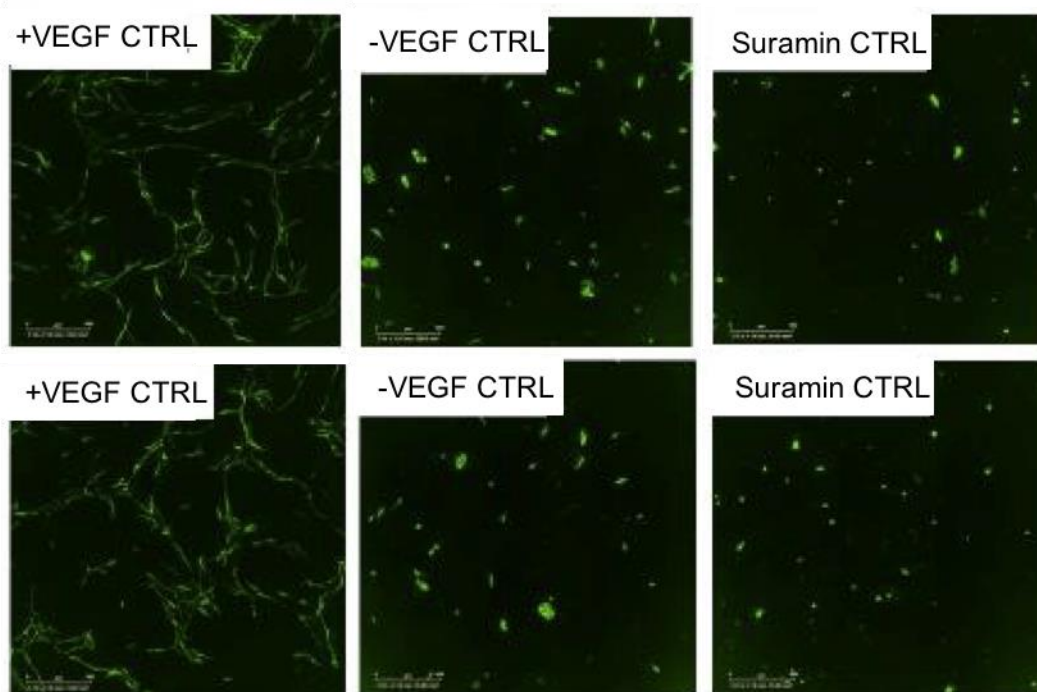


Figura 43 Inhibición del crecimiento y formación de tubos. Imágenes correspondientes a los controles utilizados.

Las Figuras 44 y 45 corresponden al resultado obtenido después de 240 horas y donde se observa una evidente inhibición del crecimiento de los tubos con los seis VNAR evaluados a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, los que presentaron mejor respuesta a menor concentración (18.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron P98Y y P98Y-L99K, esto con respecto a la molécula parental (V13). Los datos graficados se encuentran en la Figura 45, donde se puede observar claramente la tendencia de disminución del largo de los tubos vasculares por parte de estas dos mutantes.

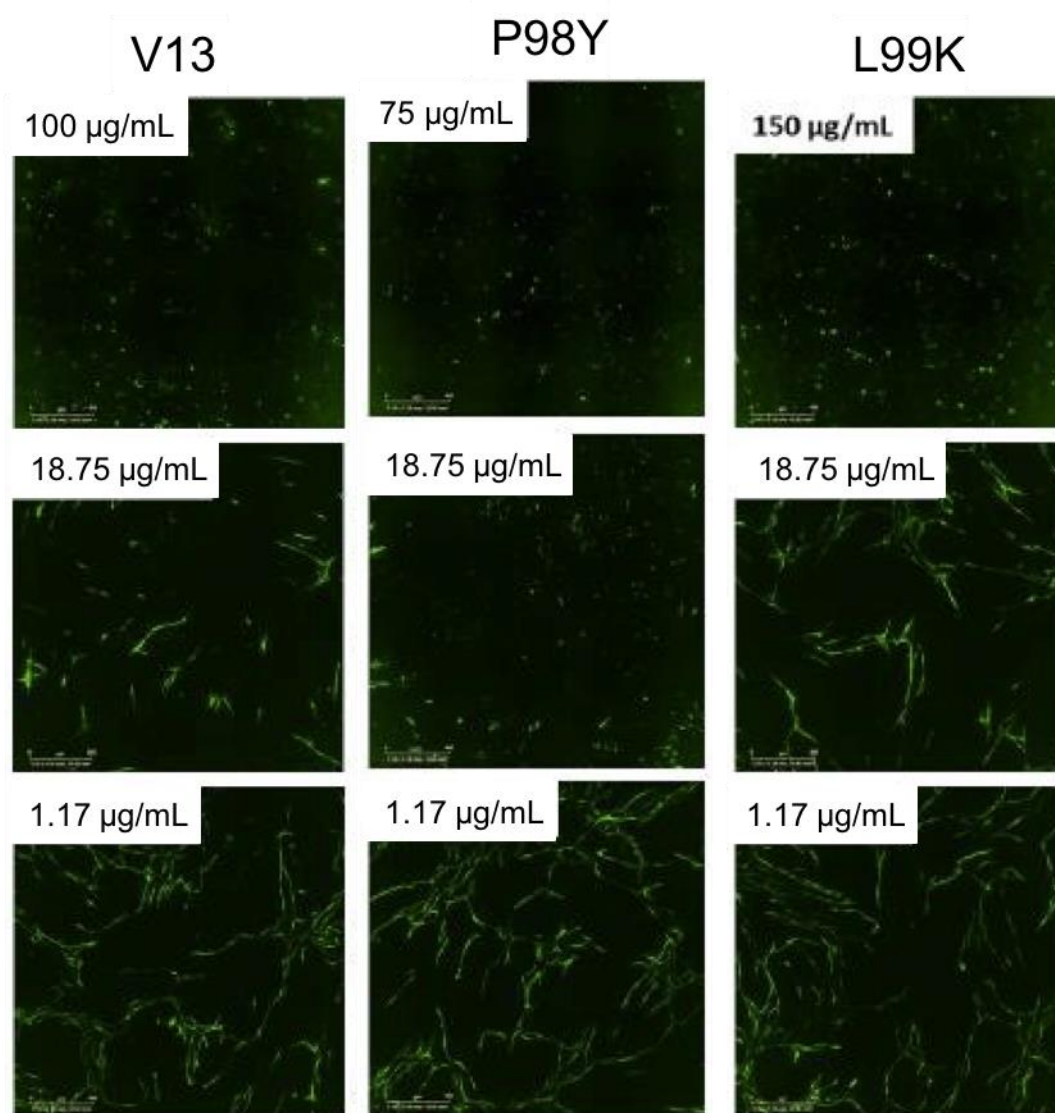


Figura 44 Inhibición del crecimiento y formación de tubos. Imágenes tomadas 240 horas después de haber sido sembradas.

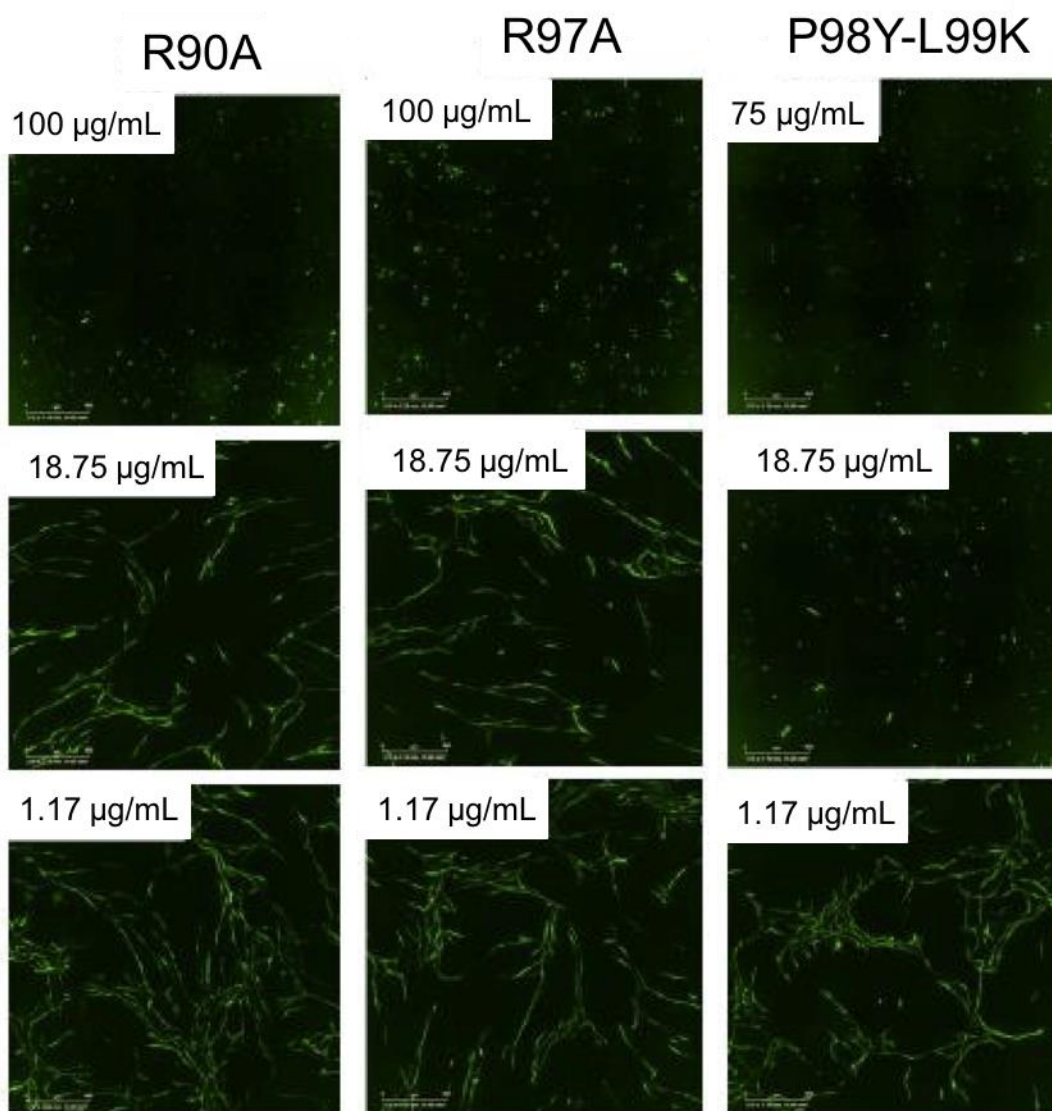


Figura 45 Inhibición del crecimiento y formación de tubos. Imágenes tomadas 240 horas después de haber sido sembradas.

La formación de tubos vasculares se midió alcanzando un incremento promedio de 0.10 mm/mm² en células no estimuladas por VEGF y de 4.3 mm/mm² en células estimuladas por VEGF (Figura 46 A y B). De igual manera, la presencia de suramina inhibió el crecimiento de los tubos vasculares teniendo un crecimiento promedio de 0.2 mm/mm². Los puntos de ramificación también fueron medidos bajo las mismas condiciones, y la presencia de suramina redujo los puntos a un promedio de 0.010 puntos de ramificación/mm². Así mismo, la presencia de VEGF eleva la presencia de puntos de ramificación a 14.2 puntos/mm² (Figura 47).

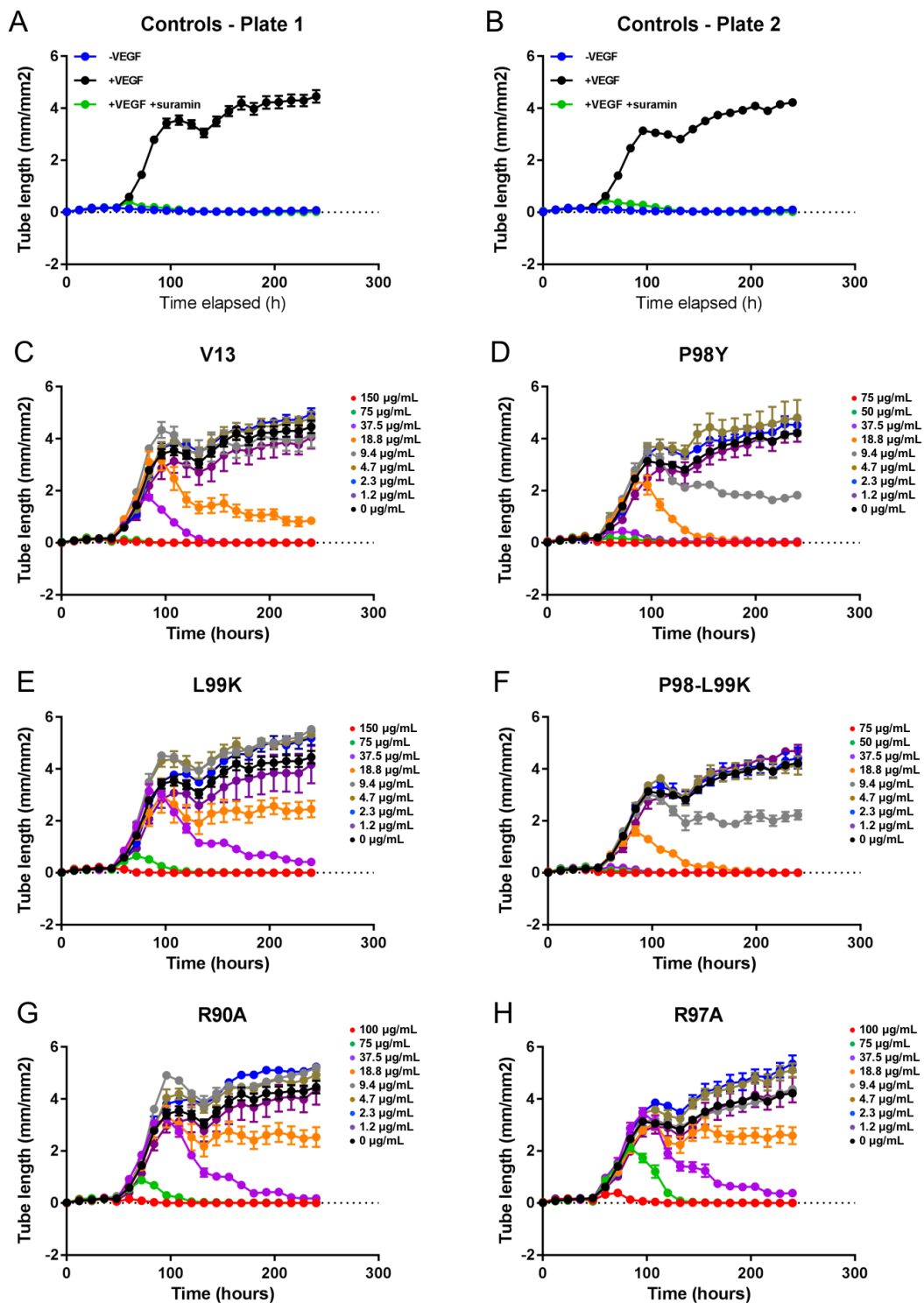


Figura 46 Efectos del tratamiento en la longitud de los tubos. Se monitoreó por 240 horas. Después de 48 horas de incubación, se agregaron los VNAR y el VEGF.

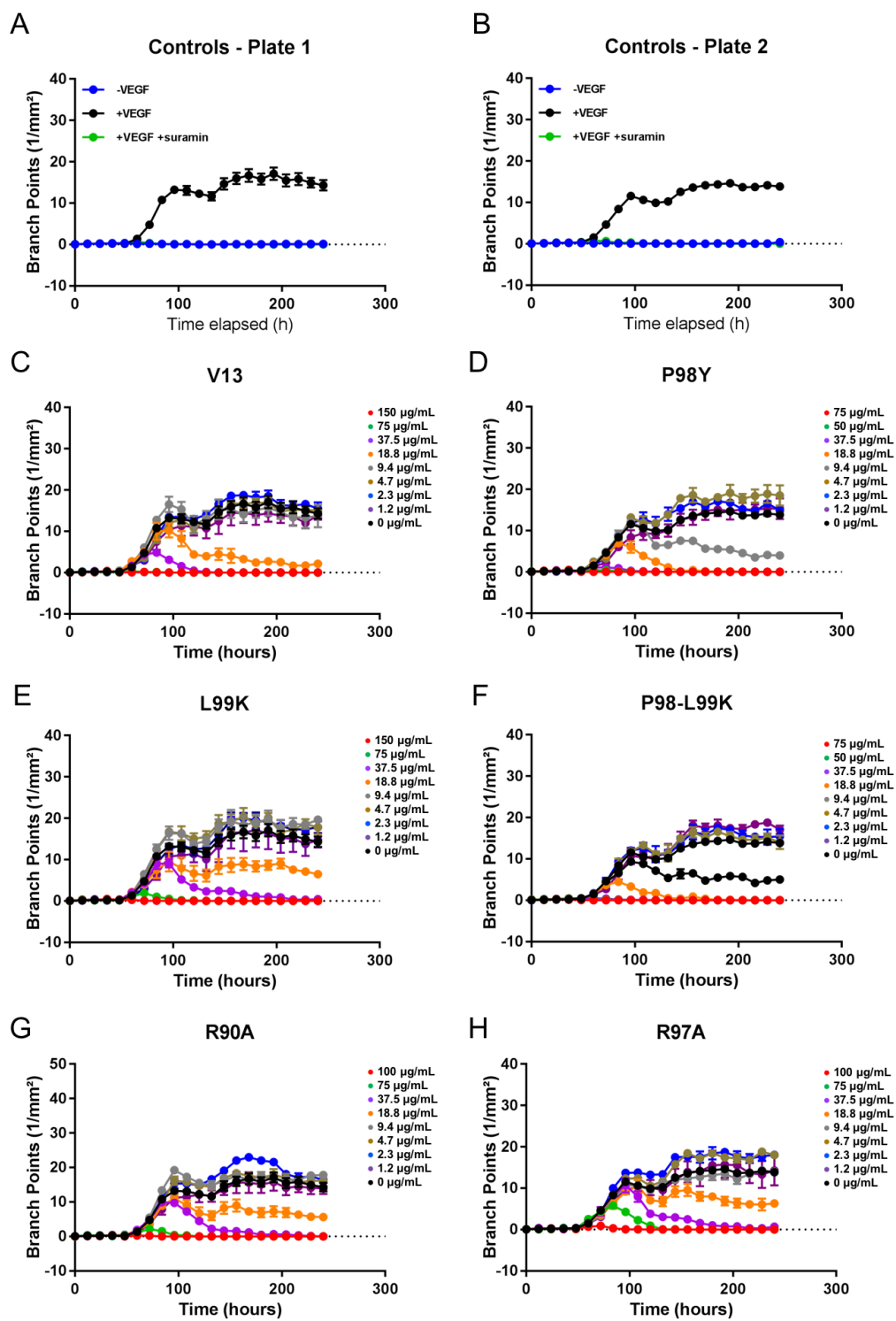


Figura 47 Efectos del compuesto tratamiento en los puntos de ramificación. Se monitoreó por 240 horas y los puntos son el promedio de 3 pozos.

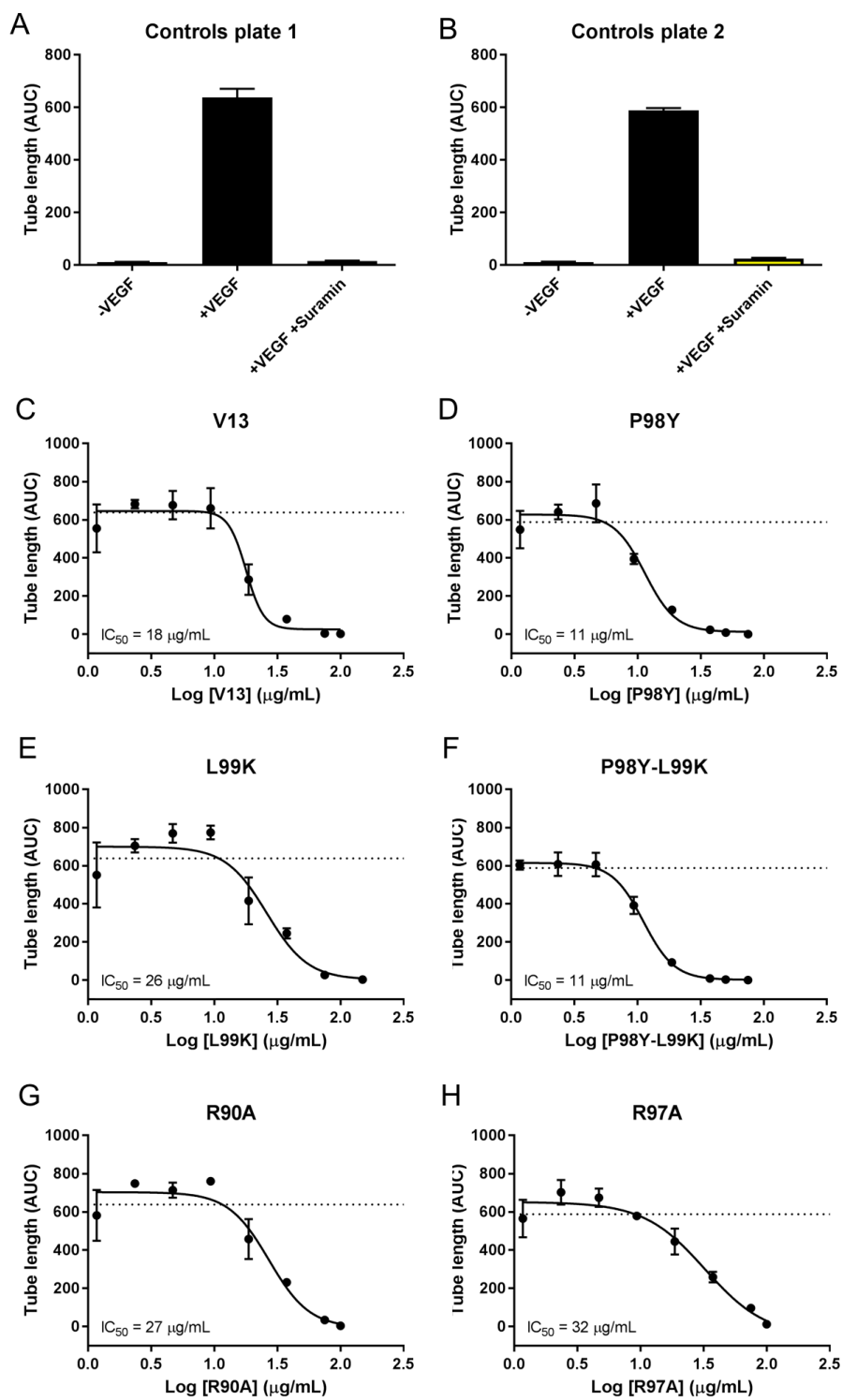


Figura 48 Efectos del tratamiento en la longitud de los tubos. Se monitoreó por 240 horas. Después de 48 horas de incubación, se agregaron los VNAR y el VEGF.

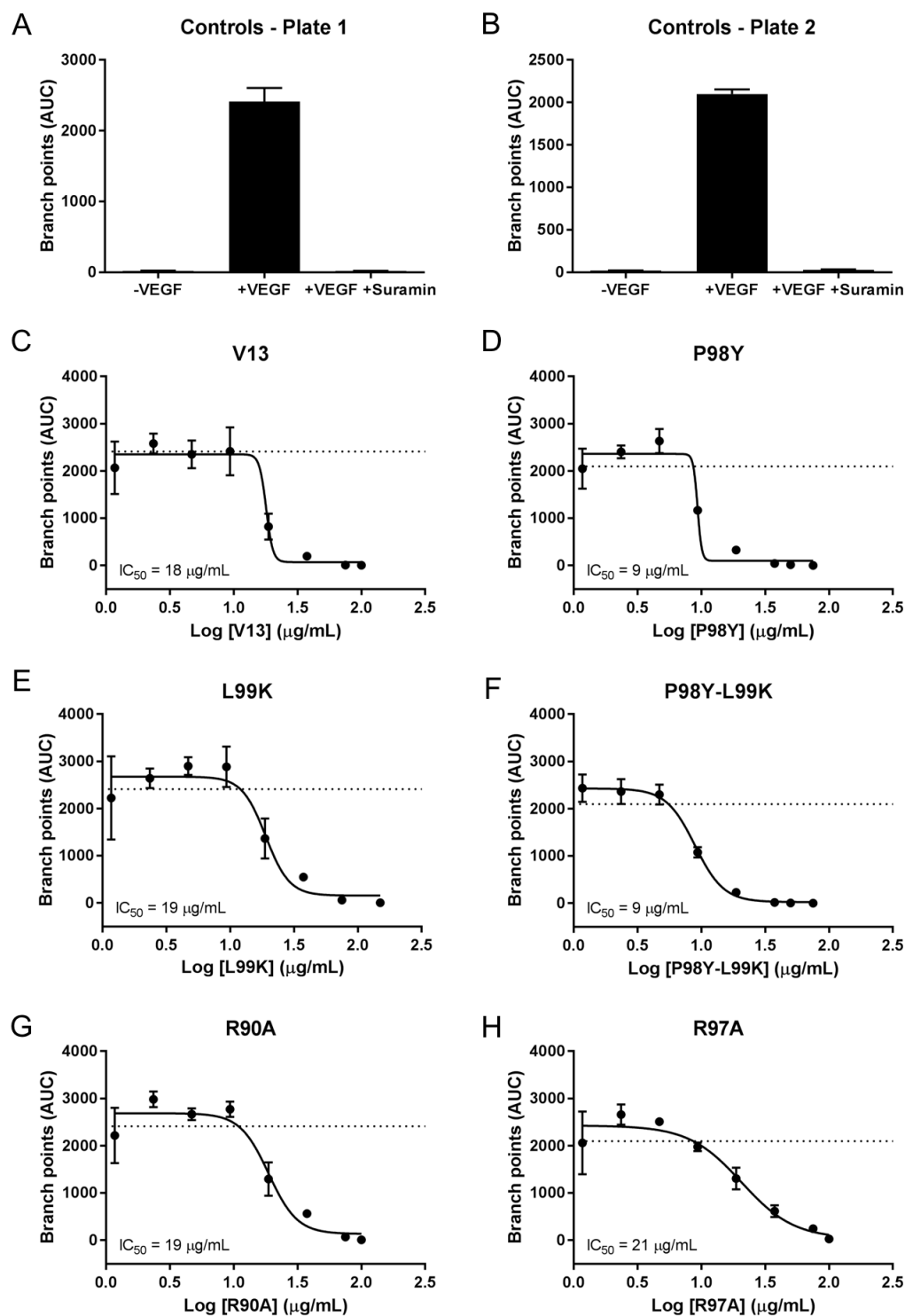


Figura 49 Efectos del tratamiento en los puntos de ramificación. Se monitoreó por 240 horas. Después de 48 horas de incubación, se agregaron los VNAR y el VEGF.

El análisis del área bajo la curva correspondientes a las Figuras 48 y 49, dio valores que demuestran la acción neutralizante del P98Y y el P98Y-L99K sobre el VEGF, al disminuir la concentración máxima inhibitoria necesaria para que el VEGF no promueva la formación de ramificaciones de túbulos vasculares (Tabla 11). La IC50 (concentración inhibitoria media) representa la concentración de un fármaco que es requerido para inhibir al 50%. En este caso, los tres VNAR mencionados, son los que menor concentración requieren para las condiciones de crear tubos y sus ramificaciones.

Tabla 11 Comparación de los valores de IC50 de la angiogénesis.

Compuesto	IC50 Angiogénesis: Largo de tubos (µg/mL)	IC50 Angiogénesis: Ramificación (µg/mL)
V13	18	18
P98Y	9	11
L99K	19	26
P98Y-L99K	9	11
R90A	19	27
R97A	21	33

Es importante mencionar que todos los compuestos analizados resultaron ser efectivos contra el VEGF, sin embargo, el P98Y y el P98Y-L99K resultaron especialmente efectivos de acuerdo a la cuantificación de la IC50.

3.7 Resultado de la evaluación del efecto de los VNAR *in vivo*

La evaluación *in vivo* de los VNAR se realizó utilizando grupos de ratones que fueron inoculados con células de cáncer de pulmón, esto con la finalidad de hacer crecer un tumor y evaluar el crecimiento vascular del mismo.

A partir de las imágenes obtenidas en cada evaluación, la angiogénesis se cuantificó en el tejido tumoral midiendo el largo de los vasos sanguíneos en formación en todos los campos bajo microscopía de fluorescencia. Todos los campos fueron medidos para calcular el total de largo de los vasos sanguíneos en

formación ND-GFP positivos. La densidad de los vasos fue calculada por el largo total de los vasos sanguíneos divididos por el área de tumor.

Los vasos sanguíneos que expresan ND-GFP, vascularizaron el tumor de pulmón (figura 50). El doble color observado en las imágenes se expresaron en los vasos sanguíneos y en el tumor de pulmón en ratones desnudos transgénicos ND-GFP. El tumor de pulmón que expresa RFP fue vascularizado por vasos sanguíneos que expresan ND-GFP cuando es implantado en el cuerpo del ratón. Como se puede observar en la imagen, los VNAR presentaron un fuerte efecto inhibitorio en la angiogénesis del tumor ND-GFP, especialmente porque podría tratarse de un tratamiento en estadios tempranos del tumor y metástasis. Estos resultados se reflejaron en la figura 51, donde se normalizaron los datos con respecto al control (PBS). Queda como evidencia la acción inhibitoria de los VNAR P98Y y P98Y-L99K de la angiogénesis tumoral, mismo resultados que fue expresado en los experimentos *in vitro*. No obstante, en este caso L99K mostró mejores resultados que los vistos *in vitro*, donde en comparación con P98Y su eficacia fue menor, pero muy parecida al VNAR parental.

Con respecto a la comparación de resultados con el control (PBS) y el VNAR parental (V13) los resultados obtenidos no evidencian diferencia alguna entre si, lo que significa que el control (PBS) tuvo un comportamiento similar al obtenido por el V13.

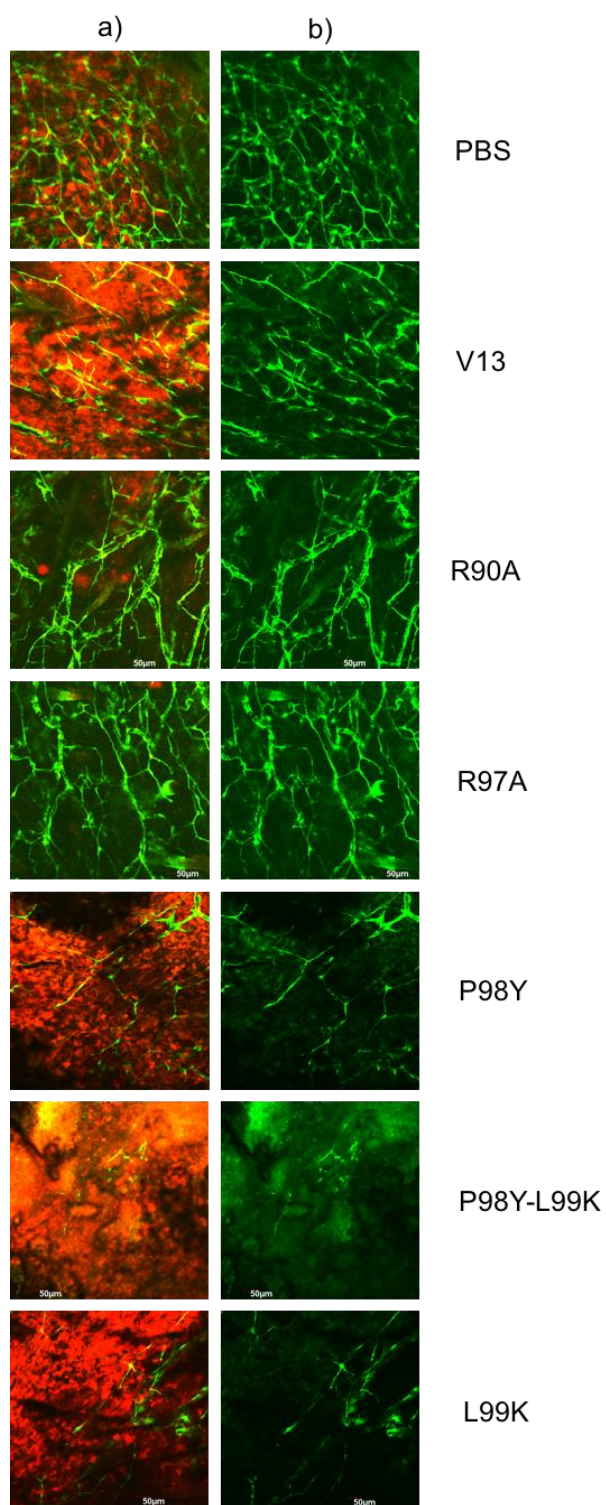


Figura 50 Fluorescencia de la angiogénesis tumoral en ratones desnudos transgénicos ND-GFP.

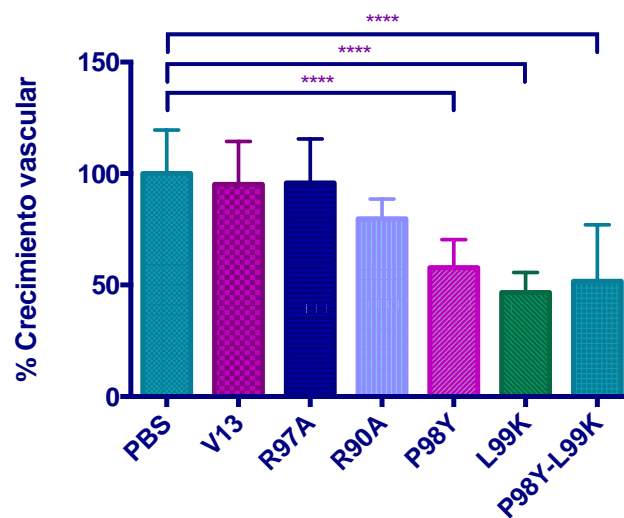


Figura 51 Comparación porcentual del crecimiento vascular con respecto al control. L99K muestra una reducción de casi el 50% del crecimiento vascular con respecto a VNAR parental, seguido del P98Y cuya efectividad se reflejó también en los experimentos in vitro.

Capítulo 4 Discusión

4.1 Mutaciones *in silico* y el sistema de expresión

Los resultados obtenidos de la modelación *in silico* se basaron en las energías de interacción entre el VNAR y el VEGF, teniendo como base el complejo IgNAR-AMA1. El objetivo fue mejorar estas energías cambiando aminoácidos clave para la formación de puentes de hidrógeno. El *loop* de reconocimiento es la zona del V13 que interacciona con el VEGF y se encuentra comprendida entre los residuos 85-110. El patrón de interacciones dado en el *docking*, señala interacciones fuertes en el extremo del *loop* de reconocimiento y en la base de éste. Por lo anterior, el término “mutante positiva” equivale a una mutación favorable desde el punto de vista energético que mejora la estabilidad de la proteína. Y tiene mayor interacción con el VEGF. Caso contrario, la “mutante negativa” tendría un efecto negativo sobre la estabilidad de la proteína, afectando su unión al VEGF.

Cuando se analizó el complejo control IgNAR-AMA1, se encontraron interacciones muy fuertes que en V13 existían con el VEGF. Por lo tanto, el objetivo fue mimetizar esas interacciones, y de ser posible mejorarlas para formar nuevos puentes de Hidrógeno. La primera mutante positiva (P98Y), donde el cambio fue de Prolina a Tirosina en la posición 98, produjo la aparición de un puente de hidrógeno con el Glutamato 51 del VEGF, y como consecuencia la interacción entre Arginina 90 del V13 y Leucina 84 del VEGF se volvió mayor. Cuando la Prolina se cambia por la Tirosina, se está sustituyendo una estructura cíclica por una aromática, que coinciden en hidrofobicidad y en comportamiento estructural, sin embargo, la tirosina tiene un hidroxilo que pende del anillo y que lo hace débilmente ácido, por lo que puede quedar como parte de la superficie de la proteína y no internalizado como el iminoácido. El -OH presente, abre la posibilidad de interactuar como puente de hidrógeno en contacto con el ácido glutámico en posición 51 del VEGF. En el VNAR, la presencia de la Prolina impide que exista un puente de Hidrógeno, pues su estructura lo limita a interactuar en la formación del enlace peptídico.

La segunda mutante positiva (L99K) implicó el cambio de Leucina por Lisina en posición 99 del V13. El objetivo fue crear nuevas interacciones que en presencia de la Leucina no existían. Con la Leucina en la estructura, la falta de interacciones podría haber sido el resultado de su hidrofobicidad. El cambio a Lisina incluye cierta anfipaticidad proveniente de los metilenos de la cadena lateral y del final de la cadena lateral, positivamente cargada, para crear fuerzas de van der Waals. La interacción que surge de este cambio involucra a la Glutamina del VEGF en posición 24.

La doble mutante propuesta (P98Y-L99K), incorporó ambas mutaciones positivas. Esta no fue evaluada en el *docking*, sin embargo, su objetivo es beneficiarse de las ventajas de ambas mutaciones en una sola molécula. Los experimentos *in vitro*, demostraron que esta lógica no resultó necesariamente cierta, ya que la presencia de la Tirosina parece ser la razón del éxito de esta doble mutante, igual que fue visto en la primera mutante positiva (P98Y). Una propuesta sería realizar el *docking* de esta última y ver el resultado de las energías de interacción.

Por otro lado, se crearon mutantes negativas con modificaciones capaces de eliminar interacciones importantes en el reconocimiento del VEGF. La primera mutante negativa se originó con el cambio de Arginina por Alanina en posición 90. Originalmente la interacción de la Arginina 90 con el ácido glutámico 60 proveía de un doble puente de hidrógeno y su mutación los elimina. El *loop* de reconocimiento al tener la mutación puede desplazarse hacia fuera del sitio de unión y el anticuerpo adquiere una forma curva. Todo esto se observó durante el ensayo de interacción *in silico*.

Con base en la estructura química de la Arginina, el grupo funcional guanidino, le da posibilidad de crear dos uniones y en este caso las crea con el ácido glutámico 60 del VEGF, la carga positiva del primero unido con la carga negativa del segundo. Estructuralmente hablando, es una relación perfecta. Sin embargo, una mutación en esta región cambia la forma del anticuerpo. El estudio energético de la mutación muestra una pérdida de energía de -40 kcal/mol. Esta misma mutación también tiene efecto en otras interacciones y el estudio de interacción predice que haya una pérdida de unión de la lisina 92 con el ácido glutámico 54, desestabilizando el puente de hidrógeno entre ellos. La Alanina como sustituta de la estructura tiene posibilidades limitadas, el grupo metilo no admite interacciones con otros aminoácidos.

La segunda mutante negativa (R97A) mantiene el cambio de Arginina por Alanina, pero en posición 97 y con ella queda establecida la importancia que tiene la interacción Arginina-Ácido glutámico con la formación de puentes de Hidrógeno. Es una combinación perfecta de estabilidad, sin embargo, una mutación en posición 97 no parece afectar de manera global la interacción entre el VNAR y el VEGF, tanto como lo hace la mutación en posición 90.

Entender la importancia de los estudios *in silico* de las moléculas, como un proceso de predicción, nos acerca a un resultado que ahorra tiempo, dinero y esfuerzo. Sin embargo, tal como vimos, no siempre son resultados certeros. Pero la sola reducción de las posibilidades resulta ya en sí ventajosa. La afinidad de una mutante (P98Y-L99K) no fue medida, pero el procedimiento de reconocimiento *in vitro* bastó para clasificar como exitosas algunas de las mutantes. De hecho, el ensayo de formación de estructuras

tubulares identificó a todas las mutantes como “exitosas” en comparación con la molécula parental, aunque en diferentes grados de éxito.

A pesar de no haber sido considerado un parteaguas en este trabajo, la expresión de las proteínas resultó uno de los estancamientos más importantes. Inicialmente, la expresión del gen parental (VNAR V13) se realizó en BL21(DE3), utilizando el vector pComb3x. La evaluación de la expresión se realizó utilizando los extractos tanto periplásmicos como citoplásmicos, no obstante, fue en esta última donde se encontró mayor cantidad de proteína. Se utilizó la técnica de extracción periplásmica para el vector (pComb3x) que posee la secuencia PelB ayudando al traslado de las proteínas al periplasma. Sin embargo, el hecho de encontrarla en mayor cantidad en citoplasma, hace inferir que alguna de las condiciones estaba estresando a la bacteria y la proteína se podría haber estado acumulando en cuerpos de inclusión. Un promotor *lac* se induce con IPTG, mismo que resulta poco viable a escalas mayores por los costos generados, así como por la toxicidad del inductor. La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* es 37°C, sin embargo, existe evidencia de que a temperaturas menores es posible obtener mayor producción de proteína. En general, la expresión llevada a cabo por un promotor *lac* es baja con respecto a otros sistemas. Uno de los aspectos más importantes resultado de la expresión, es la obtención de proteínas solubles, bien plegadas y funcionales. Se realizaron pruebas del sistema de expresión a 20°C y no fue posible observar mejoras en la producción. Una opción hubiera sido crecer el cultivo a 37°C y posteriormente expresar a una temperatura menor, lo que daría probablemente un mejor plegamiento y la disminución de la formación de cuerpos de inclusión. Zielonka (2015) evaluó la maduración de VNAR, mejorando así su afinidad, sin embargo, encontró que la estabilidad térmica se afectaba. Un efecto negativo que también fue observado en este trabajo, cuya temperatura ideal de mantenimiento fue 4°C, viendo disminuido a 20°C.

El cambio de vector de expresión utilizando pET-28a(+) resultó en un sistema mejorado, donde el rendimiento fue más alto, sin embargo, una expresión muy alta es una condición de estrés para la célula que puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión. El análisis de las fracciones soluble e insoluble demostraron que la mayor cantidad de proteína quedaba retenida como insoluble y para purificarla fue necesario desnaturalizarla. Este proceso puede resultar en la pérdida de funcionabilidad, debido a que un mal replegamiento podría dejar al CDR3 fuera de contacto con su epítipo. Es por ello que una vez purificadas, las proteínas de ambas fases (soluble e insoluble) fueron evaluadas con un ELISA, utilizando VEGF para verificar su actividad. Los resultados de ambas fases demostraron que la renaturalización fue correcta.

Si se comparan los rendimientos obtenidos para cada VNAR mutante y el del gen original, es posible observar que varían ampliamente. De hecho, las mutantes P98Y y P98Y-L99K tienen rendimientos muy por debajo del original, más no así de la L99K.

4.2 Reconocimiento *in vitro* del VEGF₁₆₅

El éxito de las modificaciones *in silico* fue demostrado con la neutralización del VEGF en ensayos *in vitro*. Quedó claro que los VNAR modificados fueron capaces de unirse al VEGF con diferente fuerza. No se puede hablar de una afinidad en específico ya que no fue medida, pero indirectamente el ELISA de reconocimiento ofrece un acercamiento a este resultado. Mejorar la capacidad de neutralización empleando la técnica *in silico* es una muestra más de la aplicación certera que se puede tener con esta metodología. Sin embargo, es necesario determinar la afinidad con una técnica más fina. El objetivo de este trabajo era mejorar las características de unión de la molécula parental (V13) y fue cumplido. Los ensayos para determinar la inhibición de la angiogénesis utilizando las mutantes obtenidas son una clara muestra de que las mutaciones realizadas en el CDR3 nos permiten el mejoramiento de la capacidad de neutralización del VEGF. Es probable que el hecho de que las mutaciones no tocan los enlaces disulfuro, no afectó el movimiento del *loop* de unión y al contrario, adquirió nuevas características de unión con el VEGF. De acuerdo a la clasificación de los VNAR, existen alteraciones de estructura relacionadas a la posición de cisteínas en el CDR3 (Dooley y Flajnik, 2006), pero en este caso sólo existen mutaciones en las regiones estructurales, así que la elección de diferentes aminoácidos para encontrar nuevas formaciones fue la estrategia idónea.

De los resultados obtenidos en el ensayo de angiogénesis *in vitro*, se destaca la confirmación del resultado positivo por parte de la mutante P98Y, que mostró inhibir de una forma significativa la formación de tubos, esto a pesar de la estimulación que representó la presencia del VEGF.

Los VNAR son estructuras muy independientes del ambiente en el que residen las células HUVEC. Los VNAR son el resultado evolutivo de las más duras condiciones ambientales que puede sufrir un anticuerpo. Por ello, sus características de resistencia son objeto de muchas investigaciones (Griffiths *et al.*, 2013). Zielonka (2015) evaluó la estabilidad térmica de varios VNAR y encontró que presentaron T_m arriba de 75°C, lo que indica una resistencia muy buena a altas temperaturas. Sin embargo, esta estabilidad se ve mermada cuando existen cambios estructurales (en residuos) que aumentan la afinidad por su

molécula blanco. Bajo esta misma premisa, lo observado tanto con las mutantes positivas como negativas, es que el almacenamiento a 4°C en un periodo largo, resulta en la aparición de bandas de menor peso molecular, que podría indicar la fragmentación de la molécula. Como cualquier anticuerpo convencional, las temperaturas -20°C y -80°C no resultan idóneas para mantener a los VNAR (anexo II). Es indispensable realizar pruebas a temperaturas mayores, para conocer la T_m de cada una de las mutantes y así completar el perfil térmico de las moléculas.

A nivel celular, coincide el efecto que tiene la mutante P98Y tanto en el ELISA de reconocimiento como en la inhibición de la angiogénesis. El efecto difiere con la doble mutante P98Y-L99K, cuyo efecto sólo se logró observar en las células HUVEC.

4.3 Evaluación *in vivo* de la neutralización del VEGF₁₆₅

El cambio de evaluación de un ente con potencial farmacéutico resulta muchas veces en resultados totalmente diferentes. En el caso de los anticuerpos convencionales, es posible observar que su eficacia se ve limitada por su tamaño y complejidad estructural. Sin embargo, el descubrimiento de los VNAR resuelve en gran medida este problema. Teóricamente un anticuerpo de mayor tamaño limita su movilidad, haciendo que su vida media en sangre sea mayor. La capacidad neutralizante de los VNAR obtenidos por modificaciones *in silico* fue exitosa tanto en el reconocimiento como en el bloqueo del crecimiento de vasos sanguíneos *in vitro*. La tendencia de estos resultados es similar a los obtenidos en experimentos *in vivo*. La diferencia la presentó L99K, cuyos resultados *in vivo* sobresalen por encima de P98Y. Una de las causas probables de esos resultados podría estar relacionado con diferentes estadios inmunológicos de la molécula blanco (VEGF) cuando se encuentra en un sistema vivo. Un mismo anticuerpo puede funcionar o no dependiendo de los procesos que pueda recibir su molécula blanco. Un ejemplo de diferencia de comportamientos es el encontrado por Spiridon *et al.*, (2004) quienes realizaron una comparación de la actividad entre IgGs y fragmentos Fab *in vitro* e *in vivo*, encontrando que *in vitro* tenían efectos antiproliferativos muy similares, mientras que *in vivo* los IgGs tenían mejor actividad antitumoral que los Fab que necesitaban dosis de hasta 5 veces para compensar su tiempo de vida corto. Esta misma diferencia se pudo observar en esta tesis, destacando que L99K fue mejor que P98Y, cuyos resultados fueron muy exitosos en procedimientos *in vitro*. Cuando las variables aumentan, el comportamiento de los VNAR puede ser distinto. La presencia de enzimas, proteínas sanguíneas, pH y otras moléculas de la sangre, es un ambiente que puede tener gran influencia en las propiedades

fisicoquímicas de los anticuerpos (Correia, 2010). Horton *et al.*, (2008) encontraron que los anticuerpos monoclonales que evaluaron perdían efectividad *in vivo*, ya que se habilitaban funciones efectoras que les evitaba llegar a su molécula blanco y terminaban no inhibiendo la tumoración. Ya que se trata de un dominio sencillo, los VNAR no se relacionan con funciones efectoras dentro de los organismos, centrando su acción en su molécula blanco.

Como proyección a los experimentos que pudieran realizarse, sería la obtención de la afinidad de cada mutante para poder compararla con fármacos antiangiogénicos (anticuerpos monoclonales) comerciales.

Capítulo 5 Conclusiones

1. Se generaron *in silico* cinco estructuras mutantes derivadas de V13, todas con la capacidad de neutralizar *in vitro* en mayor o menor medida, al VEGF.
2. Tanto la mutante P98Y como P98Y-L99K tuvieron un reconocimiento superior a V13 por el VEGF, indicando que la mutación importante es el cambio de la prolina por tirosina, ya que la mutación L99K no presentó mejor actividad *in vitro* que la parental V13.
3. La acción de L99K para inhibir la formación de vasos sanguíneos durante la angiogénesis *in vivo*, demuestra que es muy superior a la molécula parental (V13), mientras que P98Y y P98Y-L99K tuvieron el efecto necesario para que los resultados *in silico* se comprobaran, y fueran las mutaciones positivas mejores para neutralizar al VEGF que el V13.

Literatura citada

- Abbas AK, Litchman AH, Pillaj S. 2008. Inmunología celular y molecular. 6ta edición. Elsevier Saunders.
- Adair TH, Montani JP. 2010. Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sci-hub.org/books/NBK53242/>
- Aguillón JC, Contreras J, Dotte A, Cruzat A, Catalán D, Salazar L, Molina MC, Guerrero J, López M, Soto L, Salazar-Onfray F, Cuchacovich M. 2003. Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica. *Rev Méd Chile*. 131: 1445-1453.
- Alzogaray VA. 2010. Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.
- Barelle C, Gill DS, Charlton K. 2009. Shark novel antigen receptors: the next generation of biologic therapeutics? *Adv Exp Med Biol*, 655: 49-62.
- Barelle C, Porter A. 2015. VNARs: An Ancient and Unique Repertoire of Molecules That Deliver Small, Soluble, Stable and High Affinity Binders of Proteins. *Antibodies*, 4: 240.
- Camacho-Villegas T.A. 2007. Obtención de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo V_HNAR del tiburón *Heterodontus francisci* neutralizantes de las citocinas TNF- α y VEGF₁₆₅. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Campbell, N. E., Kellenberger, L., Greenaway, J., Moorehead, R. A., Linnerth-Petrik, N. M., & Petrik, J. 2010. Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis. *Journal of oncology*, (2010)1-13.
- Carmeliet P, Collen D. 2000. Molecular basis of angiogenesis, role of VEGF and VE-cadherin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902: 249-262.
- Correia IR. 2010. Stability of IgG isotypes in serum. *mAbs*. 2(3):221-232.
- Criscitello MF, Saltis M, Flajnik MF. 2006. An evolutionarily mobile antigen receptor variable region gene: Doubly rearranging NAR-TCR genes in sharks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(13):5036-5041.
- Crivellato E. 2011. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *Int J Dev Biol*. 55(4-5): 365-375.
- Deng R, Jin F, Prabhu S, Iyer S. 2012. Monoclonal antibodies: what are the pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drug development?. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 8(2): 141-160. doi: 10.1517/17425255.2012.643868.
- Dooley H, Flajnik MF, Porter AJ. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular immunology*. 40(1):25-33.
- Dooley H, Flajnik MF. 2006. Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Developmental and comparative immunology*. 30(1-2):43-56.

- Dooley H, Stanfield RL, Brady RA, Flajnik MF. 2006. First molecular and biochemical analysis of *in vivo* affinity maturation in an ectothermic vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6):1846-1851.
- Dooley H, Flajnik MF. 2005. Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *European Journal of Immunology*, 35, 936-945.
- Dvorak HF. 2005. Angiogenesis: update 2005. *J. Thromp. Haemost.*, 3(8), 1835-1842.
- Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Shimizu Y, Kessler H, Hendershot LM, Buchner J. 2009. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Molecular cell*, 34(5):569-579.
- Ferrara N. 2002. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 29: 10-14.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 18, 4-25.
- Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161, 851-858.
- Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676.
- Flajnik MF, Deschacht N, Muyldermans S. 2011. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? *PLoS biology*. 9(8):1001120.
- Folkman J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6), 15-18.
- Folkman J, Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science*. 235, 442-447.
- Fuh G, Wu P, Liang WC, Ultsch M, Lee CV, Moffat B, Wiesmann C. 2006. Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the Avastin Fab. *J Biol Chem*. 281(10): 6625-6631.
- Goodsell DS. 2003. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Fundamentals of Cancer Medicine*. 21(1): 118-119.
- Greenberg A, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney E, Flajnik M. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversifications in sharks. *Nature*. 374(6518), 168-173.
- Griffiths K, Dolezal O, Parisi K, Angerosa J, Dogovski C, Barraclough M, Sanalla A, Casey JL, González I, Perugini MA, Nuttall S, Foley M. 2013. Shark Variable New Antigen Receptor (VNAR) Single Domain Antibody Fragments: Stability and Diagnostic Applications. *Antibodies*, 2(1): 66-81.
- Hoogenboom HR, de Bruijne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1):1-20.

- Horton HM, Bennett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, Richards JO, Vostiar I, Joyce PF, Repp R, Desjarlais JR, Zhukovsky EA. 2008. Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res.* 68(19):8049-57.
- Hsu E, Pulham N, Rumfelt LL, Flajnik MF. 2006. The plasticity of immunoglobulin gene systems in evolution. *Immunological reviews*, 210: 8-26.
- Ito N, Claesson-Welsh L. 1999. Dual effects of heparin on VEGF binding to VEGF receptor-1 and transduction of biological responses. *Angiogenesis*, 3(2): 159-166.
- Knight DM, Wagner C, Jordan R, McAleer MF, DeRita R y Fass DN. 1995. The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions. *Mol Immunol.* 32: 1271-1281.
- Kovaleva M, Ferguson L, Steven J, Porter A, Barelle C. 2014. Shark variable new antigen receptor biologics - a novel technology platform for therapeutic drug development. *Expert opinion on biological therapy.* 1-13.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goedel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246, 1306-1309.
- Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstine M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K y McCabe JG. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature.* 28;368(6474):856-9.
- Martínez-Ezquerro JD, Herrera LA. 2006. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología.* 1: 83-96.
- Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 112(RE21): 1-17.
- Muller MR, Saunders K, Grace C, Jin M, Piche-Nicholas N, Steven J, O'Dwyer R, Wu L, Khetemenee L, Vugmeyster Y, Hickling TP *et al.* 2012. Improving the pharmacokinetic properties of biologics by fusion to an anti-HSA shark VNAR domain. *mAbs.* 4(6):673-685.
- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM y Dvorak HF. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 196: 1497-1506.
- Nuttall SD, Humberstone KS, Krishnan UV, Carmichael JA, Doughty L, Hattarki M, Coley AM, Casey JL, Anders RF, Foley M, Irving RA, Hudson PJ. 2004. Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting Plasmodium falciparum AMA1. *Proteins*, 55(1), 187-197.
- Nuttall SD, Krishnan UV, Doughty L, Alley N, Hudson PJ, Pike RN, Kortt AA, Irving RA. 2002. A naturally occurring NAR variable domain against the Gingipain K protease from Porphyromonas gingivalis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 516, 80-86.
- Ohta Y, Flajnik M. (2006). IgD, like IgM, is most primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *PNAS*, 103 (28): 10723-10728.

- Restucci B, Maiolino P, Paciello O, Martano M, De Vico G, Papparella S. 2003. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. *J. Comp. Pathol.*, 128, 252-259.
- Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, Revets H, De Haard HJ, Van Bergen en Henegouwen PM. 2007. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol*, 56:303-317.
- Rumfelt LL, Avila D, Diaz M, Bartl S, McKinney EC, Flajnik MF. 2001. A shark antibody heavy chain encoded by a nonsomatically rearranged VDJ is preferentially expressed in early development and is convergent with mammalian IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(4):1775-1780.
- Saerens D, Ghassabeh GH, Muydermans S. 2008. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8(5), 600-608.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ra edición. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandhu JS. 1992. Protein engineering of antibodies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(5/6): 437-462.
- Semenza G. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.*, 64, 993-998.
- Shibuya, M. 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*, 26, 25-35.
- Smith SL, Sim RB and Flajnik MF Eds. 2015. *Immunobiology of the Shark*. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton, FL.
- Spannuth WA, Sood AK, Coleman RL. 2008. Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*, 5, 194-204.
- Spiridon CI, Guinn S, Vitetta ES. 2004. A Comparison of the *in Vitro* and *in Vivo* Activities of IgG and F(ab)₂ Fragments of a Mixture of Three Monoclonal Anti-Her-2 Antibodies. *Clinical Cancer Research*. 10:3542-3551.
- Stanfield RL, Dooley H, Flajnik MF, Wilson IA. 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science*. 305(5691):1770-1773.
- Stanfield RL, Dooley H, Verdino P, Flajnik MF, Wilson IA. 2007. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: Evidence for induced-fit binding. *Journal of molecular biology*. 367(2):358-372.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 15;65(3):550-563.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham J. A. 1991. *J. Biol. Chem.*, 266(18), 11947-11954.
- Vicenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93(8), 1493-1495.

- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455.
- Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO. 2009. Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *PCM*, 16 (7): 572-592.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242-248.
- Zetter BR. 1998. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.*, 49, 407-424.
- Zielonka S. 2015. The shark strikes twice: Generation of mono- and bi-specific high affinity VNAR antibody domains via step-wise affinity maturation. Tesis de Doctorado. Technischen Universität Darmstadt.
- Zielonka S, Empting M, Grzeschik J, Könning D, Barelle CJ, Kolmar H. 2015. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs*, 7(1), 15-25.
- Zielonka S, Empting M, Könning D, Grzeschik J, Krah S, Becker S, Dickgieber S, Kolmar H. 2015. The shark strikes twice: hypervariable loop 2 of shark IgNAR antibody variable domains and its potential to function as an autonomous paratope. *Mar. Biotechnol.*, 17(4), 386-392.

Anexos

Modelación de la mutación dirigida del gen V13

El análisis de la unión del VNAR V13 con el VEGF₁₆₅ para la generación de mutantes se evaluó con base en las interacciones entre las cadenas del complejo IgNAR y AMA1. La Figura 51 representa la imagen del complejo con sus principales interacciones.

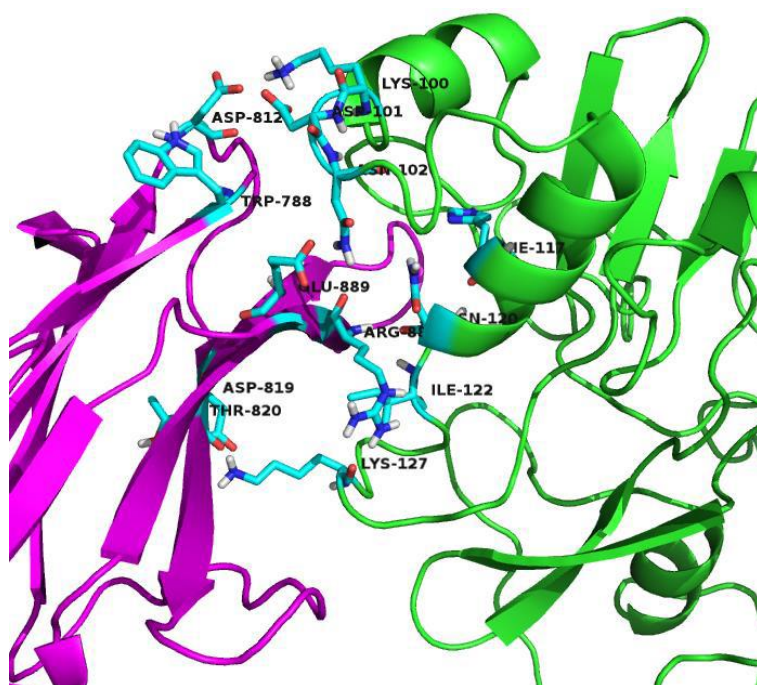


Figura 52 Imagen tridimensional de los principales residuos en la interacción del complejo AMA1-IgNAR.

En cuanto a la estabilidad estructural del VEGF, se hicieron simulaciones de superposición estructural inicial y final del VEGF (Figura 52).

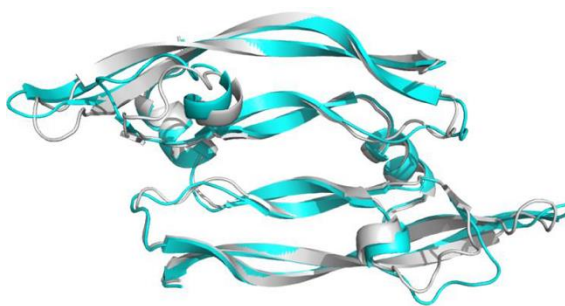


Figura 53 Superposición de la estructura inicial (gris) y final de la dinámica (cian) de VEGF.

De acuerdo a la estabilidad energética de los modelos durante la simulación y de los cambios estructurales que sufre, se agruparon las conformaciones que V13 optimizado toma durante la simulación para elegir la que sea más conveniente para realizar el *docking* con el VEGF. Las conformaciones obtenidas se muestran en la tabla 12.

Tabla 12 Conformaciones tomadas por VNAR V13 a lo largo de la simulación.

	Conformación	Numero de estructuras	Tiempo de existencia (ns)
1		158	3,2
2		1821	36,3
3		203	4,0
4		2074	41,4
5		756	15,1

La diferencia entre las cinco posibles conformaciones de la tabla 12 es la forma del *loop* de reconocimiento, empezando la dinámica con estructuras que tienen el *loop* replegado sobre el resto de la

proteína (conformaciones 1 y 2) a estructuras con el *loop* estirado y expuesto al solvente (conformaciones 3, 4 y 5) que son las que interesan al momento de hacer el *docking*.

Se eligió la conformación 4 por tener el *loop* de reconocimiento bastante estirado, además de ser el estado conformacional más representado y el que más tiempo está estable.

Para el *docking* proteína-proteína VNAR V13-VEGF, se estudiaron cuatro posibles modelos de interacción y se analizaron sus energías dinámicas moleculares. Partiendo de las estructuras originales del VEGF y del V13, se escogieron los resultados que tenían zonas de unión y orientación óptimas. Se aislaron cuatro modos de unión entre VEGF y V13, las cuales abarcan las principales orientaciones. De los cuatro modelos se realizó la dinámica molecular como base de estudio de su estabilidad estructural y energética.

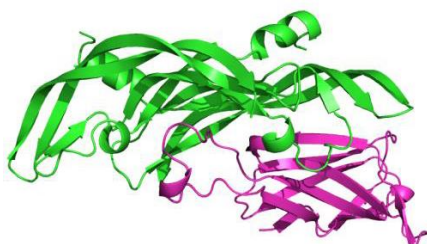


Figura 54 Modelo 1 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).

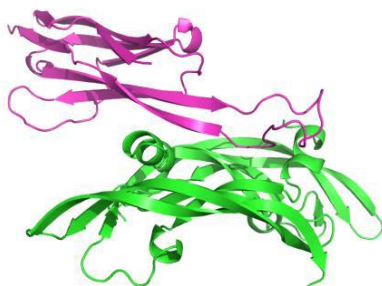


Figura 55 Modelo 2 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).

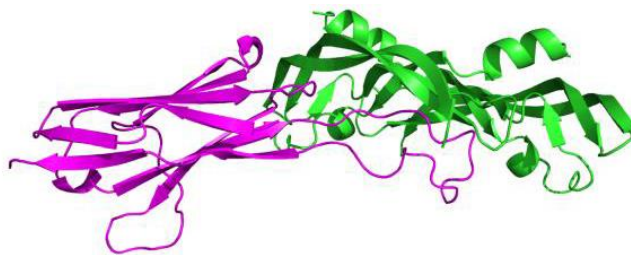


Figura 56 Modelo 3 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).

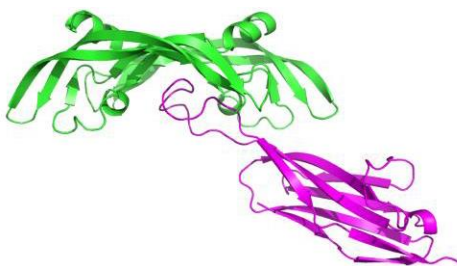


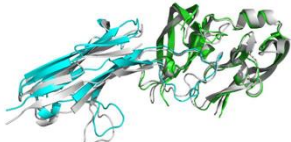
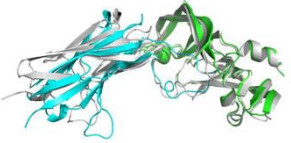
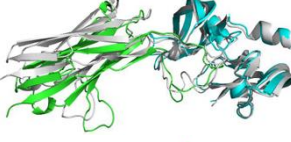
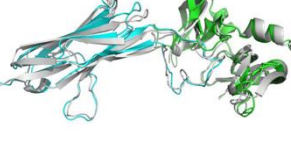
Figura 57 Modelo 4 del complejo VEGF (cadenas en verde) con VNAR V13 (cadena en magenta).

En el modelo 1 (Figura 53) se encontraron con cinco interacciones muy fuertes de tipo puente de hidrogeno y puente salino en el extremo del *loop* de reconocimiento (V13-Arg97 con VEGF(B)-Glu51 y VEGF(A)-Asp21) y en la base y zona media de este estabilizando la unión (V13-Arg90 con VEGF(B)-Glu60, V13-Arg91 con VEGF(B)-Glu25 y V13-Lys92 con VEGF(B)-Glu54).

En el modelo 2 (Figura 54) las interacciones no son tan fuertes como en el modelo 1, pero se reparten más por todo V13. Observamos interacciones en la base del *loop* de reconocimiento (residuos Arg91 y Met106, Gly107, Tyr108 y Ser111) y en las láminas β anteriores a él (residuos Phe32, Asp112). En el modelo 3 (Figura 55) se volvió a encontrar el mismo patrón de interacciones que en el modelo 1: interacciones fuertes en el extremo del *loop* de reconocimiento (V13-Arg97 con VEGF(A)-Glu54 y V13-Asn101 con VEGF(A)-Lys94) y en la base de este estabilizando la unión (V13-Arg90 con VEGF(A)-Glu60, V13-Arg91 con VEGF(A)-Glu25, V13-Lys92 con VEGF(A)-Glu54 y VEGF(A)-Cys55 y V13-Tyr108 con VEGF(A)-Glu25). Por último, en el modelo 4 (Figura 56) se repiten las interacciones del modelo 1 y del modelo 3 pero mucho más débiles.

Se eligió el modelo 3 como modo de unión entre VEGF y V13 ya que posee buena estabilidad estructural, no hay grandes fluctuaciones en la zona de unión entre ambas proteínas, y la dinámica esta en equilibrio en cuanto a valores de RMSD se refiere y es la que presenta un mejor valor de energía total al final de la dinámica. Además, es el modelo que mejor patrón de interacciones tiene. Con base en esta información y observando la estructura de los modelos, se propusieron cuatro mutaciones agrupadas en dos tipos: positivas y negativas (Tabla 13). Las positivas buscan aumentar la afinidad (disminuir la energía de interacción) entre VEGF y V13, mientras que las negativas buscan disminuir la afinidad (aumentar la energía de interacción). Estas últimas tienen como objetivo la validación del modelo propuesto, ya que de confirmarse experimentalmente la pérdida de funcionalidad del anticuerpo se reforzaría la idea de que el modelo de unión predicho es el correcto.

Tabla 13 Resumen de las mutantes propuestas para se evaluadas.

		Cambio de:	Por:	Estructura
Positivas	Mutante 1	Prolina 98	Tirosina 98	
	Mutante 2	Leucina 99	Lisina 99	
Negativas	Mutante 3	Arginina 90	Alanina 90	
	Mutante 4	Arginina 97	Alanina 97	
	Mutante 5		Mutaciones positivas juntas	

Material

Cepas bacterianas, líneas celulares

- ER2738 [F'proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10 (tetr)] fhuA2 glnVΔ(lac-proAB) thi-1Δ(hsdS-mcrB)5
- NEB Express : fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10
- BL21 (DE3) : fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS; λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5
- HUVEC (Human umbilical vein endotelial cells): ATCC® PCS-100-010™
- Essen BioScience CellPlayer Angiogenesis PrimeKit

Plásmidos

Para llevar a cabo la expresión de las proteínas correspondientes, se utilizó el vector pComb3x (Figura 57). El vector pComb3x es un vector fagémido que es utilizado para la expresión, detección y purificación de proteínas solubles después del despliegue de fagos. Consta de 3451 bases, conteniendo el promotor LacZ, codifica para la etiqueta de hemaglutinina de la influenza HA, la etiqueta de histidinas, codón de paro y resistencia a ampicilina (Barbas *et al.*, 2001).

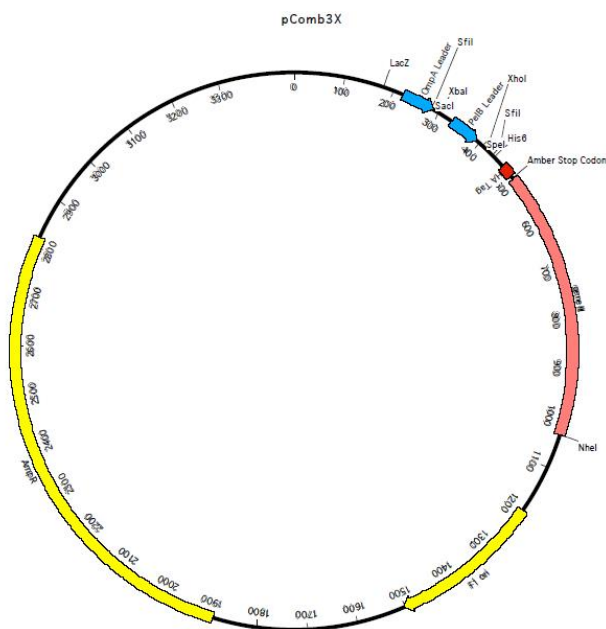


Figura 58 Vector pComb3x. <http://www.creative-biogene.com/pComb3X-vector-VPT4012-1232908-74.html>

Para la producción a gran escala, se utilizó el vector pER-28a(+) de Novagen con 5369 bases y promotor T7 con resistencia a kanamicina (Figura 58).

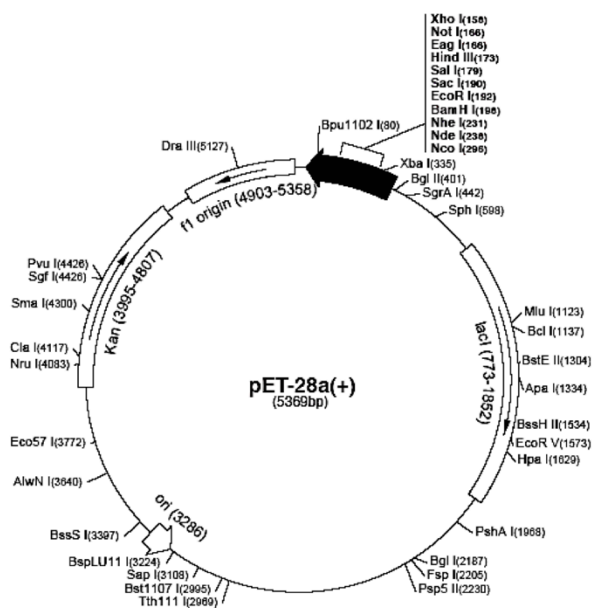


Figura 59 Mapa de expresión del vector pET-28a(+).

Enzimas, marcadores de ADN y proteínas

- DNA Ladder 100 pb y 1kb (Promega)
- Sfil HC (Promega)
- T4 Ligasa (Promega)
- BamHI
- VEGF165 (Peprotech)

Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia
For-VEGF13Opt7Sfil	GGCGGGGCCAGGCGCCATGGCAGCAAGCCTGGATCAAACCCCG
Rev- VEGF13Opt7Sfil	GTGGAGCAGGCCGGCCTGGCCTTGACCCGCTTGCCGTTACCGTCAGCAC
Omseq	AAGACAGCTATCGCGATTGCAG
gback	GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC

Soluciones, buffers y medios de cultivo

- Buffer de lisis: Tris-HCl 20mM, EDTA 2mM, NaCl 150mM.
- Buffer PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, pH 7.4.
- Buffer TBE 5X: Tris-HCl (60.5 g), ácido bórico (31 g), Na₂EDTA•2H₂O (3.7 g)
- Buffer TBST: Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM, Tween®20 0.1%, pH 7.6.
- dNTP's 2.5 mM: Poner 10 µL de cada dNTP 100 mM en 360 µL de agua estéril.
- Endothelial Cell Growth KitVEGF (ATCC® PCS100041™)
- Glucosa 1M esterilizada por filtración.
- Medio LB para placas: Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 11 g de agar en un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7 con NaOH. Esterilizar.
- Medio LB: Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 litro de agua destilada en un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7 con NaOH. Esterilizar.

- Medio SB: Disolver 32 g de triptona, 20 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7 con NaOH.
- Medio SOB: A 950 mL de agua desionizada, se adicionan 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl y 186 mg de KCl. Ajustar pH a 7 con NaOH. Esterilizar. Ya frío, adicionar 10 mL de MgCl₂ 1M.
- Medio SOC: Adicionar 1 mL de glucosa 1M estéril a 50 mL de medio SOB.
- Stock de carbenicilina: Disolver la cantidad de antibiótico necesaria para tener una concentración final de 100 mg/mL en agua destilada. Filtrar para esterilizar.
- Stock de tetraciclina: Disolver la cantidad de antibiótico necesaria para tener una concentración final de 20 mg/mL en etanol. Almacenar a -20°C en la oscuridad.