

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



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina**

**Obtención de anticuerpos tipo vNAR anti-PCSK9 de tiburón
*Heterodontus francisci***

Tesis

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

Presenta:

Wiliam Gendel Bernal Orozco

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por

Wiliam Gendel Bernal Orozco

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dra. María Teresa Viana Castrillón

Dr. Ricardo Alberto González Sánchez

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Wiliam Gendel Bernal Orozco © 2019

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 **Wiliam Gendel Bernal Orozco** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina.

Obtención de anticuerpos tipo vNAR anti-PCSK9 de tiburón *Heterodontus francisci*.

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

La hipercolesterolemia es la causa principal de enfermedades aterogénicas que concluyen en la reducción de la calidad de vida o la muerte en una gran población a nivel mundial. A consecuencia de los problemas de salud que causan los altos niveles de colesterol en sangre, se ha puesto especial énfasis en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a moléculas esenciales en el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad transportadoras de colesterol (cLDL). La proteína PCSK9 tiene una actividad importante al reducir los receptores de cLDL en hepatocitos, resultando en el aumento de cLDL en sangre, por lo que en este trabajo se propone el empleo de fragmentos tipo vNAR, para inhibir la unión de cLDL a PCSK9. Mediante el uso de una biblioteca sintética se pretendió expresar la proteína recombinante en *E.coli* cepa BL21.

Palabras clave: Hipercolesterolemia, colesterol, PCSK9, cLDL, LDLR y HepG2

Abstract of the thesis presented by **Wiliam Gendel Bernal Orozco** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine.

Obtention of shark *Heterodontus francisci* anti-PCSK9 like antibody.

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

Hypercholesterolemia is the main cause of atherogenic diseases that conclude in the reduction of quality of life or death in a large population worldwide. As a result of the health problems caused by high levels of cholesterol in the blood, special emphasis has been placed on the development of new therapies aimed at essential molecules in the metabolism of low-density lipoprotein cholesterol transporters (LDL-c). The PCSK9 protein has an important activity in reducing LDL-c receptors in hepatocytes, resulting in the increase of LDL-c in blood, so in this work the use of vNAR fragments is proposed, to inhibit the binding of LDL-c to PCSK9. By using a synthetic library, it is intended to express the recombinant protein in E. coli strain BL21.

Keywords: Hipercholesterolemia, cholesterol, PCSK9, LDL-c, LDLR and HepG2

Dedicatoria

A todas las personas que luchan constantemente, atados a una condición física que les impide realizar las actividades que más aman.

A todas aquellas personas que por diferentes motivos, se les negó o les fue imposible recibir un tratamiento contra la hipercolesterolemia.

A todos aquellos que por negligencia médica y/o legal no recibieron el tratamiento adecuado, para aliviar su padecimiento.

A toda la comunidad científica que lucha día a día para disminuir la brecha entre la vida y una vida de calidad.

A todos mis estudiantes de Ensenada, Baja California por que siempre estuvieron al pendiente de mi seguimiento y me apoyaron para hacer mi curso académico – laboral, más satisfactorio y ameno.

Agradecimientos Profesionales

A CONACyT por la beca de maestría que me fue otorgada durante todo el periodo académico.

A CICESE por permitirme cursar mis estudios de maestría.

A la Dra. Rufina por ver en mi el potencial para formar parte de la generación 2016 – 2018.

Al Dr. Alexei Licea Navarro, por brindarme ciegamente la oportunidad de formar parte de su tan afamado y respetado equipo de trabajo.

A la Dra. Carolina Álvarez, por ser más que una guía académica, ser una guía moral y personal.

A mi comité: Dr. Alexei Licea, Dra. Carolina Álvarez, Dra. Rosa Mouriño, Dra. Tere Viana, Dr. Pablo Lazo y Dr. Ricardo González por brindarme su valioso tiempo para formar parte de mi equipo de sinodales y por todas sus sugerencias y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A mis estimados maestros de laboratorio: M.C Olivia Cabanillas Bernal y M.C Jahaziel Gasperín, que me dieron el maravilloso regalo de su conocimiento y experiencia en laboratorio, sin su guía esto no habría sido posible.

Al estimado equipo administrativo de Yolanda, Gabriela y Adriana que hicieron mi estancia en el departamento de innovación biomédica más alegre.

Y finalmente a todos los extraordinarios doctores que se encargaron de impartir tan magistrales cursos.

Agradecimientos Personales

Primeramente quiero agradecer a mis padres: Sr. Víctor Bernal y Sra. Herlinda Orozco, por que sin ustedes no sería la persona de la que me siento orgulloso.

A mis hermanos: Hans Bernal y Leslie Bernal por que ustedes son mi motivación todos los días, mejoro para hacerlos sentir orgullosos de su hermano.

A Isabel Hernández y Llia Bernal, por que su llegada me ha dado más impulso para mejorar constantemente.

A Yair Toríz, por que ha sido una travesía constante y un apoyo esepcional, mucho aprendizaje y mucho mejoramiento, día a día nos volvemos mejores personas.

A mis Tíos el Dr. Raúl Bernal y el Ing. Miguel Guerra, por que desde que pisé tierra bajacaliforniana han sido mis padres, siempre al pendiente y cuidado de mi bienestar.

A mi familia elegida del posgrado: Maressa Pólito, Sandra Gutierrez, Jamvier López y Omar Bojórquez, siempre presentes y constantes, fueron el mejor descubrimiento a mi llegada a Ensenada. Y todos los amigos que he generado y que he consolidados a lo largo del tiempo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos Profesionales	v
Agradecimientos Personales	vi
Lista de figuras	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Hipercolesterolemia	2
1.1.2 Estatinas	2
1.1.3 PCSK9	3
1.1.4 Receptor de LDL y colesterol plasmático	3
1.1.5 Terapias con anticuerpos monoclonales	4
1.1.6 Anticuerpos IgNAR	5
1.2 Justificación	5
1.3 Hipótesis	6
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1 Objetivo general	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	6
Capítulo 2. Metodología	7
2.1 Preparación de Fago ayudador (VCSM13).....	7
2.2 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> (ER2738) electrocompetente	7
2.3 Despliegue en fagos (Panning)	8
2.3.1 Reamplificación	8
2.3.2 Ronda de despliegue en fagos	9
2.4 ELISA de fagos	10
2.5 Inducción de la expresión de vNAR	11
2.6 ELISA de expresión	11
2.7 Extracción periplásmica de anticuerpo vNAR anti PCSK9	12
2.8 Desnaturalización térmica	12

2.9 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes SDS-PAGE	12
2.10 Inmunodetección de las proteínas recombinantes (Western Blot)	13
2.11 Purificación del anticuerpo vNAR anti PCSK9 por columna de Ni-NTA	13
2.12 Diálisis	14
2.14 Recarga de Ni-NTA	14
Capítulo 3. Resultados	16
3.1 Bioselección de las cepas (Panning)	16
3.2 Secuenciación de los plásmidos	17
3.3 Selección y análisis de clonas	18
3.4 Eliminación de proteínas contaminantes	24
Capítulo 4. Discusión	26
Capítulo 5. Conclusiones	29
Capítulo 6. Perspectivas	30
Literatura citada	31

Lista de figuras

Figura		Página
1	Gráfica de título de entrada de fagos en las rondas de selección contra el antígeno PCSK9	16
2	Gráfica de título de entrada de fagos en las rondas de selección contra el antígeno PCSK9	15
3	Representación de las densidades ópticas del ELISA de fagos	17
4	Secuencias de los vNAR seleccionados	18
5	Gráfica de los valores de ELISA de reconocimiento de las cinco clonas seleccionadas	19
6	Gráfica de los valores ELISA de reconocimiento de las clonas PK13 y PK16	20
7	Gráfica de los valores de ELISA de expresión de las dos fases de extracción de proteína periplásmica, fase orgánica y fase inorgánica.....	21
8	Gráfica de los valores de ELISA de expresión de las eluciones purificadas de PK13 y PK16	22
9	Gráfica de crecimiento de la cepa BL21 transformada con PK13	22
10	Gel de fracciones purificadas del extracto de PK13 con tinción de Coomassie	23
11	Membrana de nitrocelulosa del ensayo de Western Blot de fracciones purificadas del extracto de PK13	23
12	Gel de ensayos de diálisis con tinción de Coomassie	24
13	Ensayo de desnaturalización térmica de proteínas, gel con tinción de Coomassie	25
14	Ensayo de desnaturalización térmica de proteínas Western Blot	25

Capítulo 1. Introducción

Los anticuerpos monoclonales (mAb) han demostrado ser herramientas terapéuticas contra un gran número de enfermedades, la hipercolesterolemia es una oportunidad de desarrollo de estas terapias, actualmente se cuentan con dos opciones de primera línea en el mercado, el mAb de isotipo IgG1 (Alirocumab) y el mAb de isotipo IgG2 (Evolocumab). Ambos han demostrado reducir los niveles de colesterol en pacientes propensos a sufrir enfermedades aterogénicas, estas enfermedades culminan generalmente en infartos cardiovasculares inducidos por la formación de las placas colesterolémicas en el endotelio de los vasos sanguíneos, la incidencia de estos padecimientos posiciona a las enfermedades aterogénicas como la primer razón de muerte a nivel global.

El uso de monoterapias o terapias mixtas con anticuerpos y estatinas resulta efectivo en la reducción de la hipercolesterolemia, sin embargo, las técnicas de síntesis, purificación, almacenaje y distribución de los anticuerpos, sumado a la posibilidad que el paciente desarrolle resistencia a las estatinas o inmunogenicidad a los anticuerpos, vuelve a estas terapias una solución momentánea y costosa. Las investigaciones actuales señalan a los inhibidores de la PCSK9 como la terapia por excelencia para reducir el colesterol, manteniendo a los receptores (LDLR) internalizando cLDL al citosol de los hepatocitos para su lisis.

Nuestra investigación se basó en el desarrollo de un anticuerpo monoclonal tipo vNAR, este tipo de anticuerpo está presente en los peces cartilagosos como el “Tiburón cornudo” *Hetherodontus francisci*. Se pretendió que estos anticuerpos tipo vNAR reconociesen la PCSK9, su función será homóloga a los anticuerpos comerciales (Alirocumab y Evolocumab) con las siguientes ventajas adicionales: Termoestabilidad, resistencia a cambios de pH, poca o nula inmunogenicidad, no libera metabolitos secundarios contraproducentes y presenta un mejor transporte en sangre y tejidos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Hipercolesterolemia

Los avances en el diagnóstico y manejo de factores de riesgo cardiovascular, enfermedades cardíacas e infartos, han reducido las muertes por enfermedades aterotrombóticas (EA) en las últimas décadas

(Velagaleti et al., 2008; Xu et al., 2016). Sin embargo, los eventos cardiovasculares siguen afectando numerosos pacientes a nivel global.

La causa principal de las EA es la concentración elevada de cLDL (Por sus siglas en inglés, Lipoproteína de baja densidad de colesterol) en sangre (Navar-Boggan et al., 2015). Los factores asociados a niveles altos de colesterol pueden ser multifactoriales como: dietas hipercalóricas, sedentarismo o la condición genética familiar de hipercolesterolemia (HCF), que afecta 1:200 individuos (Luirink et al., 2015; Nordestgaard et al., 2013). La diabetes, fumar y anormalidades lipídicas (Mutación en gen ApoB) actúan en la duración y severidad de la hipercolesterolemia (Nordestgaard et al., 2013).

En México la prevalencia de dislipidemia es del 43.3% y hoy en día las estatinas son los fármacos más utilizados, sin embargo, del 5 al 10% de los pacientes presentan intolerancia manifestada por la elevación de enzimas hepáticas o de enzimas musculares y requieren alternativas hipolipemiantes (Fernández et al., 2017).

1.1.2 Estatinas

Para controlar los niveles de colesterol en sangre, las estatinas se han utilizado en pacientes con concentraciones elevadas de colesterol, mayores a 160 mMol (Knowles et al., 2014). Sin embargo, pacientes con HCF no reciben el tratamiento adecuado, al no recibir un diagnóstico preciso (Cuchel et al., 2014).

Adquirir y mantener niveles adecuados de colesterol en pacientes con HCF es un reto clínico, aun cuando el paciente ha sido diagnosticado de forma oportuna. El uso de monoterapias con estatinas no suele ser suficiente en pacientes con HCF. Cuchel y colaboradores (2014) reportan un estudio con pacientes heterocigotos a HCF, donde no se redujeron las concentraciones de colesterol hasta niveles adecuados (<2.5 mmol/L [100 mg/dL]), a pesar de que el 96% de la población de estudio recibió tratamiento con estatinas.

1.1.3 PCSK9

Las pro-proteínas son unidades fundamentales de las cuales las proteínas bioactivas y péptidos son derivados por una proteólisis limitada. Desde 1990 han sido identificadas, ocho de las proteínas convertasas (PCs) en mamíferos, responsables del procesamiento tejido-específico de precursores secretorios. (Seidah *et al.*, 2003).

El gen de la proteína convertasa subtilisin/kexin tipo 9 (PCSK9) proviene de un cDNA de 3617 bases, la PCSK9 es una proteína de 692 aminoácidos (aa) expresada principalmente por células del hígado, intestino y riñón, es sintetizada en el retículo endoplásmico como un zimógeno soluble de 72kDa, el cual sufre una escisión autocatalítica intramolecular en el (RE), después de la escisión del prosegmento, la PCSK9 escindida existe en el (RE) y es eficientemente secretada (Cameron *et al.*, 2006). PCSK9 presenta 3 dominios : El prodominio N-terminal, el dominio catalítico y el dominio carboxil terminal, del cual se desconoce su función (Peterson *et al.*, 2008). La PCSK9 es secretada, y subsecuentemente requiere de su internalización mediada por los receptores de LDL (LDLR) para inhibir la expresión del LDLR. PCSK9 interrumpe el reciclaje del LDLR uniéndose a su repetición A tipo factor de crecimiento epidermal (EGF-like repeat A, por sus siglas en inglés), esta unión resulta en la redistribución del LDLR al lisosoma donde son degradados (Liau *et al.*, 2010).

La región promotora del gen de PCSK9 contiene un esteroide regulador y la transcripción es regulada por los niveles de colesterol intracelular. Por otro lado, considerando la cantidad de los receptores de lipoproteínas (LDLR), una reducción del número de LDLR ha sido también observada en cultivos celulares donde se sobreexpresa PCSK9, sin embargo, una reducción del número de LDLR por PCSK9, no se acompaña por cambios en los niveles del RNAm de LDLR (Cameron *et al.*, 2006).

1.1.4 Receptor de LDL y colesterol plasmático

Inhibir a la PCSK9 utilizando un mAb es una nueva terapia para la reducción de cLDL plasmático, permitiendo que los hepatocitos endociten mayores niveles de cLDL (Liau *et al.*, 2010; Poirier y Mayer,

2013), la interacción de PCSK9 con los receptores de LDL (LDLR) aumenta la afinidad a cLDL, pero no permite que el LDLR reintegre a la membrana plasmática (Cameron *et al.*, 2006).

La mayoría de cLDL en la circulación sanguínea es sintetizada por la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) (Endo, 2005), y la principal vía catabólica es por la familia de receptores hepáticos de LDL (Go y Mani, 2012). Las terapias actuales pueden reducir los niveles de biosíntesis de colesterol (estatinas), o reducir los niveles de absorción a la circulación (ezetimibe) (Gagn *et al.*, 2002).

La actividad metabólica del receptor en la superficie de los hepatocitos para LDL (LDLR), une al complejo cLDL para ser endocitado por una vesícula formada por complejos de clatrina, seguido por un proceso catabólico en el lisosoma, el receptor es finalmente reciclado a la superficie celular si no está ligado a la proteína PCSK9, de lo contrario el receptor es catabolizado. La actividad metabólica de los LDLR también puede verse afectada por mutaciones en pacientes con HCF en genes de LDLR o PCSK9 (Bonfond *et al.*, 2015).

1.1.5 Terapias con anticuerpos monoclonales

Para incrementar la respuesta terapéutica, se han desarrollado tratamientos con anticuerpos. Los primeros anticuerpos monoclonales (mAb) anti-PCSK9 fueron: Alirocumab, mAb humano de isotipo IgG1 (*Praluent*, Sanofi/Regeneron), aprobado por la FDA el 24 de Julio de 2015 y evolocumab, mAb de isotipo IgG2 (*Repatha*, Amgen) aprobado por la FDA el 27 de agosto de 2015. Evolocumab está certificado además como tratamiento en el manejo de hipercolesterolemia en adultos o dislipidemia, además de estar certificada para tratamiento en adolescentes desde los 12 años y con HCF homocigótica (Roth *et al.*, 2014). Otro mAb parcialmente murino es bococizumab (Pfizer), se encuentra en Fase III de evaluación clínica, aunque se comprueban sus usos terapéuticos, también puede presentar inmunogenicidad (Ballantyne *et al.*, 2015).

En México ya se utilizan los mAb para tratar las hiperlipidemias, una paciente a la cual se le determinó un tratamiento con evolocumab, 140 mg de aplicación quincenal, llegando a la meta terapéutica (cLDL

menor a 70 mg/dL) en la tercera quincena (Fernández et al., 2017) y el caso clínico Alirocumab por el Dr. Carlos Felipe Barrera Ramírez, en la Unidad Hemodinámica. (Fernández et al., 2017).

1.1.6 Anticuerpos IgNAR

Los IgNAR (Immunoglobuline New Antigen Recognition), presentes en peces cartilaginosos como *Heterodontus francisci*, presentan una pequeña región de unión al antígeno (12kDa). El IgNAR es un homodímero de cadenas pesadas (H), cada cadena H consta de un dominio variable (V) conocido como vNAR y cinco dominios constantes (C), la región V está enlazada al dominio C por un enlace flexible tipo bisagra (Stanfield, 2004). Los vNAR son además, proteínas estables en condiciones extremas de pH y temperaturas elevadas, incluso en presencia de proteasas y agentes caotrópicos, convirtiéndolos en agentes de posible uso terapéutico con ventajas tecnológicas y biofísicas (Camacho-Villegas *et al.*, 2013).

1.2 Justificación

Las enfermedades cardiovasculares van en aumento a nivel global, y los tratamientos con anticuerpos han demostrado su eficacia en la reducción de colesterol en sangre, minimizando los riesgos de enfermedades aterogénicas.

El tratamiento con estatinas demuestra en la mayoría de los casos clínicos, una disminución significativa de los niveles de colesterol sanguíneo, sin embargo, la resistencia al medicamento y la posibilidad de presentar efectos adversos como: vómito, mareos, alopecia, hiperglucemia entre otros, vuelve a las estatinas una solución temporal, riesgosa e inefectiva. Por otra parte, los mAb como Alirocumab y Evolocumab logran reducir el colesterol en sangre, aunque el resultado es prometedor, los costos de producción y almacenaje disminuyen la posibilidad de adquisición. Además, los mAb aun totalmente humanizados, pueden inducir inmunogenicidad en el paciente, la fracción cristalizable (Fc) de estos anticuerpos resulta no ser completamente inocua, debido a la diversidad de respuesta inmunológica del paciente.

Los vNAR por otra parte, son proteínas que pueden ser producidas y almacenadas en condiciones con menor restricción, por su capacidad a resistir condiciones extremas de pH, cambios de temperatura, resistencia a proteasas, baja posibilidad de generar inmunogenicidad y su tamaño pequeño permite una mejor penetración en tejidos, posibilita el diseño de un tratamiento contra la hipercolesterolemia.

1.3 Hipótesis

A partir de una biblioteca sintética, se aislará por lo menos un anticuerpo tipo vNAR con capacidad de reconocimiento específico por PCSK9.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar una herramienta molecular con posible actividad terapéutica, utilizando anticuerpos tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci*.

1.4.2 Objetivos específicos

- i. Aislar un anticuerpo vNAR y evaluar su capacidad de unión a PCSK9.
- ii. Optimizar la estrategia de purificación del vNAR recombinante.
- iii. Evaluar la especificidad del vNAR aislado por el antígeno PCSK9.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Preparación de fago ayudador (VCSM13)

En 2 mL de medio SB se inocularon 2 μ L de células de *E. coli* ER2738, que fueron incubadas 15 min a temperatura ambiente, después se infectaron con 1 μ L de una dilución 10^{-9} del fago ayudador VCSM13 durante 1 h a 37 °C. Se incubaron y se sembraron en placas de LB agar y kanamicina (50 μ g/mL) que se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se preparó un cultivo de 10 mL de medio SB con 10 μ L de células *E. coli* ER2738 que se incubó a 37 °C y 250 rpm durante 1 h. Después, el cultivo fue inoculado con una colonia aislada en las placas de agar LB y se incubó a 37 °C por 2 h a 250 rpm. El cultivo se transfirió a un matraz con 500 mL de medio SB y se incubó con kanamicina (50 μ g/mL) bajo las mismas condiciones por 24 h. El cultivo se transfirió a tubos de 50 mL y se incubó a 70°C por 20 min. Los tubos se centrifugaron a 2500 xg por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se decantó en tubos nuevos que se almacenaron a 4°.

Para determinar la eficiencia de la infección, se inocularon 2 mL de medio SB con 2 μ L de células *E. coli* ER2738 y se incubaron a 37°C y 250 rpm por 1 h. Posteriormente, se infectaron 50 μ L del cultivo de células con 1 μ L de diferentes diluciones el fago ayudador preparado (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} y 10^{-12}); se incubaron a temperatura ambiente por 15 min y se inocularon en placas de agar LB con kanamicina (50 μ g/mL) que fueron incubadas a 37°C por 24 h. Se contabilizó el número de colonias y se calculó la eficiencia de la transformación.

2.2 Cultivo de *Escherichia coli* (ER2738) electrocompetente

Se prepararon alícuotas de células *E. coli* cepa ER2738. Para el preinóculo, de una placa con medio LB sin antibiótico se obtuvo una colonia, con la cual se inocularon 15 mL de medio Super Broth (SB) sin antibiótico (Tryptona 3.2% (p/v), Extracto de levadura 2% (p/v), NaCl 0.5% (p/v), pH 7), el preinóculo se incubó en agitación (250 rpm) a 37 °C durante 12 h. En un matraz de 500 mL con 490 mL de medio SB suplementado con 10 mL de una solución de sacarosa (20%) y 5 mL de una solución de $MgCl_2$ 1M, se inoculó con 3mL del preinóculo, se incubó en las mismas condiciones del preinóculo durante 2 h o

hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) deseada ($DO_{Min} = 0.7$; $DO_{Max} = 0.9$). Una vez alcanzada la densidad óptica, se transfirió el cultivo en tubos Falcon de 50 mL para ser incubados en hielo por 20 min. Se centrifugó a 3000 xg, por 20 min a 4°C y una vez finalizado el centrifugado se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió con 50 mL de glicerol al 10% enfriado y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El proceso se repitió con centrifugaciones consecutivas reduciendo el número de tubos de 10 a 5, y de 5 a 2. El botón final se resuspendió en 2 mL de glicerol al 10 % enfriado y se realizaron alícuotas de 50 μ L y 10 μ L. Para almacenar el botón celular se recomendó resuspender en glicerol al 10 % y se guardó a -80 °C.

2.3 Despliegue en fagos (Panning)

De la biblioteca sintética con fagos VCSM13 sintetizados por Cabanillas-Bernal (2017), la cual se sintetizó con el vector pComb3x, este vector presenta características esenciales como: Un sitio de restricción Sfil, un promotor LacZ, un gen de resistencia a carbenicilina, una secuencia para inmunodetección (HA), una secuencia para purificar (6xHis) y un codón ámbar para detener la traducción de proteínas de interés. Se seleccionaron aquellos fagos que presentaron el vNAR con afinidad por el antígeno PCSK9, se llevó a cabo mediante una reamplificación de la biblioteca sintética de fagos y cuatro rondas de selección para asegurar la afinidad por el antígeno (PCSK9).

2.3.1 Reamplificación

Se inocularon 50 mL de medio SB en un matraz de 250 mL con 50 μ L de células electrocompetentes ER2738, se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 1 ($DO_{600} = 1$), se midió la primer densidad a la primer hora del cultivo, se continuó con una medición cada 30 minutos hasta que se llegó a la densidad deseada. Se agregaron 50 μ L del fago de la biblioteca y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, después se agregó un volumen de 10 μ L de carbenicilina (100 mg/mL). Se prepararon disoluciones del cultivo infectado con medio SB de 10^{-2} y 10^{-4} . Se sembró un volumen de 1 μ L y otro volumen de 10 μ L de la dilución 10^{-4} en placas de LB con carbenicilina (100 μ g/ μ L) y se dejó incubar ambas placas toda la noche a 37 °C. Los 50 mL de cultivo en medio SB se transfirieron a un matraz estéril de 500 mL y se colocó a 37 °C a 300 rpm durante 1 h. Se agregaron 15

μL de carbenicilina (100 mg/mL) y se incubó a 37 °C a 300 rpm durante 1 h. Se agregaron 5 mL de fago helper M13K07 (10^{12} – 10^{13}), 108 mL de medio SB y 55 μL de carbenicilina (100 mg/mL) se colocó el cultivo en incubación a 37°C con 300 rpm durante 1.5 a 2 h. Finalmente se agregaron 224 μL de kanamicina (50 mg/mL) y se continuó agitando a 300 rpm a 37 °C durante toda la noche. Para comenzar con las rondas, se inmovilizó el antígeno (PCSK9) en dos pozos de placa ELISA (250 ng en 50 μL de PBS por pozo) o bien (50 μL de un stock a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se tapó la placa con papel aluminio nuevo y se dejó incubar durante toda la noche.

2.3.2 Ronda de despliegue en fagos

Se retiró el cultivo del paso de reamplificación y se vertió en tubos nuevos de 50 mL (40 mL por tubo), se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min para precipitar las bacterias. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos de 50 mL y se agregó a cada tubo 10 mL de una solución de PEG 8000/NaCl después se incubó en hielo a 4°C durante 30 min. Se eliminó la solución del antígeno de la placa de ELISA y se bloquearon los pozos agregando 150 μL de solución de bloqueo (PBS 1X – BSA 3%) se tapó la placa con papel aluminio nuevo y se incubó 1 h a 37 °C. Pasados los 30 min de incubación en hielo se centrifugaron los tubos a 9000 rpm a 4°C durante 15 min para precipitar los fagos. Se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar los pellets 5 min, se resuspendió el pellet del fago en 2 mL totales de (PBS 1X – BSA 1%), se pipeteó vigorosamente para asegurar la resuspensión de los fagos, se transfirió a tubos nuevos de 2 mL, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min para asegurar la precipitación de bacterias, se recuperó el sobrenadante de ambos tubos con una jeringa de 3 mL y se filtró (filtro de 2 μM) recuperando los fagos en un tubo de 2 mL (fago fresco) se etiquetó como Mix de Biblioteca y el número de ronda o reamplificación. Se eliminó la solución de bloqueo de la placa de ELISA, se agregaron 50 μL del fago fresco en cada pozo, se tapó la placa y se incubó durante 2 h a 37°C. Después de haber incubado la placa (30 min en la primera ronda, 1 h en la segunda y tercera ronda y 1.5 h en la cuarta ronda) se cultivó una alícuota de 5 μL de células ER2738 electrocompetentes en 5mL de medio SB hasta llegar a una $\text{DO}_{600}=1$. Se eliminó la solución de fago de la placa de ELISA invirtiéndola, se agregaron 150 μL de buffer de lavado (PBS 1X – Tween20 0.05%), se pipeteó 5 veces sin raspar el fondo, se incubó 5 minutos con el buffer de lavado a temperatura ambiente. Se repitió el proceso de lavado 5 veces para la ronda 1, 10 veces para la ronda 2 y ronda 3 y 15 veces para la ronda 4. Después de eliminar el último lavado se agregaron 50 μL de tripsina (10 mg/mL) fresca, preparada durante el último

lavado (10 mg de tripsina en 1 mL de PBS 1X), se cubrió la placa con aluminio y se incubó 30 min a 37 °C. Se prepararon diluciones para el título *Input* de 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} y 10^{-12} con 999 μ L de medio SB y 1 μ L de la preparación del fago (10^{-3}) a partir de esta dilución se preparó el resto. Se leyó la densidad óptica del cultivo de 5 mL, aproximadamente 10 min antes de culminar la incubación de la placa ELISA, si se encontró cercano a $DO_{600}=1$, se retiró de la incubación. Se recuperaron los 50 μ L de cada pozo, pipeteando vigorosamente 10 veces. Se infectó con los 50 μ L del fago tripsinado, 2 mL de células ER2738 que fueron previamente cultivadas hasta una ($DO_{600}=1$), se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se agregaron 6 mL de medio SB y 1.6 μ L de carbenicilina (100 mg/mL), a estos 8 mL los denominamos "muestra". De la muestra se tomaron 2 μ L y se diluyó en 200 μ L de medio SB (1:100), con esta dilución se sembraron 10 μ L y 100 μ L en placas de LB con carbenicilina, se dejaron en incubación toda la noche a 37 °C. Una vez tomados los 2 μ L de la muestra se incubó por 1 h a 300 rpm a 37 °C. Para el título *Input* se infectaron 50 μ L de células ER2738 del cultivo con la $DO_{600}=1$ con 1 μ L de dilución 10^{-12} del fago y se incubó 15 min a temperatura ambiente, terminada la incubación se sembraron 50 μ L en una placa de LB con carbenicilina a 37 °C toda la noche. Finalizada la hora de incubación de los 8 mL de la muestra, se agregó un volumen de 2.4 μ L de carbenicilina (100 mg/mL) y se incubó 1 h a 37 °C a 300 rpm. Posterior a esta incubación se agregaron 4 mL de fago helper (M13K07), se transfirió a un matraz de 500 mL, se agregó un volumen de 71 mL de medio SB y 36 μ L de carbenicilina (100 mg/mL), se incubó el cultivo por un periodo de 1.5 a 2 h. Durante el periodo de incubación se inmovilizó el antígeno en un pozo de una placa ELISA, se agregó una dilución de 50 μ L a (5 μ g/mL), se cubrió con papel aluminio nuevo y se incubó a 4°C durante toda la noche. Finalmente, pasado el lapso de incubación, se agregó al medio 112 μ L de kanamicina (50 mg/mL) y se incubó durante toda la noche a 37 °C a 300 rpm.

2.4 ELISA de Fagos

Se vertió en 48 tubos de 2 mL, 1 mL de medio SB con 1 μ L de carbenicilina (100 mg/ μ L) por tubo, se seleccionaron colonias aisladas de las placas de *Output* sembradas en la ronda 4, se tomó una colonia con puntas de 10 μ L por tubo para inocularlos, se dejaron toda la noche a 18 °C, se sugirió dejar 4 tubos adicionales, 2 para medir la densidad óptica ($DO_{600}= 0.6 - 0.8$) uno sin inocular para el blanco y un cuarto con punta sin inocular como control negativo. Se incubaron los tubos durante 2 a 2.5 h a 37 °C

y 250 rpm. Se infectaron los cultivos 100 μ L del fago helper (M13K07), se incubó 30 min a 37 °C, se centrifugaron los tubos a 17 000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cuidadosamente en vórtex, se agregó 1 mL de medio SB con (Carbenicilina 100 μ g/mL y Kanamicina 50 μ g/mL) se incubó toda la noche y se dejó la placa ELISA con anti-HA-tag (1 pozo por colonia (75 ng/pozo)), un control positivo con anti-HA y un control negativo de 50 μ L de PBS, se incubó la placa toda la noche a 4 °C.

2.5 Inducción de la expresión de proteína

Se aisló una colonia para inocular 10 μ L SB (Tryptona 3.2% (p/v), Extracto de levadura 2% (p/v), NaCl 0.5% (p/v), pH 7.5) suplementado con carbenicilina (100 μ g/mL), se incubaron durante 18 h a 37°C y 250 rpm. El preinóculo se diluyó en 100mL de medio SB + carbenicilina (100 μ g/mL), se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) deseada (DO_{Min} = 0.6; DO_{Max} = 0.9). Alcanzada la DO_{600} , se agregó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta alcanzar una concentración final de 1 mM, se incubó por 6 horas más en las mismas condiciones. Se recuperaron las células por centrifugación a 4,000 rpm durante 15 min. Y se eliminó el sobrenadante y se almacenaron los pellets a -20°C.

2.6 ELISA de expresión

De los extractos periplásmicos se realizó el ELISA. Primero se inmovilizaron 50 μ L de extracto crudo en una placa ELISA por triplicado durante 12 h a 4°C, se agregaron 150 μ L de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1X) y se incubó a 37 °C por 1 h. Se descartó el contenido de los pozos, para realizar tres lavados con PBST, posteriormente se agregaron 50 μ L de una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti-HA-HRP (Roche) en BSA 1% en PBS 1X. Se inoculó por 1 h a 37 °C, se descartó el contenido de los pozos y se lavó tres veces con PBST. Finalmente, se llevó a cabo el revelado con 50 μ L de sustrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) para ser incubado 15 min a temperatura ambiente, se agregó 50 μ L de ácido clorhídrico 1M (HCl) y se determinará su absorbancia a 450 nm en un lector para placas de ELISA

(BioRAD). Como control negativo de la expresión se utilizó un extracto periplásmico de la cepa *E.coli* BL21 (DE3) sin transformar.

2.7 Extracción periplásmica de anticuerpo vNAR anti PCSK9

Se resuspendieron los pellets en 20 mL (volumen total) de la solución Tris-HCl 30 mM Sacarosa 20% en vórtex, se agregaron 40 µL de EDTA (1mM) a cada tubo, se incubaron en hielo durante 10 min agitando por balanceo, se centrifugaron a 8 000 xg por 20 min a 4°C, se colectaron el sobrenadante en tubos nuevos y se etiquetaron como extractos en Tris-HCl Sacarosa 20%, los extractos se guardaron a -20°C. Los pellets se resuspendieron nuevamente en 20 mL de una solución de MgSO₄ 20 mM y se llevó a cabo el mismo procedimiento que con Tris-HCl, antes de congelar se generaron alícuotas de 200 µL para la realización de las ELISAs.

2.8 Desnaturalización térmica

Se congelaron los extractos provenientes de la extracción periplásmica a -80 °C durante toda la noche o hasta estar completamente congeladas, posteriormente se calentaron los extractos en baño maría a 95 °C hasta derretir por completo el extracto, se repitieron las rondas de congelamiento y descongelamiento tres veces, se centrifugó a 14 000 xg durante 20 min, se recuperó el sobrenadante en tubos nuevos.

2.9 Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes Tricina-SDS-PAGE

La electroforesis se realizó utilizando la metodología de Tricina-SDS-PAGE descrita por Schägger y von Jagow (1987), utilizada mayormente para separar proteínas de (1 – 1, 000 kDa) en geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: amperaje

constante 50 mA, 150 Volts, durante 2.5 horas. Los geles fueron teñidos toda la noche con azul de Coomassie, a TA y agitación constante. Posteriormente fueron desteñidos empleando una solución (40% etanol, 10% ácido acético).

2.10 Inmunodetección de las proteínas recombinantes (Western Blot)

Se transfirió la proteína del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 μm (BioRAD). Se humedeció el papel filtro, el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa con el amortiguador Towbin 1X (Tris Base 250 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), pH 8.3) durante 5 min. El sistema de transferencia utilizado fue el Semi-Dry Electrobloetter (CLP) y las condiciones de transferencia fueron: amperaje constante 200 mA, 20V máximo, durante 1 h.

Al finalizar la electrotransferencia la membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación moderada en solución de bloqueo PBS 1X-Tween 0.05 %: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1.8 mM, Tween-20 0.05% (v/v), pH 7.4, con leche descremada 5% (p/v) Svelty® de Nestlé®. Posteriormente la membrana se enjuagó con solución PBST (PBS 1 X-Tween 0.05%), se descartó la solución y se incubó durante 2 horas a TA con agitación moderada en una dilución 1:1, 500 μL del anticuerpo anti-cMyc (Roche) en PBST con leche descremada 1% (p/v). Al terminar la incubación con el anticuerpo, se sumergió la membrana durante 5 min en PBST en agitación constante o en movimientos de inmersión, se repitió 3 veces para eliminar cualquier residuo, finalmente se detectaron las proteínas por colorimetría agregando 3 μL del reactivo Diaminobencidina (DAB) Substrate Kit (Termo Scientific).

2.11 Purificación del anticuerpo vNAR anti PCSK9 por columna de Ni-NTA

El extracto periplásmico se purificó mediante cromatografía de afinidad empleando resina Ni-NTA (Quiagen) la cual tiene afinidad por la secuencia de histidinas que presenta la proteína vNAR recombinante.

En una columna de plástico con 15 mL de capacidad, se agregó 1 mL de 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 12 mL de amortiguador de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0). Posteriormente, la columna fue transferida al cuarto frío (4 °C) permitiendo el flujo por gravedad, del extracto periplásmico. Se procedió con el lavado de la columna con 20mL de amortiguador de lavado y con la elución de la proteína recombinante con amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0) en cinco fracciones de 0.5 mL cada uno, la solución de elución permaneció por periodos de incubación de 5 min en cada lavado. Finalmente, a la columna se le agregó un volumen de 15 mL de amortiguador de lavado y se almacenó a 4°C con etanol al 20%.

2.12 Diálisis

Se humedeció la membrana del cartucho de diálisis (10,000 Dalton MWCO Slide-Lyser[®] Diálisis) en agua desionizada durante 15 min, se agregaron las eluciones de la purificación (Únicamente las que dieron positivo al Western Blot) al cartucho de diálisis cuidando de no perforar la membrana, en un volumen de 2 L de PBS 0.5X (Para la purificación con resina HA, es necesario dializar contra TBS 0.5X) se colocó el cartucho en agitación a 4º durante 1.5 h, se realizaron tres recambios para asegurar la diálisis correcta, se recuperó la solución del interior del cartucho y se almacenó a 4°C.

2.13 Recarga de Ni-NTA

Cuando la resina utilizada en purificación ya se encuentra blanca o se ha utilizado de tres a cuatro ocasiones, es necesario reponer el Nickel perdido, para recargar 2 mL de resina en una columna de purificación. Se agregó a la columna dos volúmenes de 8 mL de EDTA 50 mM, después se agregaron dos volúmenes de 8 mL de NaOH 0.5 M, nuevamente se agregaron dos volúmenes de 8 mL de agua destilada estéril, se agregó un volumen de 8 mL de NiCl_2 hexahidratado a una concentración de 5 mg/mL preparado en agua destilada estéril, se aseguró que la resina se encontrara totalmente recargada con Nickel, ya que se agregó un segundo volumen de NiCl_2 hexahidratado, se lavó la columna

dos veces con 2 volúmenes de 8 mL de agua destilada, finalmente se agregó de 2 a 3 mL de etanol al 20%, se tapó y se guardó a temperatura ambiente.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Bioselección de las cepas (Panning)

Se obtuvieron los títulos de entrada “Input” y los de salida “Output” correspondientes a la (Figura 1) y (Figura 2) siendo estos los números de UFC (Unidades Formadoras de Colonia), si se cuantifica en el output un número con un rango exponencial mayor a cinco ($1E+05$) se puede continuar con las experimentaciones, el output que obtuvimos fue de 3.2×10^5 UFC.

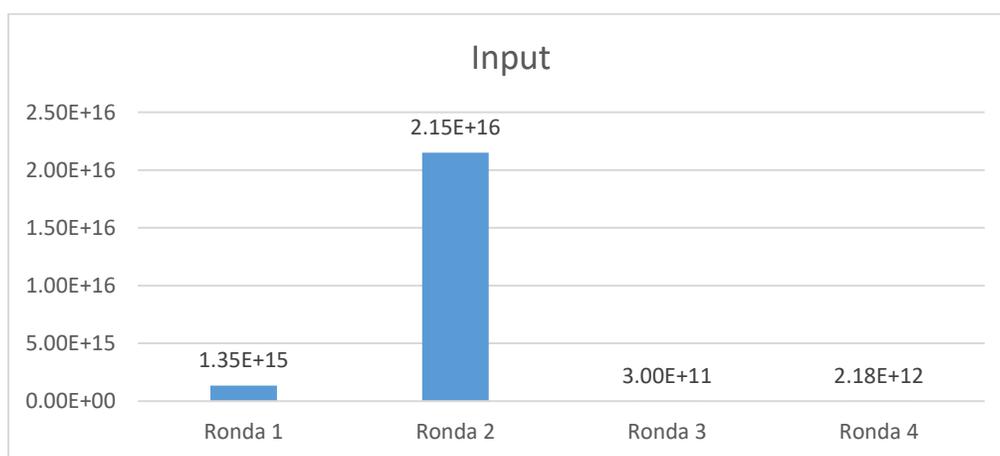


Figura 1. Gráfica de título de entrada de fagos en las rondas de selección contra el antígeno PCSK9.

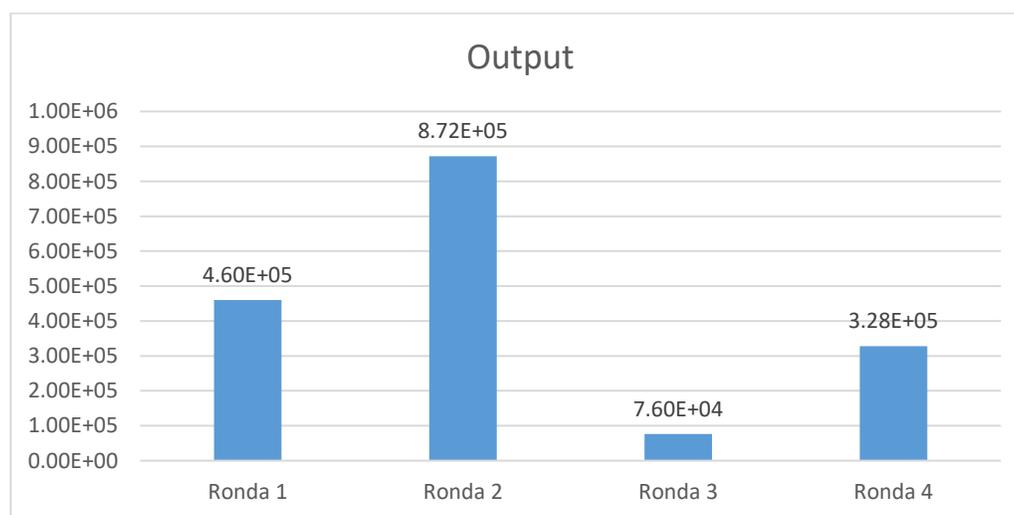


Figura 2. Gráfica de título de salida de fagos en las rondas de selección contra el antígeno PCSK9

Para asegurar el uso de fagos funcionales se realizó la siguiente ELISA de fagos, con el propósito de mandar a secuenciar únicamente los fagos que presentaran la secuencia del vNAR de interés, se seleccionaron 18 fagos (Figura 3) y se enviaron a secuenciar, fueron denominados desde PK1 hasta PK18.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.134	0.052	0.141	0.069	0.068	0.065	0.068	0.18	0.084	0.068	0.166	0.092
B	0.091	0.073	0.073	0.11	0.067	0.059	0.101	0.065	0.067	0.056	0.063	0.072
C	0.108	0.066	0.064	0.061	0.064	0.081	0.123	0.191	0.133	0.081	0.065	0.076
D	0.081	0.134	0.083	0.136	0.122	0.188	0.191	0.117	0.13	0.232	0.129	0.141
E	0.178	0.244	0.055									

Figura 3. Representación de las densidades ópticas del ELISA de fagos. Datos de la densidad óptica, el criterio de selección de los fagos consistió en tomar a aquellos que presentaran una densidad óptica mayor a 0.110, asegurando la toma de fagos funcionales para el propósito de la investigación, los cuadros en color azul representan a los fagos de la biblioteca sintética de fagos y el recuadro amarillo el blanco (50 μ L de PBS 1X).

3.2 Secuenciación de los plásmidos

De las 18 secuencias de plásmidos, se tomaron cinco (Figura 4), tomando en cuenta que presentaran las características deseadas de un vNAR, como las secuencias conservadas, la cisteína canónica, la marca de histidinas necesaria para la purificación y la secuencia del CDR3, un punto decisivo para seleccionar el plásmido fue la ausencia de codones de paro (**), las secuencias fueron visualizadas y analizadas en CLC Main Workbench 8.0.

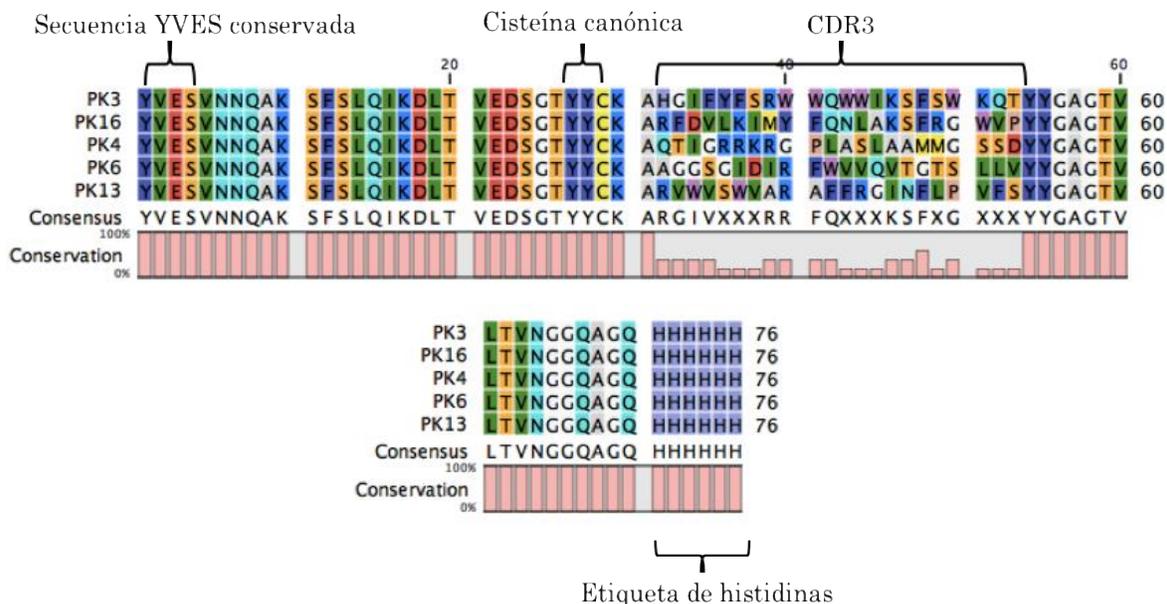


Figura 4. Secuencias de los vNAR seleccionados. Se seleccionaron las secuencias que presentaran los fragmentos conservados como YVES y la marca de Histidinas (HHHHHH) y la cisteína canónica del tripéptido YYC, de las 18 secuencias se descartaron 13 por presentar codones de paro (***) .

3.3 Selección y análisis de clones

Asegurando la selección de la colonia que reconociera mejor el antígeno de interés (250 ng/mL de PCSK9), se realizó una ELISA de reconocimiento con las cinco clonas que se preseleccionaron de las secuencias confirmadas, cuya diferencia significativa (IC=95%, $p>0.05$) (Figura 5) permitió descartar PK3, PK4 y PK6, aunque presentan valores superiores a los controles negativos BSA-PBS1X, se prefirió trabajar con PK13 y PK16, ya que son los que presentaron valores superiores a 0.145 de densidad óptica.

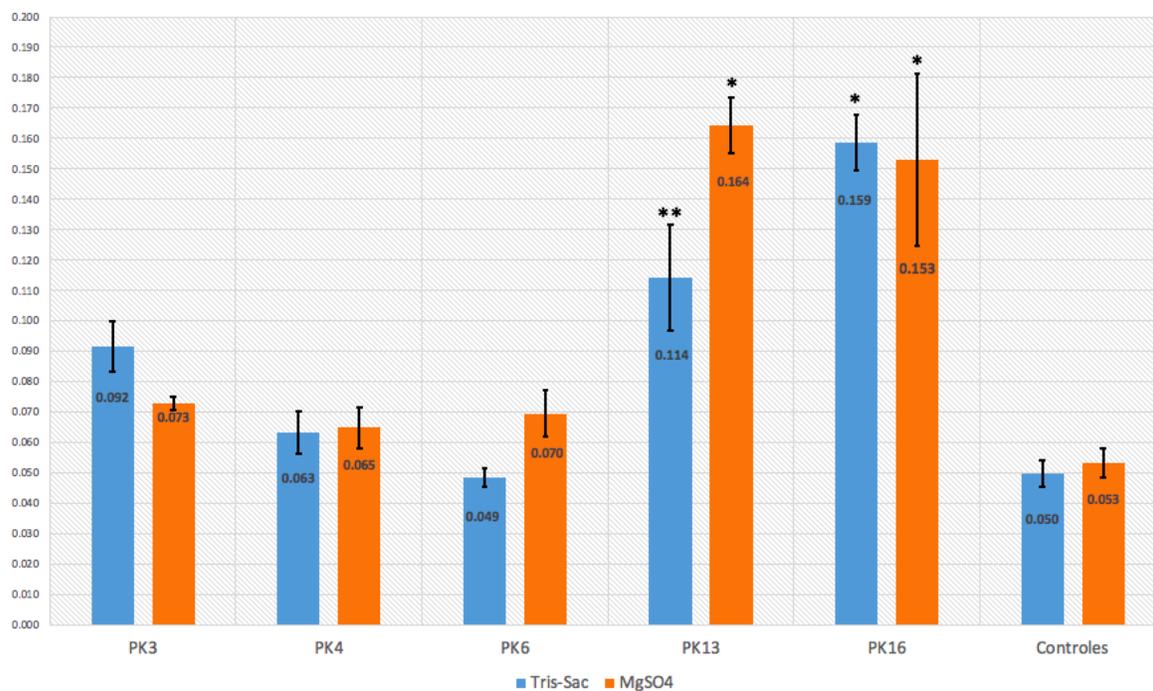


Figura 5. Gráfica de los valores de ELISA de reconocimiento de las cinco clonas seleccionadas.

Una vez seleccionadas las clonas PK13 y PK16, se realizó la evaluación de los extractos para verificar que las lecturas de reconocimiento no fueran afectadas por el BSA 3%, utilizando como blanco el PBS1X, la diferencia entre los controles y los vNAR es significativa, ambas con un comportamiento limítrofe de datos (IC=95%, $p > 0.05$) (Figura 6).

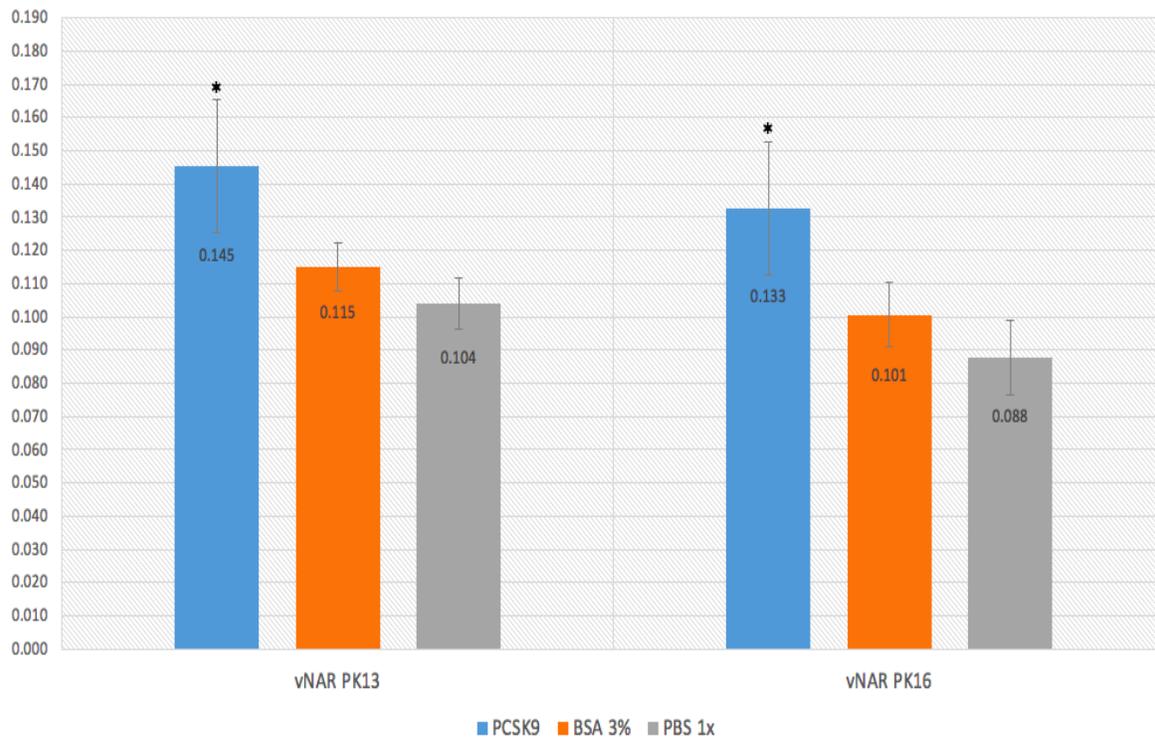


Figura 6. Gráfica de los valores ELISA de reconocimiento de las clonas PK13 y PK16

Para evaluar más detalladamente, se realizó un ELISA de expresión para determinar en cuál de las fracciones de extracción se encontraba la mayor cantidad del anticuerpo, si en la fase orgánica de Tris-Sacarosa 20% o en la inorgánica de $MgSO_4$ en ambos se utilizó BSA 3% como control negativo. Para el caso de PK13 se obtuvo una mejor lectura en la fase inorgánica, contrario a PK16 que presentó valores mayores en la fase orgánica de Tris-Sacarosa 20% (IC=95%, $p>0.05$) (Figura. 7).

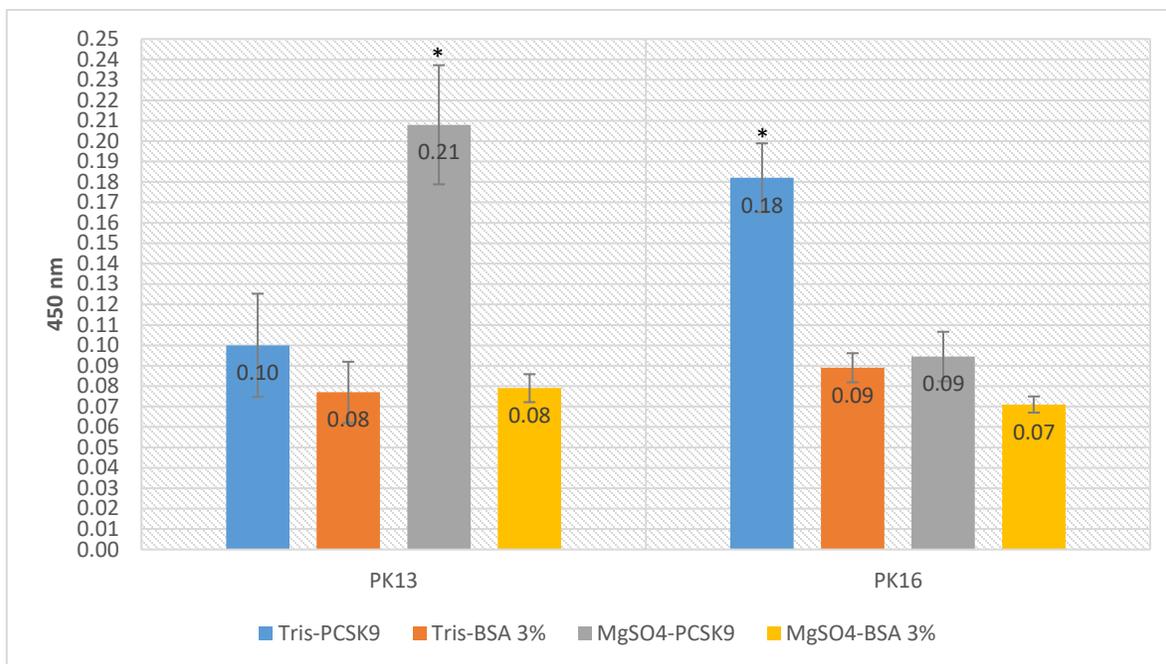


Figura 7. Gráfica de los valores de ELISA de expresión de las dos fases de extracción de proteína periplásmica, fase orgánica y fase inorgánica.

Después de haber purificado por la columna de afinidad, se volvió a realizar un ensayo ELISA de reconocimiento, pero ahora de las fracciones (Eluciones) provenientes de los lavados con Imidazol 250 mM (F1, F2, F3, F4 y F5), el extracto después de ser purificado (Ext) y PBS 1X (Blanco) se corroboró la significancia de los datos (IC=95%, $p > 0.05$) (Figura. 8) y se decidió continuar los experimentos con las fracciones F1, F2 y F3, se observó que PK13 no presentó problemas al ser purificado por la columna de afinidad, a diferencia de PK16 el cual mantuvo el vNAR en el extracto, se corroboró con los datos estadísticos de significancia.

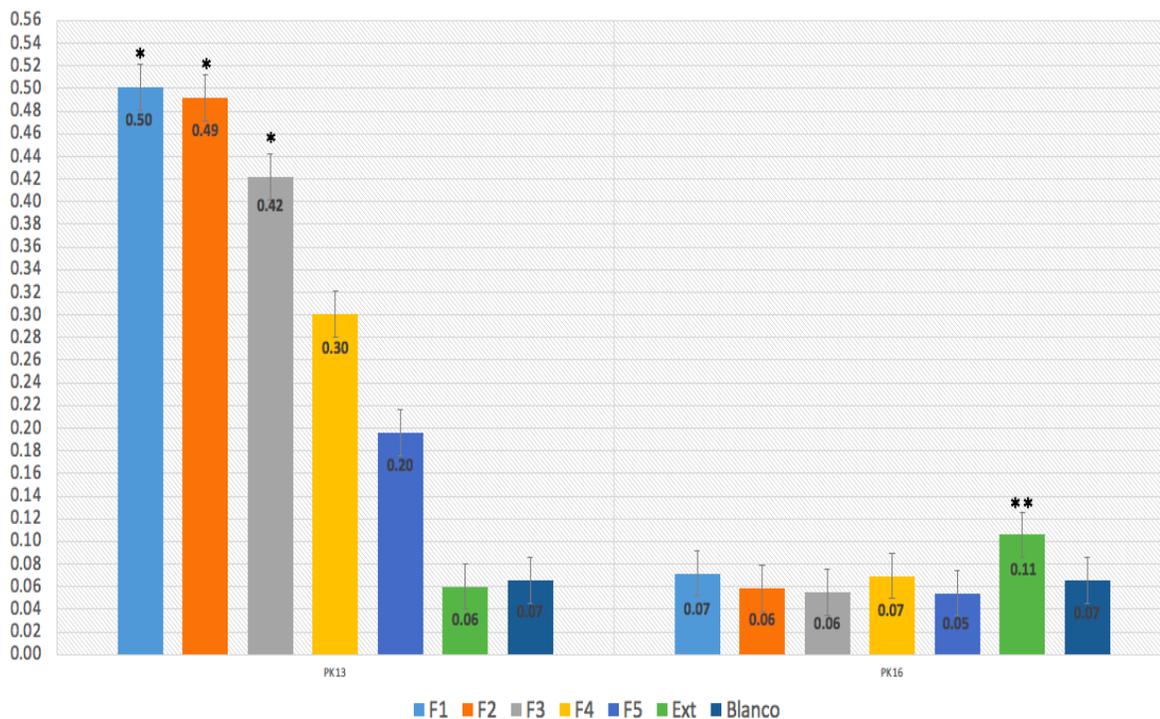


Figura 8. Gráfica de los valores de ELISA de expresión de las eluciones purificadas de PK13 y PK16

Para estandarizar el tiempo de crecimiento de la cepa BL21 transformada con PK13, se realizó una curva de crecimiento celular (Figura 9), nos damos cuenta que para que alcance una densidad óptica de 0.6, debemos dejar el cultivo en condiciones ideales (37 °C a 250 rpm) durante aproximadamente cinco horas, las cuales una vez transcurridas podemos comenzar con la inducción de la síntesis del vNAR.

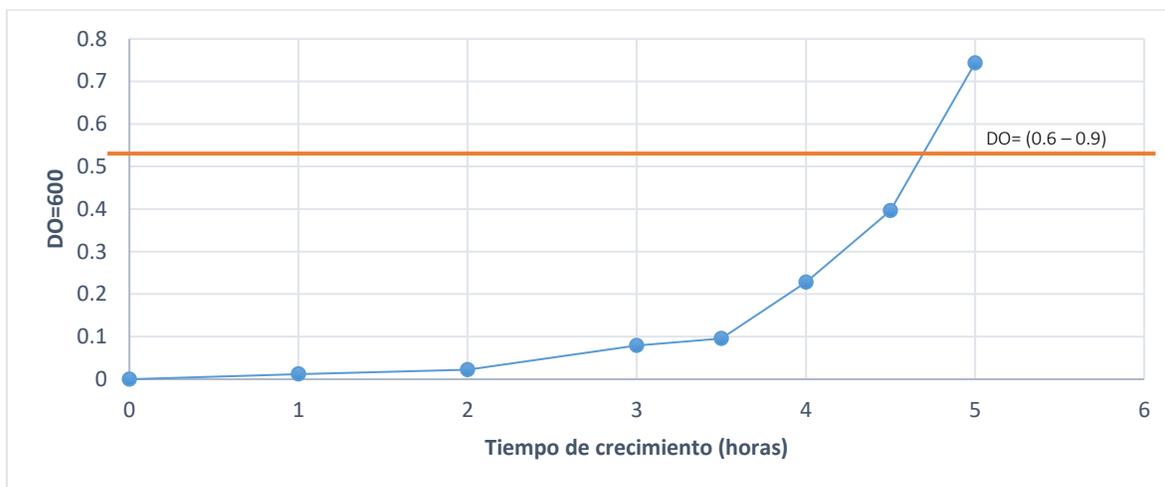


Figura 9. Gráfica de crecimiento de la cepa BL21 transformada con PK13

Se realizó un gel con tinción de Coomassie para observar las proteínas totales presentes en las fracciones, las fracciones 1 y 2 (F1 y F2) revelaron presencia de proteínas contaminantes y una franja difuminada del vNAR, el cual se encuentra aproximadamente en el rango de los 16 kDa (Figura. 10).

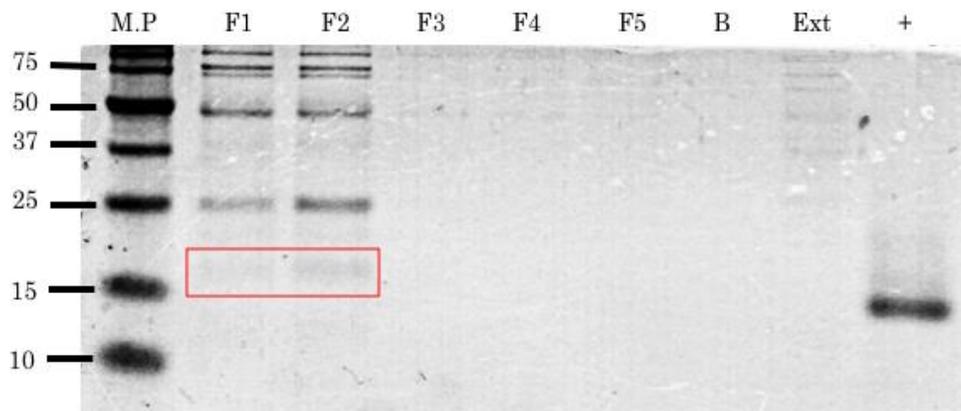


Figura 10. Gel de fracciones purificadas del extracto de PK13 con tinción de Coomassie. F1= Fracción 1, F2= Fracción 2, F3= Fracción 3, F4= Fracción 4, F5= Fracción 5, B=Blanco, Ext= Extracto y += Control positivo; el control positivo es una proteína vNAR periplásmica extraída y purificada de un tamaño aproximado de 14 kDa, esta proteína carece del Tag de Histidias.

Verificando la integridad del vNAR se realizó un ensayo de Western Blot (Figura 11), el resultado fue positivo para los dos fragmentos que presentaron la banda del vNAR.

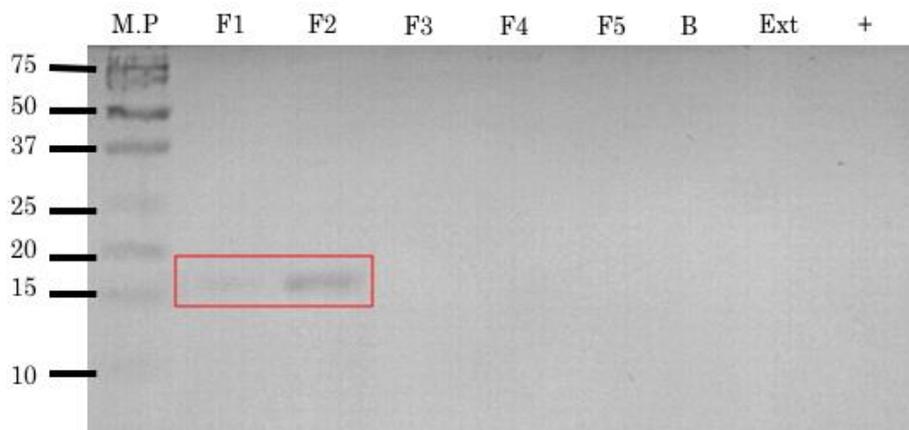


Figura 11. Membrana de nitrocelulosa del ensayo de Western Blot de fracciones purificadas del extracto de PK13. F1= Fracción 1, F2= Fracción 2, F3= Fracción 3, F4= Fracción 4, F5= Fracción 5, B=Blanco, Ext= Extracto y += Control positivo; El control positivo es una proteína periplásmica extraída y purificada de un tamaño aproximado de 14 kDa, esta proteína carece del Tag de Histidias, por lo que no sirvió como control positivo en este Western Blot.

3.4 Eliminación de proteínas contaminantes

Las eluciones (F1, F2 y F3) se mezclaron para los tratamientos de diálisis para eliminar la concentración de sales de Imidazol, se utilizó un tubo concentrador Thermo Scientific™ de 20 mL 25 000 MWCO (20 min a 5 000 xg), se analizaron todas las muestras obtenidas (Figura 12) y no se logró obtener una lectura, en el gel se observó una degradación en la primera diálisis, indicando que después de esta se perdió el anticuerpo, ya que se perdió el vNAR no se continuó el protocolo de inmunodetección por Western Blot.

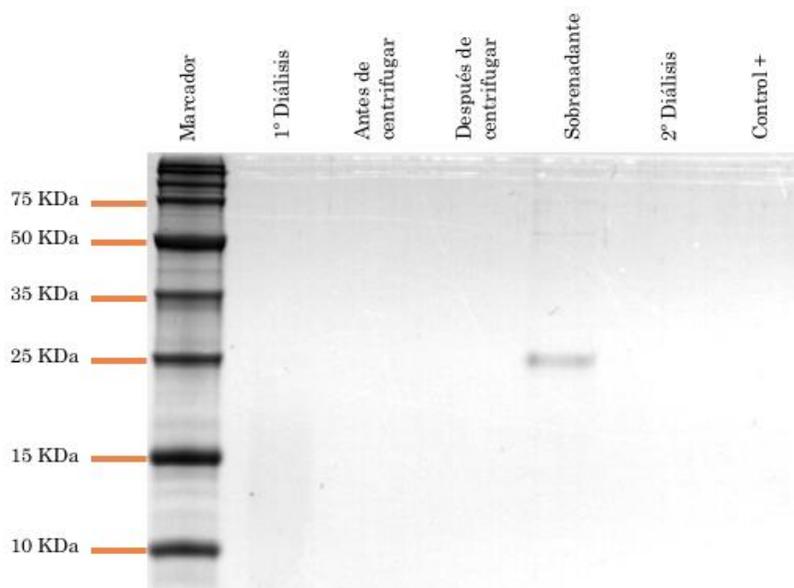


Figura 12. Gel de ensayos de diálisis con tinción de Coomassie: La banda que aparece en el sobrenadante indica que el tubo concentrador funciona para eliminar las proteínas con un tamaño molecular superior a los 25 kDa.

Para eliminar proteínas contaminantes realizamos el protocolo de desnaturalización térmica, realizando cuatro rondas de congelamiento (-80 °C) y descongelamiento (95 °C), precipitando las proteínas al inducir la formación de estructuras hidrofóbicas, centrifugando el producto y trabajando con un sobrenadante libre de proteínas contaminantes se realizó un gel con tinción de Coomassie (Figura 13) y un Western Blot (Figura 14).

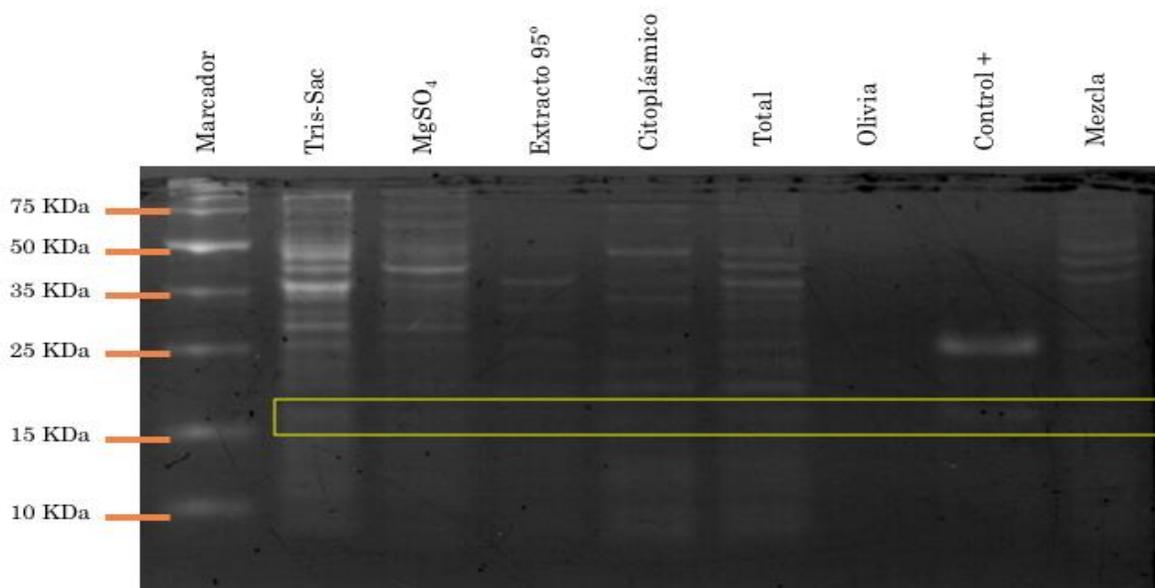


Figura 13. Ensayo de desnaturalización térmica de proteínas gel con tinción de Coomassie: Tris-Sac y $MgSO_4$: Son los extractos antes de ser desnaturalizados, Extracto $95^\circ C$: Mezcla de los extractos anteriores posterior a la ronda de desnaturalización, Citoplásmico: Extracto que proviene de un botón celular al cual se le realizó extracción periplásmica, Total: Extracto de un botón celular al cual no se le realizó ninguna extracción periplásmica, Olivia: Proteína vNAR otorgada por M.C Olivia Cabanillas, Control +: vNAR otorgado por el estudiante de maestría Jamvier López y Mezcla: Solución creada de los volúmenes sobrantes con el único propósito de equilibrar el gel.

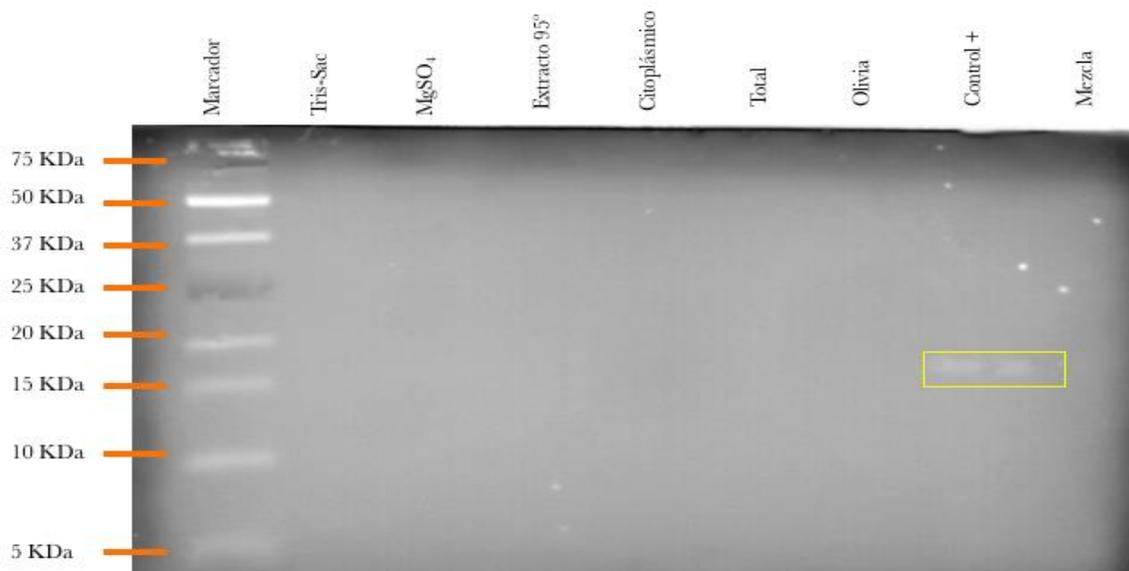


Figura 14. Ensayo de desnaturalización térmica de proteínas Western Blot: Tris-Sac y $MgSO_4$: Son los extractos antes de ser desnaturalizados, Extracto $95^\circ C$: Mezcla de los extractos anteriores posterior a la ronda de desnaturalización, Citoplásmico: Extracto que proviene de un botón celular al cual se le realizó extracción periplásmica, Total: Extracto de un botón celular al cual no se le realizó ninguna extracción periplásmica, Olivia: Proteína vNAR otorgada por M.C Olivia Cabanillas, Control +: vNAR otorgado por el estudiante de maestría Jamvier López y Mezcla: Solución creada de los volúmenes sobrantes con el único propósito de equilibrar el gel.

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo de investigación se obtuvieron anticuerpos vNAR anti-PCSK9, se describen las metodologías utilizadas así como las propuestas y soluciones que se generaron para mejorar la obtención del vNAR. La relevancia de estos anticuerpos radica en el papel metabólico de PCSK9 en la degradación de las lipoproteínas cLDL (Lipoproteína de baja densidad – colesterol), así como el control y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar.

Este proyecto pertenece a la fase inicial de la obtención de una herramienta terapéutica molecular, utilizando anticuerpos tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci* a partir de una biblioteca sintética. Para alcanzar este objetivo se utilizó la biblioteca sintética Cabanillas-Bernal (2017) y se propuso la proteína PCSK9 como el antígeno de interés, se logró obtener en el proceso de bioselección (Panning), una adecuada correlación de Output.

Las bacterias infectadas con los fagos ya seleccionados pasaron por otro proceso de selección, ya que la infección del fago no asegura que todas las bacterias cuenten con un fagémido que sea funcional al momento de realizar la expresión de la proteína, de un cultivo en LB con carbenicilina se realizó la extracción de los plásmidos para enviarlos a secuenciar, de los 18 plásmidos secuenciados cinco de ellos presentaron todas las características necesarias para ser un candidato funcional (PK3, PK4, PK6, PK13 y PK16), el resto fue descartado por la presencia de codones ámbar (codones de paro).

Para determinar si las cinco clonas reconocían adecuadamente el antígeno, realizamos una ELISA de reconocimiento, donde descartamos (PK3, PK4 y PK6) al generar valores inferiores a 0.1 en las lecturas de densidad óptica a 450nm, debido a que la lectura de los controles (BSA-PBS1X) es de valores cercanos al 0.05 decidimos seleccionar PK13 y PK16 como los candidatos más viables al presentar lecturas hasta tres veces mayor comparada con los controles (0.15).

Una vez ya seleccionadas las cepas (PK13 y PK16) se realizó el protocolo de expresión periplásmica del vNAR, se realizó la inducción con IPTG 37 °C por 6 h. Para verificar la correcta expresión del vNAR se realizó un ELISA de reconocimiento para validar que los anticuerpos que estamos produciendo reconocen el antígeno, se utilizó BSA 3% y PBS 1X como controles para descartar uniones erráticas, en ambos casos la lectura de los pozos donde se inmovilizó PCSK9 fue mayor pero no concluyente debido

a valores muy similares entre los controles negativos (BSA 3% y PBS 1X) y PCSK9, por lo que se continuó con las experimentaciones expresando un volumen pequeño de ambas cepas (100 mL) y realizando un ELISA de reconocimiento de las diferentes fracciones de extracción (Tris-Sac 20% y MgSO₄), sorprendentemente ambos mostraron un reconocimiento, siendo el extracto de MgSO₄ el de mayor reconocimiento en PK13 y el de Tris-Sacarosa 20% en el caso de PK16, esto podría deberse a características moleculares del vNAR como la síntesis y exportación de la molécula a la región periplásmica y la solubilidad de la molécula en ambas disoluciones. Para asegurar extraer la mayor concentración de vNAR de los extractos se optó por mezclar ambos para después ser purificados por la columna de afinidad a Níquel, la sugerencia se respaldó por el trabajo y la experiencia de Cabanillas-Bernal (2017) (Comunicación personal).

Para verificar la correcta realización de la purificación, se realizó un ELISA de reconocimiento de las eluciones de PK13 y PK16, los resultados indicaron una mayor concentración de los extractos de PK13 con una diferencia 7 veces mayor a la del blanco (valores de 0.5 contra 0.07), a diferencia de PK16 donde el extracto presenta valores mayores a las de las eluciones (valor de 0.11 contra los de 0.07 de la lectura superior), esto indica que el anticuerpo aún se encuentra en su totalidad en el extracto ya que los valores del blanco (PBS 1X) y las cinco eluciones son similares con valores entre los 0.08 y 0.06 de lecturas a 450 nm. Las posibles explicaciones a este inusual comportamiento pueden ser: 1.- El flujo del extracto a través de la columna, si este es demasiado rápido el vNAR no se adhiere correctamente a la resina, 2.- Degradación del vNAR, 3.- Resina vieja o sin Níquel y finalmente 3.- Presencia de un impedimento estérico. Ya que el flujo para la purificación de ambos (PK13 y PK16) fue el mismo y la lectura del extracto de PK16 aún después de la purificación es mayor comparado al blanco, podemos inferir que el vNAR aún está presente de forma íntegra en el extracto, por otra parte, la calidad de la resina fue la misma en ambos casos sin embargo, la posibilidad de que la marca de histidinas se encuentre obstruida por la estructura del vNAR es posible ya que desconocemos la estructura tridimensional. Debido a que únicamente logramos purificar parcialmente PK13 decidimos continuar las experimentaciones únicamente con un solo candidato.

En el proyecto nos enfrentamos a dos problemáticas experimentales: 1.- Expresión de vNAR y 2.- Purificación del vNAR. El crecimiento de la cepa PK13 para alcanzar su fase exponencial necesaria para la inducción de la proteína tiene una duración promedio de 5 h, generando un tiempo protocolario mayor a 11 h por lo que fue necesario ajustar el tiempo para finalizar la expresión, se realizaron más

de seis inducciones no todas con éxito, se cultivó a 30 °C toda la noche en la fase de inducción o se colocó el cultivo a 4 °C para posteriormente centrifugar el cultivo y obtener los botones celulares, fueron dos medidas que pretendían mejorar la síntesis de vNAR, sin embargo nos dimos cuenta que en ambos casos lo único que lográbamos era obtener un mayor concentrado de proteínas pero no necesariamente del vNAR, si no de proteínas contaminantes, sobre todo proteínas de alto peso molecular (≥ 25 kDa), se cambió la temperatura de inducción de 37 °C a 30 °C, esperando disminuir las proteínas contaminantes pero no hubo diferencia. Se liofilizó y posteriormente se dializó la proteína con una membrana de 10 000 MWCO contra PBS 0.5% para eliminar el Imidazol se intentó purificar mediante un protocolo de punto isoeléctrico, se realizó un ELISA de las fracciones recuperadas posterior a la purificación de punto isoeléctrico pero no obtuvimos resultados favorables.

En el protocolo de desnaturalización térmica, se logró retirar proteínas contaminantes, pero el Western Blot de los extractos tratados resultó negativo, indicando que no se expresó correctamente o que en el proceso de desnaturalización térmica afectó la viabilidad del anticuerpo.

Capítulo 5. Conclusiones

La bioselección del anticuerpo vNAR anti PCSK9 fue exitosa, obteniendo cinco prospectos de los cuales uno de ellos, PK13 fue seleccionada para trabajar los objetivos del proyecto.

Se logró demostrar que PK13 presenta reconocimiento por PCSK9, lo cual indica que es un candidato potencial para desarrollar una terapia contra la hipercolesterolemia familiar.

Purificar el PK13 por el método de punto isoeléctrico no se recomienda, la tecnología utiliza un buffer con guanidina que desnatura el vNAR.

No es posible purificar este vNAR por columna de afinidad a níquel, ya que proteínas contaminantes son afines a la columna.

Las diálisis generan pérdidas importantes de PK13.

Cada vNAR requiere de una estandarización en los procesos de producción y purificación.

Capítulo 6. Perspectivas

La extracción, purificación e inducción de la proteína requieren de la estandarización de los protocolos, de forma específica a PK13. Para mejorar la inducción se requerirá de una estandarización de la concentración de IPTG para identificar la concentración adecuada, así como un gradiente de concentración de Tris-Sacarosa que permita extraer únicamente la proteína periplásmica

En este proyecto realizamos una extracción de proteína total de la línea celular HepG2 (Datos no reportados), donde agregamos una concentración conocida de PCSK9 para verificar la disminución de LDLR (Receptor de lipoproteína de baja densidad), los resultados no fueron concluyentes al no presentar una diferencia en el gel con tinción de Comassie no se obtuvo un resultado concluyente en la inmunodetección, por lo que será necesario estandarizar el protocolo de extracción y la inmunodetección del receptor.

Con los resultados de este trabajo se podrá proponer un nuevo trabajo de investigación de maestría enfocado en la estandarización de los protocolos, direccionado en la producción de PK13 y un proyecto de doctorado en el análisis del anticuerpo y su efecto *in-vitro* e *in-vivo* en células HepG2 y un modelo murino de Hipercolesterolemia Familiar.

Literatura citada

- Ballantyne, C. M., Neutel, J., Cropp, A., Duggan, W., Wang, E. Q., Plowchalk, D., ... Bays, H. (2015). Results of bococizumab, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, from a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in statin-treated subjects with hypercholesterolemia. *American Journal of Cardiology*, *115*(9), 1212–1221. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.02.006>
- Bonnefond, A., Yengo, L., Le May, C., Fumeron, F., Marre, M., Balkau, B., ... Cariou, B. (2015). The loss-of-function PCSK9 p.R46L genetic variant does not alter glucose homeostasis. *Diabetologia*, *58*(9), 2051–2055. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3659-8>
- Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzalez, T., Paniagua-Solis, J., Sanchez, E., & Licea, A. (2013). Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark. *mAbs*, *5*(1), 80–85. <https://doi.org/10.4161/mabs.22593>
- Cameron, J., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., & Leren, T. P. (2006). Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Human Molecular Genetics*, *15*(9), 1551–1558. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl077>
- Cuchel, M., Bruckert, E., Ginsberg, H. N., Raal, F. J., Santos, R. D., Hegele, R. A., ... Chapman, M. J. (2014). Homozygous familial hypercholesterolaemia: New insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, *35*(32), 2146–2157. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu274>
- Endo, A. (2005). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, *592*(January), 583–592. <https://doi.org/10.1002/humu.20182>
- Fernández, J., Monsalvo, E., B, D. D., & L, D. M. (2017). Resúmenes de trabajos libres. *Revista Mexicana de Cardiología*, *28*, 99–239. Retrieved from www.medigraphic.org.mx
- Gagné, C., Bays, H. E., Weiss, S. R., Mata, P., Quinto, K., Melino, M., ... Gumbiner, B. (2002). Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *American Journal of Cardiology*, *90*(10), 1084–1091. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02774-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02774-1)
- Go, G. W., & Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale Journal of Biology and Medicine*, *85*(1), 19–28.
- Knowles, J. W., O'Brien, E. C., Greendale, K., Wilemon, K., Genest, J., Sperling, L. S., ... Khoury, M. J. (2014). Reducing the burden of disease and death from familial hypercholesterolemia: A call to action. *American Heart Journal*, *168*(6), 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2014.09.001>
- Liau, Y., Bahar, B., & Wijaya, A. (2010). The Correlation between Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) and Insulin Resistance and the Components of Atherogenic Lipoprotein Phenotype in Males with Central Obesity. *The Indonesian Biomedical Journal*, *2*(3), 137. <https://doi.org/10.18585/inabj.v2i3.128>

- Luirink, I. K., Hutten, B. A., & Wiegman, A. (2015). Optimizing Treatment of Familial Hypercholesterolemia in Children and Adolescents. *Current Cardiology Reports*, 17(9). <https://doi.org/10.1007/s11886-015-0629-1>
- Navar-Boggan, A. M., Peterson, E. D., D'Agostino, R. B., Neely, B., Sniderman, A. D., & Pencina, M. J. (2015). Hyperlipidemia in early adulthood increases long-term risk of coronary heart disease. *Circulation*, 131(5), 451–458. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012477>
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Humphries, S. E., Ginsberg, H. N., Masana, L., Descamps, O. S., ... Tybjaerg-Hansen, A. (2013). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *European Heart Journal*, 34(45), 3478–3490. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh273>
- Peterson, A. S., Fong, L. G., Young, S. G., & Editor, A. (2008). PCSK9 function and physiology 1. *Journal of Lipid Research*, 49, 1595–1599. <https://doi.org/10.1194/jlr.CX00001-JLR200>
- Poirier, S., & Mayer, G. (2013). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: New and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1135–1148. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S36984>
- Roth, E. M., Taskinen, M. R., Ginsberg, H. N., Kastelein, J. J. P., Colhoun, H. M., Robinson, J. G., ... Baccara-Dinet, M. T. (2014). Monotherapy with the PCSK9 inhibitor alirocumab versus ezetimibe in patients with hypercholesterolemia: Results of a 24 week, double-blind, randomized Phase 3 trial. *International Journal of Cardiology*, 176(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.049>
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., ... Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 928–933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100>
- Stanfield, R. L. (2004). Crystal Structure of a Shark Single-Domain Antibody V Region in Complex with Lysozyme. *Science*, 305(5691), 1770–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1101148>
- Velagaleti, R. S., Pencina, M. J., Murabito, J. M., Wang, T. J., Parikh, N. I., D'Agostino, R. B., ... Vasan, R. S. (2008). Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*, 118(20), 2057–2062. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784215>
- Xu, J., Murphy, S. L., Kochanek, K. D., Bastian, B. A., & Statistics, V. (2016). National Vital Statistics Reports Deaths : Final Data for 2013, 64(2).