

**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**

Generación y caracterización de tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos basadas en tres marcos de anticuerpos vNAR

Tesis

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

Presenta:

Olivia Cabanillas Bernal

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por

Olivia Cabanillas Bernal

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dra. Marta Ayala Ávila

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Olivia Cabanillas Bernal © 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 **Olivia Cabanillas Bernal** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Generación y caracterización de tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos basadas en tres marcos de anticuerpos vNAR

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Los fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo vNAR, derivados de tiburones, presentan características especiales en comparación con las moléculas convencionales de anticuerpos, como tamaño pequeño (12-15 kDa), estabilidad térmica y química y buena penetración tisular, entre otras. Estas características los vuelven una buena fuente alternativa de agentes terapéuticos o de diagnóstico. Por lo tanto, es esencial mejorar las técnicas utilizadas para el desarrollo y la selección de fragmentos vNAR que reconozcan y neutralicen a distintos antígenos. El desarrollo de bibliotecas sintéticas de fragmentos de anticuerpos, ofrece una opción rápida para la generación de anticuerpos con las características deseadas. En este trabajo se construyeron tres bibliotecas sintéticas de vNAR, nombradas VS0, VS1 y VS2, utilizando marcos de anticuerpos vNAR sin cisteínas, con una cisteína y con dos residuos de cisteínas dentro de su CDR3, respectivamente, con el objetivo de determinar si la presencia o ausencia de cisteínas en la CDR3 favorece el aislamiento de clonas vNAR de una biblioteca sintética. Las bibliotecas VS0, VS1 y VS2 presentaron tamaños de 1.2×10^9 , 4.0×10^9 y 3.4×10^{11} transformantes en total, respectivamente. Las bibliotecas se validaron realizando una selección contra seis proteínas de mamíferos (AQP1, VEGF, FGF-2, LIF, GYPA y CEA) y eritrocitos de gallina. Se obtuvo al menos un anticuerpo contra cada uno de los antígenos, y se aisló una clona contra todos los antígenos a partir de la selección con la biblioteca sin cisteína en su CDR3. Se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos seleccionados contra VEGF y CEA. Dos anticuerpos aislados contra VEGF (VS1-20 y VS0-4) fueron capaces de inhibir la angiogénesis *in vitro* en un modelo tridimensional de células endoteliales. En conclusión, nuestros resultados sugieren que durante la construcción de bibliotecas sintéticas el uso de marcos vNAR sin cisteínas en el CDR3 podría incrementar el aislamiento de anticuerpos funcionales de las bibliotecas y que tener un gran número de transformantes no garantiza el éxito de la biblioteca, como se observó con VS2. Además, los resultados de los ensayos de angiogénesis *in vitro* y análisis *in silico* con los anticuerpos anti-VEGF sugieren que los anticuerpos aislados de bibliotecas sintéticas pueden rivalizar a los anticuerpos aislados de bibliotecas inmunes naturales e incluso a los anticuerpos cuya afinidad ha sido mejorada a través de modelado *in silico*.

Palabras clave: Anticuerpos, vNAR, anticuerpos de dominio sencillo, bibliotecas sintéticas, VEGF, angiogénesis

Abstract of the thesis presented by **Olivia Cabanillas Bernal** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Generation and characterization of three synthetic antibody libraries based on three vNAR antibody frameworks

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

Single domain antibodies derived from sharks, vNAR, present special characteristics in comparison to the conventional antibody molecules such as: small size (12-15 kDa), thermal and chemical stability and great tissue penetration, among other. These characteristics make them a good alternative source as therapeutic or diagnostic agents. Therefore, it is essential to improve techniques used for the development and selection of vNAR antibodies that recognize distinct antigens. The development of synthetic antibody libraries offers a fast option for the generation of antibodies with the desired characteristics. In this work three synthetic antibody libraries were constructed, named VS0, VS1 and VS2, using vNAR antibody frameworks without cysteines, with one cysteine and with two cysteine residues within its CDR3, with the objective of determining whether the presence or absence of cysteines in the CDR3 favors the isolation of vNAR clones from a synthetic library. The libraries VS0, VS1 and VS2 presented sizes of 1.2×10^9 , 4.0×10^9 y 3.4×10^{11} transformants altogether, respectively. The libraries were validated selecting against six mammal proteins (AQP1, VEGF, FGF-2, LIF, GYPA and CEA) and chicken erythrocytes. At least one vNAR was found for each of the antigens, and a clone coming from the library without cysteine in the CDR3 was selected with all the antigens. The functionality of the selected antibodies against VEGF and CEA was evaluated. Two antibodies isolated against VEGF (VS1-20 and VS0-4) were able to inhibit *in vitro* angiogenesis in a three-dimensional model of endothelial cells. An antibody selected against CEA, named CV0-43, was able to recognize soluble CEA and CEA on the surface of HCT-116 colorectal carcinoma cells, when was tested by flow cytometry. In conclusion, our results suggest that the use of vNAR frameworks without Cys residues could increase the isolation of functional antibodies within the synthetic libraries and that having a large number of transformants does not ensure the success of the library as our results show with VS2 library. In addition, the results of *in vitro* angiogenesis assays and *in silico* analysis of anti-VEGF antibodies suggest that antibodies isolated from synthetic libraries can rival antibodies whose affinity has been improved through *in silico* modeling.

Keywords: Antibodies, vNAR, single domain antibodies, synthetic libraries, VEGF, angiogenesis

Dedicatoria

A Roberto, mi esposo y mejor amigo. Mis logros no serían lo mismo si no estuvieras tu a mi lado para compartirlos. Eres mi inspiración y mi mayor motivación. Gracias por apoyar mis sueños y abrazarlos como tuyos, se que nuestras mejores aventuras están por comenzar ¡Te amo!

A mis padres Olivia y Efrén, que siempre me han apoyado y lo han dado todo para que yo salga adelante, este logro es también suyo. A mi hermana Brenda. A pesar de la distancia, siempre los siento muy cerca de mi.

¡Los amo!

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado, con número de registro 262463 del programa de becas del posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad de incorporarme al Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida.

A mi director de tesis, Dr. Alexei Fedórovich Licea Navarro por aceptarme como su estudiante y permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Por toda la confianza que me brindo para sacar adelante este proyecto y por permitirme crecer personal y profesionalmente. ¡Gracias por todas sus enseñanzas Doc!

A la Dra. Marta Ayala Ávila, por su apoyo incondicional, su constante asesoría y motivación a pesar de la distancia. Por sus comentarios y consejos que fueron una parte fundamental en mi trabajo de tesis. Por su disponibilidad en todos los trámites. Por abrirme las puertas de su país, su laboratorio, su casa. Sobre todo, por su amistad sincera. ¡Gracias Marta!

Al Dr. Alejandro Huerta Saquero, por su apoyo a lo largo de mis estudios de Doctorado, por sus críticas constructivas y sugerencias. Gracias por su buena disponibilidad siempre, por confiar y motivarme.

Al Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier, por sus comentarios, sugerencias y apoyo que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba por la oportunidad de realizar una estancia de investigación para capacitarme en la técnica de Mutagénesis de Kunkel. Especialmente a la Dra. Marta Ayala y su grupo de trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos.

A la Universidad de Costa Rica, por permitirme realizar una estancia de investigación en el Instituto Clodomiro Picado para capacitarme en la técnica de esferoides tridimensionales de células endoteliales. Especialmente a la Dra. Teresa Escalante, por asesorarme durante mi estancia, por su buena disponibilidad e interés en mi proyecto y por compartir sus conocimientos.

Al M.C. Jahaziel Gaperin, por su apoyo en diferentes etapas de mi proyecto. Por sus consejos y enriquecedoras discusiones que fueron importantes en mi trabajo de tesis.

Al M.C. Salvador Dueñas por su apoyo en los ensayos de modelado *in silico* de anticuerpos anti-VEGF.

Al Dr. Luis Donis por su valioso apoyo y enseñanzas durante los ensayos de citometría de flujo.

Al personal técnico del Departamento de Innovación Biomédica. Dra. Johana Bernaldez Sarabia por la capacitación y enseñanzas en cultivo celular. Al Dr. Ricardo Gonzales por su buena disponibilidad y mantenimiento de los equipos. A la M.C. Samanta Jimenez, por su apoyo en todas las compras de material, por su buena atención y sobre todo, por su amistad.

Al personal académico del programa de posgrado en Ciencias de la Vida por sus valiosas clases y conocimientos compartidos.

A todo el personal administrativo de CICESE por su apoyo en los diferentes trámites a lo largo de mis estudios de doctorado, especialmente a Adriana Mejía, por toda su atención y amabilidad durante estos años, por siempre dar un extra cuando la necesitaba, ¡gracias Adri! y a Gabriela Altamirano por su ayuda y buena disposición en todos los trámites de compras y de mis estancias.

A Dios, por llenarme de fe, brindarme salud, fuerza y confianza para salir adelante. ¡Gracias siempre!

A mi amiga, María Fernanda Lazo (Dra. Mafer), por tu amistad incondicional, tu confianza y consejos tanto en lo personal como en lo profesional. Por estar siempre ahí a pesar de la distancia. Tu amistad es única y la atesorare siempre.

A Andrea Verdugo, por su amistad, apoyo, consejos. Gracias por escucharme y encontrar siempre un espacio para compartir conmigo. Ahora sigues tú y se que vas todo.

A Vanessa y Erika por su amistad y sus palabras de apoyo, por todas las buenas platicas y cafecitos que compartieron conmigo.

A todos los compañeros de posgrado que compartieron conmigo momentos inolvidables e hicieron más divertida mi estancia en CICESE, en especial a las chicas de lab y los chicos de acuicultura. Gracias por los buenos momentos.

A todas las personas que han puesto su confianza en mí y que me han apoyado y alentado de diferentes maneras a lo largo de mi formación personal y profesional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xiii
Lista de acrónimos.....	xiv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Anticuerpos.....	1
1.1.2 Nuevo receptor del antígeno (IgNAR).....	3
1.1.3 Tipos de IgNAR.....	5
1.1.4 Bibliotecas de anticuerpos vNARs.....	6
1.1.4.1 Bibliotecas sintéticas y semisintéticas de anticuerpos vNAR.....	7
1.1.5 Mutagénesis de Kunkel	10
1.1.6 Bacteriofagos filamentosos y despliegue en fagos.....	12
1.1.7 Vectores fagémidos.....	13
1.1.7.1 pComb3X	14
1.1.8 VEGF y angiogénesis.....	14
1.1.9 Antígeno carcinoembrionario.....	16
Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos.....	17
2.1 Justificación.....	17
2.2 Hipótesis.....	17
2.3 Objetivos.....	18
2.3.1 Objetivo General.....	18
2.3.2 Objetivos Específicos.....	18

Capítulo 3. Materiales y Métodos.....	19
3.1 Fagémido y cepas de <i>E. coli</i> utilizadas.....	19
3.2 Selección y síntesis de marcos vNAR.....	19
3.3 Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos.....	20
3.4 Amplificación de los genes de interés e inserción de sitios de restricción Sfi I.....	20
3.5 Digestión de los genes y vector pComb3X con la enzima Sfi I.....	21
3.6 Ligación de los genes de interés en el vector pComb3X.....	22
3.7 Preparación de Células CJ236 quimiocompetentes y transformación con pComb3X...	23
3.8 Producción de fago y ADNss que contenga uracilo.....	23
3.9 Mutagénesis de Kunkel.....	24
3.9.1 Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos.....	24
3.9.2 Alineamiento del oligonucleótido fosforilado y el ADNss templado.....	25
3.9.3 Reacción de rellenado.....	25
3.9.4 Electroporación del ADN mutagénico en células TG1.....	25
3.9.5 Diluciones para estimar el tamaño de la biblioteca.....	26
3.9.6 Producción de fago de la biblioteca.....	26
3.9.7 ELISA de funcionalidad de la biblioteca.....	27
3.10 Validación de las bibliotecas por despliegue en fagos.....	28
3.10.1 Selección de antígenos.....	28
3.10.2 Reamplificación de la biblioteca sintética.....	28
3.10.3 Rondas de Selección.....	29
3.10.4 Producción de fagos de colonias aisladas.....	31
3.10.5 ELISA de fagos.....	31
3.11 Transformación de células BL21 (DE3) electrocompetentes.....	32
3.12 Expresión y extracción periplásmica de anticuerpos vNAR recombinantes.....	33
3.13 Ensayo ELISA para evaluar expresión de los vNARs recombinantes.....	33
3.14 Purificación de los anticuerpos recombinantes.....	34
3.15 Inmunodetección de las proteínas recombinantes.....	34
3.16 Ensayo ELISA para evaluar la habilidad de reconocimiento de los vNARs a su blanco..	35
3.16.1 Titulación de anticuerpos anti-CEA.....	36
3.17 Síntesis y clonación de los genes del anticuerpo anti-VEGF VS2-5.....	36
3.18 Modelado <i>in silico</i> de los anticuerpos anti-VEGF e interacción energética con VEGF..	37
3.18.1 Modelado por homología de los anticuerpos anti-VEGF.....	37

3.18.2 Dinámica molecular – estrategia de recocido simulado.....	37
3.18.3 Acoplamiento, afinidad proteína-proteína y predicciones de superficie de interacción.....	38
3.18.4 Análisis de la actividad de bloqueo de VS0-4 y P98Y en la interacción VEGF/VS1-20 por ELISA competitivo.....	39
3.19 Evaluación de la función de los anticuerpos de las bibliotecas sintéticas.....	40
3.19.1 Evaluación del efecto antiangiogénico <i>in vitro</i> de los anticuerpos anti-VEGF.....	40
3.19.1.1 Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).....	40
3.19.1.2 Tripsinización de células HUVEC a temperatura ambiente.....	40
3.19.1.3 Formación de esferoides de células endoteliales (HUVEC).....	41
3.19.1.4 Inclusión de los esferoides en gel de colágeno.....	41
3.19.1.5 Angiogénesis <i>in vitro</i> : tratamiento de los esferoides con VEGF y anticuerpos anti-VEGF.....	42
3.19.2 Reconocimiento a CEA en la superficie de células de cáncer de colon HCT-116 por citometría de flujo.....	42
3.19.2.1 Cultivo de la Línea Celular HCT-116.....	42
3.19.2.2 Marcaje extracelular de CEA por Citometría de flujo.....	43
Capítulo 4. Resultados	45
4.1 Amplificación de los genes sintéticos y ligación en el vector pComb3X	45
4.2 Construcción de las bibliotecas sintéticas	46
4.3 Validación de las bibliotecas sintéticas.....	51
4.3.1 Selección contra eritrocitos de gallina.....	51
4.3.2 Selección contra AQP1.....	52
4.3.3 Selección contra VEGF.....	53
4.3.4 Selección contra FGF-2.....	54
4.3.5 Selección contra LIF.....	56
4.3.6 Selección contra Glicoforina humana A.....	57
4.3.7 Selección contra CEA.....	58
4.4 Expresión de los anticuerpos y capacidad de reconocimiento a su blanco.....	59
4.4.1 Anticuerpos anti-eritrocitos de gallina.....	60
4.4.2 Anticuerpos anti-AQP1.....	60
4.4.3 Anticuerpos anti-VEGF.....	61
4.4.4 Anticuerpos anti-FGF-2.....	62
4.4.5 Anticuerpos contra-LIF.....	63

4.4.6 Anticuerpos contra-GYPA.....	64
4.4.7 Anticuerpos contra-CEA.....	65
4.5 Evaluación de reactividad cruzada de anticuerpos vNAR cotra TGFβ.....	67
4.6 Expresión y purificación de anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA.....	68
4.6.1 clonación del anticuerpo anti-VEGF VS2-5.....	70
4.7 Modelado <i>in silico</i> de los vNARs anti-VEGF: Modelado por homología y dinámica molecular.....	72
4.7.1 Docking, afinidad proteína-proteína y predicciones de superficie de interacción de los anticuerpos anti-VEGF.....	72
4.7.2 Actividad de bloqueo de VS0-4 y V13_P98Y en la interacción VEGF / VS1-20.....	75
4.8 Ensayos de actividad de los anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA.....	76
4.8.1 Evaluación del efecto antiangiogénico de VS0-4 y VS1-20 en un modelo de angiogénesis utilizando esferoides tridimensionales de células endoteliales.....	76
4.8.2 Marcaje extracelular de CEA por Citometría de flujo con el anticuerpo CV0-43.....	77
Capítulo 5. Discusión	80
Capítulo 6. Conclusiones	86
6.1 Perspectivas.....	86
Lietrarura citada	88

Lista de figuras

Figura		Página
1	Molécula convencional de anticuerpo.....	2
2	Representación esquemática de la molécula IgNAR y estructura del dominio vNAR.....	4
3	Distribución del patrón de cisteínas en los diferentes tipos de vNAR.....	6
4	Representación del bacteriofago filamentoso M13 con un vNAR desplegado en la superficie.....	13
5	Estructura de VEGF resuelta por cristalografía de rayos X.	15
6	Secuencias de los dominios vNAR utilizados como marco para la construcción de las bibliotecas.....	20
7	Oligonucleótidos mutagénicos utilizados para diversificar el CDR3 de las bibliotecas.....	20
8	CDR3 de las cuatro versiones de VS2-5.....	36
9	Amplificación de los genes sintéticos.....	45
10	pComb3X digerido con Sfi I.....	46
11	Producción de ADN de cadena sencilla uracilada.....	47
12	Síntesis de ADN de doble cadena mutagénico.....	48
13	PCR de colonias de las bibliotecas.....	49
14	Variabilidad obtenida en el CDR3 a partir del marco T1.....	50
15	Variabilidad obtenida en el CDR3 a partir del marco T20.....	50
16	Variabilidad obtenida en el CDR3 a partir del marco TN16.....	50
17	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-eritrocitos de gallinas.....	52
18	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-eritrocitos de gallinas.	52
19	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-AQP1.....	53
20	CDR3 de la clona aislada durante la selección VS1-AQP1.....	53
21	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-VEGF.....	53
22	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-VEGF.....	54
23	CDR3 de la clona aislada durante la selección VS2-VEGF.....	54
24	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-FGF-2.....	55
25	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-FGF-2.....	55
26	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-LIF	56
27	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-LIF	56
28	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS2-LIF	57
29	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-GYPA	57

30	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-GYPA	58
31	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-CEA	58
32	Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-CEA	59
33	Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-AQP1.....	60
34	Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a AQP1.....	61
35	Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-VEGF	61
36	Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a VEGF	62
37	Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-FGF-2.....	62
38	Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a FGF-2.....	63
39	Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-LIF.....	63
40	Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a LIF	64
41	Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-GYPA	64
42	Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-CEA	65
43	Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a CEA	66
44	Titulación del reconocimiento de anticuerpos anti-CEA.....	66
45	Evaluación de reactividad cruzada de anticuerpos vNAR contra TGF β	67
46	Western blot de los anticuerpos anti-VEGF purificados	69
47	Ensayo ELISA para evaluar reconocimiento a VEGF.....	69
48	Western blot del anticuerpo CV0-43, anti-CEA, purificado	70
49	Ensayo ELISA para evaluar reconocimiento a CEA	70
50	ELISA para evaluar expresión de VS2-5AQ y VS2-5CQ	71
51	ELISA para evaluar el reconocimiento a VEGF.....	71
52	Estructura tridimensional de VS0-4 y VS1-20.....	72
53	Análisis de interacción proteína-proteína en la herramienta web ClusPro y Peptiderive.	74
54	Capacidad de unión del fago VS1-20 a VEGF mediante ELISA competitivo.....	76
55	Ensayo de angiogénesis 3-Dimensional <i>in vitro</i> basado en esferoides de células endoteliales (EC) incluidas en gel de colágeno	77
56	Morfología de las células HCT-116.....	78
57	Histograma representativo de anti-CEA en dos líneas celulares.....	78
58	Índice de MFI.....	79

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Reportes de construcción de bibliotecas sintéticas de dominios vNAR	10
2	Oligonucleótidos específicos de T1, T20 y TN16 con sitios Sfi I.....	21
3	Condiciones de PCR para amplificar secuencia de dominio vNAR con oligonucleótidos específicos.....	21
4	Reacción de digestión de los genes sintéticos y el vector pComb3X con la enzima Sfi I	21
5	Reacción de ligación de los genes sintéticos en el vector pComb3X	22
6	Condiciones de PCR para amplificar secuencia de dominio vNAR con oligonucleótidos Ompseq y gback.....	23
7	Oligonucleótidos específicos de las versiones VS2-5.....	37
8	Tamaño estimado de las bibliotecas sintéticas.....	51
9	Resumen de anticuerpos obtenidos en la validación de las bibliotecas sintéticas.....	68
10	Valores de interacción de los complejos vNAR/VEGF.....	73

Lista de acrónimos

ADNds	ADN de doble cadena
ADNss	ADN de cadena sencilla
AQP1	Aquaporina 1
BoNT/A	Ricina y toxina botulínica A
CDR	Región determinante de complementariedad
CEA	Antígeno carcinoembrionario
Cys	Cisteína
ECGM	Medio de crecimiento de células endoteliales
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EpCAM	Molécula de adhesión celular epitelial
EphA2	receptor Ephrin tipo A 2
Fab	Fragmentos de unión al antígeno
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
FGF-2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico
FR	Framework
GYPA	Glicoforina humana A
Ig	Inmunoglobulina
IgNAR	Nuevo Receptor del Antígeno
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
MB	Medio basal
REU	Unidades de energía de Rosetta
ScFv	Fragmento variable de cadena sencilla
sdAb	Anticuerpo de dominios sencillo
SEB	Enterotoxina estafilocócica B
TA	Temperatura ambiente
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

1.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son proteínas circulantes producidas en los vertebrados en respuesta a la exposición a elementos foráneos conocidos como antígenos, entre los que se incluyen microbios y macromoléculas como proteínas, polisacáridos, entre otros. (Abbas *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

Las Ig pueden aparecer en dos formas: como anticuerpos unidos a membrana sobre la superficie de los linfocitos B, donde actúan como receptores para los antígenos y como anticuerpos solubles que residen en el plasma (porción líquida de la sangre), los tejidos y las mucosas, donde se unen a los antígenos, neutralizan las toxinas e impiden la entrada y propagación de patógenos (Abbas *et al.*, 2008). Existen cinco clases de inmunoglobulinas (Igs) predominantes, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, las cuales difieren en sus propiedades biológicas, composición, tamaño y la forma en que las que se encuentran, ya sea como receptores de membrana o en circulación en el plasma (Alberts *et al.*, 2008).

Un anticuerpo convencional tiene una estructura básica simétrica compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas, también idénticas, unidas por enlaces disulfuro (Figura 1). Tanto las cadenas ligeras como las pesadas contienen una serie de unidades homólogas que se repiten, cada una de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, que se repliegan de forma independiente en una estructura globular denominada dominio Ig. Las cadenas ligeras (L) y pesadas (H) constan de regiones variables amino terminales (V) que participan en el reconocimiento del antígeno y de regiones constantes carboxilo terminales (C), encargadas de mediar las funciones efectoras (lisis celular, citotoxicidad) (Abbas *et al.*, 2008).

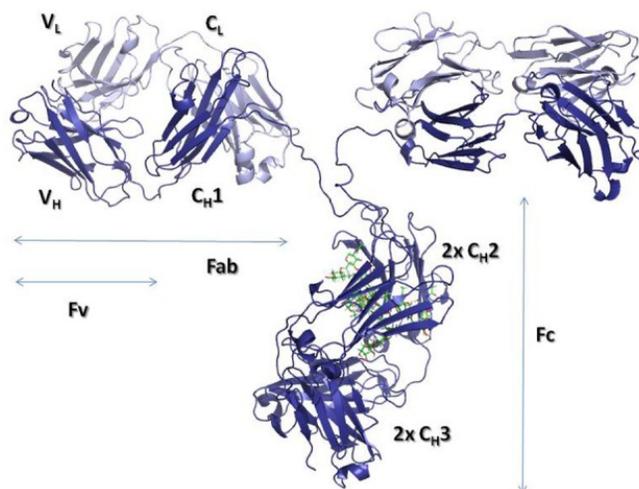


Figura 1. Molécula convencional de anticuerpo. Representación de cintas de una molécula de IgG intacta (PDBID: 1IGT). Las cadenas pesadas se muestran en azul oscuro, mientras que las cadenas ligeras se colorean en azul claro. Los carbohidratos unidos a los dominios CH2 están representados con barras. (Figura modificada de Finlay y Almagro, 2012).

Dentro de la región variable de la cadena pesada (VH), como en la región variable de la cadena ligera (VL), se encuentran tres segmentos hipervariables, también conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables del dominio VH y las tres regiones hipervariables del dominio VL se encuentran juntas y forman el sitio de unión al antígeno. La mayoría de las diferencias en las secuencias entre distintos anticuerpos se debe a estos tres segmentos, siendo la región CDR3 la de mayor variabilidad, confiriéndole al anticuerpo mayor especificidad y afinidad (Abbas *et al.*, 2008).

Las moléculas de anticuerpo reciben mucha atención por parte de la industria farmacéutica, debido a su capacidad para proteger al organismo contra infecciones, células malignas y moléculas tóxicas. El primer mAb terapéutico fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 1986, muromonab, un mAb murino contra el receptor CD3 de linfocitos T, para el control de rechazo de trasplantes. La naturaleza murina de estos mAbs fue un problema crítico, ya que indujeron reacciones adversas y la respuesta de inmunogenicidad conocida como anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) o anti-idiotípicos (Santos *et al.*, 2018).

La búsqueda de nuevas moléculas de mAbs se basa en tratar de evitar problemas de seguridad y eficacia, disminuyendo el potencial inmunogénico de estas moléculas y posibilitando el uso terapéutico

de los anticuerpos durante largos períodos. De esta manera, los avances técnicos y los incrementos de conocimiento en el campo de la biología molecular han permitido la producción de anticuerpos recombinantes mediante tecnologías de ingeniería de anticuerpos (Almagro y Fransson, 2008). Esto ha permitido el desarrollo de diferentes formatos de mAbs, como anticuerpos quéricos, humanizados, totalmente humanos o fragmentos de los mismos (Holliger y Hudson, 2005).

A partir de octubre de 2017, 61 mAbs y 11 proteínas de fusión Fc se encuentran en el mercado luego de haber sido aprobadas por la FDA y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). De estos mAbs aprobados, 5 son fragmentos de anticuerpos (6.9 %): 4 fragmentos de unión al antígeno (Fab) y 1 fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Los mAbs de tamaño completo representan el 77.8% de los mAbs en la clínica y el 15.3% son proteínas de fusión Fc (Santos *et al.*, 2018). La mAbs que han recibido su primera aprobación para comercialización en Estados Unidos o la Unión Europea, ha ido en aumento o se ha igualado de 2014 a 2017 con 6, 9, 6 y 10 aprobaciones respectivamente (Kaplon y Reichert, 2018).

Con el objetivo de mejorar las propiedades de estas moléculas, se han desarrollado formatos de anticuerpo alternativos, dentro de los que se encuentran los anticuerpos de dominio sencillo que conservan la capacidad parental de unión al antígeno, de la molécula completa (Conrath *et al.*, 2003). Los fragmentos pequeños de anticuerpos poseen una mejor capacidad de penetrar en tejidos densos como tumores y parecen ser más efectivos que los anticuerpos completos (Saerens *et al.*, 2008). El futuro de todos estos pequeños dominios sencillos es proporcionar nuevas especificidades de unión, en particular para objetivos inaccesibles para los sitios convencionales de unión al antígeno, como receptores acoplados a proteínas G, sitios activos de enzimas, entre otros (Holliger y Hudson, 2005).

1.1.2 Nuevo receptor del antígeno (IgNAR)

Como respuesta a la tendencia de minimizar los formatos de anticuerpo a fragmentos mínimos de unión por el antígeno, se han encontrado dos isotipos únicos de anticuerpos de dominios sencillos (sdAb), cuya región de unión al antígeno, esta comprendida en un dominio único. Uno de estos isotipos, se encuentra presente en el suero de los camélidos. Estos anticuerpos nombrados HCAb, carecen del dominio constante 1 (CH1) y del total de cadenas ligeras (Figura 2).

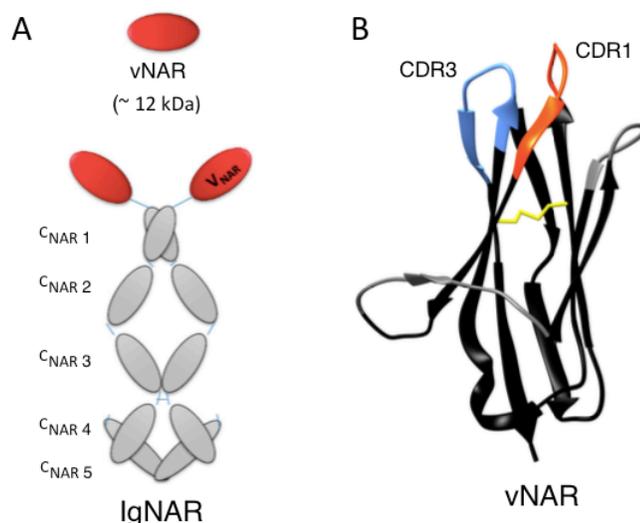


Figura 2. Representación esquemática de la molécula IgNAR y estructura del dominio vNAR. A) Representación esquemática de la molécula IgNAR. Se marca el dominio variable (óvalo rojo) y los dominios constantes (óvalo gris). B) Estructura del dominio variable vNAR, modificado de ID PDB 4HGK (Las regiones CDR1 y CDR3 se representan en naranja y azul, respectivamente) (Figura modificada de Leow *et al.*, 2017 y Grzeschik *et al.*, 2017).

En los peces cartilaginosos, como los tiburones, ha sido también reportada la presencia de Igs compuestas solo de la cadena pesada. Esta Ig denominada Nuevo Receptor del Antígeno (IgNAR), es un homodímero de dos cadenas pesadas idénticas unidas por enlaces disulfuro, que carece de cadenas ligeras. Cada cadena pesada posee cinco dominios constantes y un dominio variable denominado vNAR, que es el encargado del reconocimiento del antígeno (Greenberg *et al.*, 1995; Conrath *et al.*, 2003).

Los dominios vNAR poseen características especiales como tamaño pequeño (~12-15 kDa) y un CDR3 largo y extendido (10-35 aa) (Roux *et al.*, 1998; Nuttall, *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002). Estas moléculas han mostrado ventajas sobre las moléculas enteras de anticuerpos convencionales como alta estabilidad térmica y química, mejor penetración en tejidos, resistencia a pH gástricos, entre otras (Dooley *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Kovaleva *et al.*, 2017; Camacho-Villegas *et al.*, 2018). Estas características únicas vuelven a estos anticuerpos candidatos idóneos para fines biotecnológicos y terapéuticos (Matz y Dooley, 2018).

1.1.3 Tipos de IgNAR

Los anticuerpos IgNAR han sido clasificados en varios tipos estructurales en función del número y la posición de los residuos de cisteína (Cys) no canónicas en los CDRs y estructuras framework (FR) de los dominios vNAR, que son adicionales al par de Cys canónica (Cys23/Cys88 para los dominios VL) de los dominios con pliegue Ig (Greenberg *et al.*, 1995; Nuttall *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Barelle *et al.*, 2009; Kovalenko *et al.*, 2013; Kovaleva *et al.*, 2014; Barelle y Porter., 2015).

El vNAR de tipo I, posee residuos de Cys no canónicas en el FR 2 y 4, así como un número par de Cys en el CDR3 (2 o 4 Cys). Los residuos de cisteína en el FR 2 y 4 forman un enlace disulfuro intraloop con el par de cisteínas en el CDR3. Hasta la fecha, este tipo de vNAR a sido reportado solo en el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) (Greenberg *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 2002). El vNAR de tipo II presenta una estructura más simple en comparación al tipo I, con residuos de Cys no canónicas en el CDR1 y CDR3, que forman un enlace disulfuro intra-molecular (Greenberg *et al.*, 1995; Nuttall *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002). El vNAR tipo III, es similar al tipo II, con Cys no canónicas en el CDR1 y CDR3, pero también posee un residuo de triptófano (Trp) invariable dentro del CDR1, que no está presente en el tipo I y tipo II. El vNAR tipo III se encuentra principalmente en tiburones recién nacidos (< 1 año), presenta un CDR3 de tamaño constante y su diversidad es limitada, probablemente sirve como primera línea de defensa contra patógenos antes de la maduración del sistema inmune del tiburón adulto (Greenberg *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 2002S; Liu *et al.*, 2007). El vNAR tipo IV (también llamado tipo IIb) posee solo los dos residuos de Cys canónicas de los dominios variables de Ig y difiere de los tipos de vNAR previamente descritos debido a la ausencia de residuos de Cys no canónicos y enlaces disulfuro no canónicos (Nuttall *et al.*, 2001; Kovalenko *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2007). Un tipo de vNAR estructuralmente diferente ha sido nombrado tipo IIIb, tiene alta similitud con el tipo IV, careciendo de residuos de Cys no canónicos y de los enlaces disulfuro no canónicos resultantes, pero como el tipo III, posee un residuo de Trp conservado en el CDR1 (Kovaleva *et al.*, 2014; Barelle y Porter, 2015). Un tipo de vNAR diferente a todos los reportados con anterioridad ha sido identificado en el repertorio inmune del tiburón cornudo. Este ha sido nombrado tipo V, posee un par de residuos de Cys no canónicas en el CDR3 y un par adicional de Cys en el CDR1 (a diferencia del tipo I, que presenta un par de cisteínas no canónicas en el FR2 y FR4) (Figura 3).

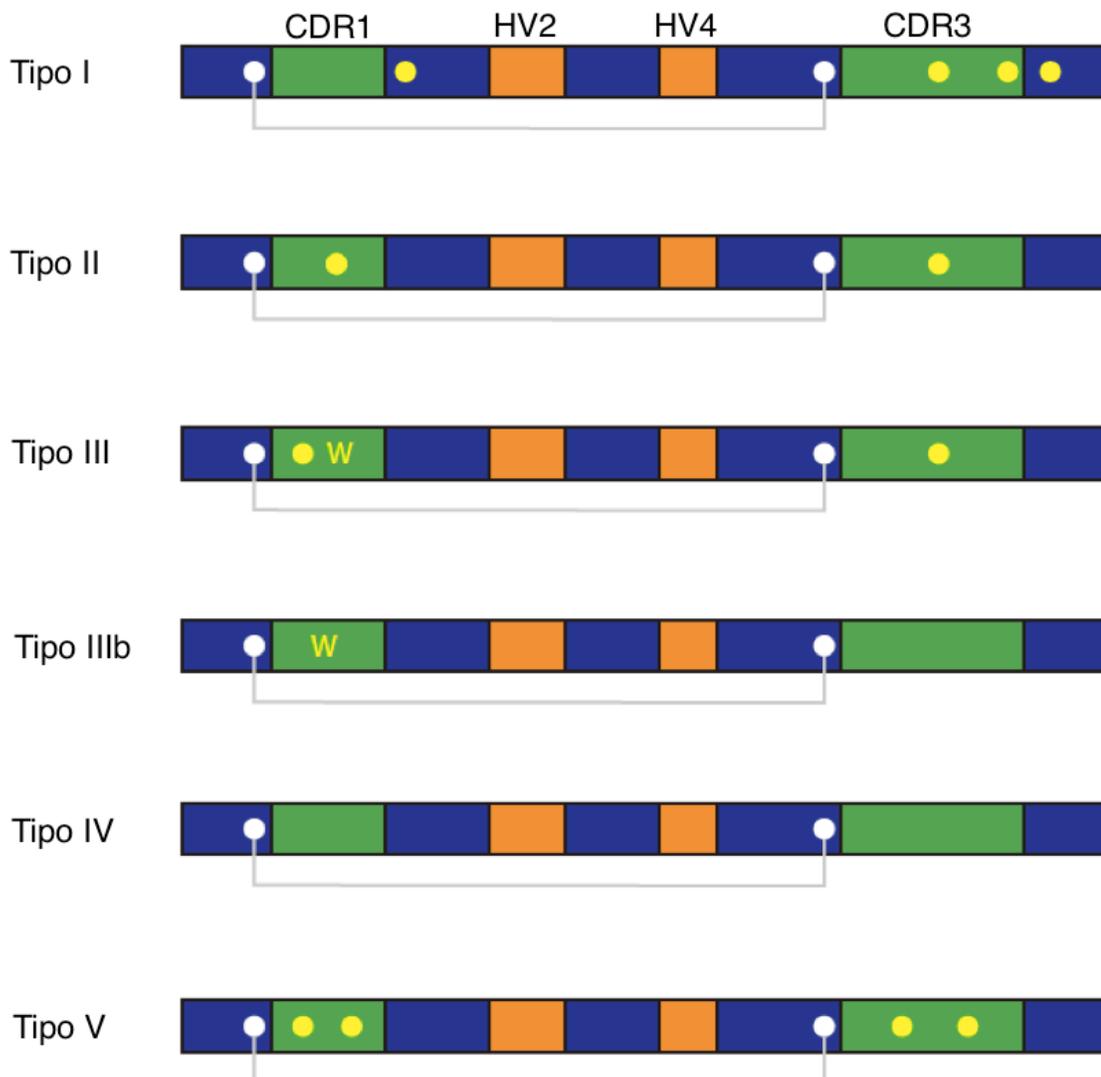


Figura 3. Distribución del patrón de cisteínas en los diferentes tipos de vNAR. Se marcan los residuos de cisteína canónicos (puntos blancos), residuos de cisteína no canónicos (puntos amarillos) y el enlace disulfuro conservado (línea gris) en todos los dominios V de la familia de Inmunoglobulinas. (CDR): Región determinante de la complementariedad; (HV): Loop hipervariable.

1.1.4 Bibliotecas de anticuerpos vNARs

Las bibliotecas de anticuerpos son grandes repertorios de anticuerpos, con millones de variantes. Existen varias estrategias para generar grandes bibliotecas de anticuerpos, que pueden ser clasificadas de acuerdo a la fuente de su diversidad ya sea obtenida de fuentes biológicas (naturales) o químicas (sintéticas) (Miersch y Sidhu, 2012).

Se han utilizado dos estrategias para generar bibliotecas naturales de vNARs 1) Bibliotecas no inmunes, donde la amplificación del repertorio vNAR se realiza a partir de animales no inmunizados, estas bibliotecas se basan en el repertorio de vNARs primario existente (Nutall *et al.*, 2002); o 2) bibliotecas inmunes, donde los animales fueron inmunizados con el antígeno de interés (Dooley *et al.*, 2003; Goodchild *et al.*, 2011; Camacho-Villegas *et al.*, 2013). Las bibliotecas naturales inmunes o no inmunes, amplifican el repertorio vNAR a partir de linfocitos de sangre periférica o de cDNA aislado del bazo, mediante el uso de oligonucleótidos específicos para el FR1 y FR4.

Dos estrategias alternativas a las bibliotecas naturales son 3) las bibliotecas semisintéticas, las cuales utilizan como andamio una biblioteca vNAR natural inmune o no inmune, en la cual el CDR3 es aleatorizado con diversas longitudes y contenido de aminoácidos (Nutall *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007b) y 4) las bibliotecas sintéticas, que evitan la inmunización animal y utilizan como marco una o varias secuencias vNAR conocidas, en las cuales se inserta diversidad de manera artificial, principalmente en el CDR3, mediante el uso de oligonucleótidos mutagénicos degenerados (Benhar, 2007; Burgess *et al.*, 2016).

1.1.4.1 Bibliotecas sintéticas y semisintéticas de anticuerpos vNAR

Se ha reportado que el sistema inmune de los tiburones ofrece una buena respuesta de anticuerpos contra diferentes proteínas (Dooley *et al.*, 2003; Goodchild *et al.*, 2011; Camacho-Villegas *et al.*, 2013; Camacho-Villegas *et al.*, 2018), sin embargo, la respuesta IgNAR en tiburones es más lenta que el proceso similar observado en mamíferos y la obtención de la respuesta de anticuerpos deseada puede tardar hasta 6 meses, como se ha visto para *G. Cirratum*, *Squalus acanthias* y *Scyliorhinus canicula* (Dooley y Flajnik, 2005; Muller *et al.*, 2012; Crouch *et al.*, 2013) e incluso no hay garantía de obtener anticuerpos altamente específicos de bibliotecas de tiburones inmunizados (Zielonka *et al.*, 2014).

Una ventaja importante de las bibliotecas sintéticas sobre las naturales, es que evitan por completo uso de animales vivos y su inmunización y permiten la generación relativamente fácil de anticuerpos recombinantes con especificidades por prácticamente cualquier antígeno de interés, disminuyendo el tiempo en que se puede aislar un anticuerpo (Nelson y Sidhu, 2012).

Las bibliotecas sintéticas de anticuerpo ofrecen diversidades que rivalizan o superan las de los repertorios inmunes naturales. Mientras que las bibliotecas naturales ofrecen tamaños de alrededor de

5×10^5 - 3×10^7 transformantes totales (Nuttall *et al.*, 2001; Nuttall *et al.*, 2002; Dooley *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2012; Leow *et al.*, 2018), la construcción de bibliotecas sintéticas han reportado tamaños de van de 1×10^8 - 3×10^9 transformantes totales (Shao *et al.*, 2007; Könnig *et al.*, 2017; Zielonka *et al.*, 2014).

Los enfoques sintéticos son particularmente efectivos para diseñar las propiedades de anticuerpos deseados. Estas bibliotecas permiten el uso de cualquier marco de anticuerpo de elección y estos pueden ser elegidos por sus propiedades favorables, como alta estabilidad y expresión, baja inmunogenicidad, entre otras. La construcción de bibliotecas sintéticas han adoptado principalmente uso de PCR de extensión por solapamiento, oligonucleótidos degenerados o PCR propenso a errores (Shao *et al.*, 2007; Könnig *et al.*, 2017; Zielonka *et al.*, 2014).

El CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos recibe especial interés, debido que es el CDR que forma el mayor número de contactos con el antígeno, está localizado en el centro del sitio de unión a la molécula antigénica y es por mucho el “bucle” más diverso en longitud y secuencia de los CDRs (Stanfield *et al.*, 2004; Almagro *et al.*, 2012). Debido a esto, es la región a la que suele dirigirse la diversificación en la construcción de bibliotecas sintéticas de anticuerpos. No se conoce si la presencia o cantidad de cisteínas dentro del CDR3 de anticuerpos de bibliotecas sintéticas vNAR, puede afectar el éxito de selección de las bibliotecas, debido a que la mayoría de los reportes de bibliotecas sintéticas de anticuerpos vNAR, evitan la incorporación de Cys en el CDR3 (Zielonka *et al.*, 2014; Könnig *et al.*, 2017). Esto puede deberse a que factores como la solubilidad y estabilidad son claves para el desarrollo farmacéutico de las moléculas de anticuerpo y a que la interrupción de los enlaces disulfuro formados por las cisteínas en estas regiones, podría conducir a la heterogeneidad, formación de agregados y cambios de la actividad en la muestra.

Los reportes más recientes de construcción de bibliotecas sintéticas de dominios vNAR se muestra en la tabla 1. Liu y colaboradores en 2007b, reportan la construcción de una biblioteca semisintética, introduciendo diversidad en el CDR3 con oligonucleótidos que aleatorizaban e insertaban tres diferentes longitudes en esta región (13, 16 y 18 aa). Obtuvieron un tamaño de biblioteca de 1×10^9 transformantes totales y validaron su biblioteca seleccionando contra tres toxinas: enterotoxina estafilocócica B (SEB), Ricina y toxina botulínica A (BoNT/A). Aislaron 2, 1 y 2 anticuerpos contra B SEB, Ricina y BoNT/A, respectivamente y obtuvieron expresión de las proteínas de manera soluble. Los anticuerpos aislados mostraron especificidad de unión por su blanco al ser evaluados en ensayos de unión directa con microesferas recubiertas con la toxina blanco, pero su afinidad de unión fue más débil que los anticuerpos convencionales utilizados como control. Liu y colaboradores, mencionan que en el futuro, posiblemente

introducirían una mayor variación en la longitud del CDR3 en combinación con la inserción de Cys en las posiciones definidas del CDR3, para ampliar el número de vNARs de tipo I y II en su biblioteca y obtener mayor número de ligantes específicos.

Zielonka y colaboradores en 2014, reportan la construcción de una biblioteca sintética de dominios vNAR, mediante la diversificación del CDR3 con oligonucleótidos mutagénicos que insertaban cualquier aminoácido excepto Cys, con la finalidad de obtener un CDR3 libre de estos residuos de aminoácido. El repertorio original de vNARs utilizado como andamio, presentaba una Cys conservada en el CDR1, que presumiblemente forma un enlace disulfuro con un residuo de Cys en el CDR3. Esta Cys en el CDR1 fue remplazada por una tirosina (Tyr), para no dejar Cys mal apareadas en esta región. Reportaron una tamaño de biblioteca de 2×10^8 variantes únicas. Seleccionaron contra 3 antígenos: la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), el receptor Ephrin tipo A 2 (EphA2) y la serina proteasa humana HTRA1. Se aisló al menos un anticuerpo contra todos los antígenos evaluados y los vNAR específicos de EpCAM se produjeron como proteínas solubles y fueron más ampliamente caracterizados. Zielonka y colaboradores presumen que en una biblioteca vNAR libre de Cys no canónicas pudiera existir una flexibilidad conformacional mejorada del CDR3 en comparación con el lazo restringido del enlace disulfuro y que esto podría contribuir a la adaptación de la interacción objetivo-proteína, permitiendo el aislamiento exitoso de un gran conjunto de diferentes vNARs, aunque con baja afinidad a su objetivo. Sin embargo consideran que sería interesante analizar el resultado de selección de una biblioteca vNAR de diversidad similar que contenga Cys en el CDR3 aleatorizado y una Cys potencialmente formadora de enlaces disulfuro en CDR1 y comparar su diversidad clonal de anticuerpos aislados y sus afinidades por el objetivo.

Könning y colaboradores en 2017, reportan la construcción de una biblioteca sintética, construida de manera similar a Zielonka y colaboradores, 2014, evitando incorporación de Cys en el CDR3 y cambiando una Cys conservada en el CDR1 por Tyr. Su biblioteca presentó un tamaño de 3×10^9 transformantes totales. Könning y colaboradores, utilizaron como antígeno dos anticuerpos comerciales anti-EGFR (cetuximab y matuzumab). Obtuvieron anticuerpos contra los dos antígenos, demostrando que los vNAR pueden ser utilizados como anticuerpos anti-idiotipo. En 2010, Hartmann y colaboradores describieron el aislamiento de péptidos anti-idiotípicos dirigidos a matuzumab y cetuximab de bibliotecas de fagos peptídicos que podían ser utilizados para imitar características estructurales importantes del EGFR y como inmunógenos, induciendo una respuesta de anticuerpos en animales que reaccionan de forma cruzada con EGFR humano, bloqueando la activación del receptor inducida por ligandos e inhibiendo el crecimiento de células tumorales. Sin embargo los péptidos aislados mostraron reacción cruzada con ambos anticuerpos teraéuticos. Könning y colaboradores reportan que las bibliotecas vNAR

sintéticas permiten la identificación fácil de variantes anti-idiotípicas altamente específicas y sin reacción cruzada hacia el cetuximab y el matuzumab.

Tabla 1. Reportes de construcción de bibliotecas sintéticas de dominios vNAR

Referencia	Características generales de las bibliotecas:	Tamaño	Antígenos evaluados	Resultados
Liu, J.L. <i>et al.</i> , (2007)	Tres longitudes en el CDR3 13, 16 y 18 aa.	1×10^9	Enterotoxina estafilocócica B, Ricina y Toxina botulínica A	Un anticuerpo contra cada antígeno
Zielonka <i>et al.</i> , (2014)	Diversificación del CDR3 (aa al azar, excepto Cys). CDR1 parcialmente diversificado, sustituyendo la Cys por Tyr. Longitud CDR3: 12 aa	2×10^8	EpCAM, HTRA1, EphA2	2, 1 y 2 anticuerpos contra cada antígeno, respectivamente
Könning <i>et al.</i> , (2017)	Diversificación del CDR3 (aa al azar, excepto Cys). CDR1 parcialmente diversificado, sustituyendo la Cys por Tyr.	3×10^9	Matuzumab, Cetuximab	Dos anticuerpos contra cada antígeno (anticuerpos anti-idiotipo)

1.1.5 Mutagénesis de Kunkel

La mutagénesis *in vitro* de ADN se ha convertido en una herramienta estándar en el análisis de ácidos nucleicos y proteínas. Existen muchos enfoques que se pueden agrupar en métodos al azar y sitio-dirigidos (Zoller y Smith, 1987). Varias técnicas están fácilmente disponibles para la mutagénesis sitio-dirigida de proteínas. Una de las técnicas extensamente utilizada es la mutagénesis de Kunkel, la cual se aprovecha de la fuerte selección biológica contra el genotipo original inalterado (Kunkel, 1985; Huang *et al.*, 2012).

El método de mutagénesis de Kunkel permite generar mutaciones puntuales, escisiones e inserciones de una secuencia de ADN dada, con alta eficiencia. Este método se basa en el uso de oligonucleótidos sintéticos (mutagénicos) que contienen alteraciones específicas que se desean introducir en la secuencia de ADN diana (Kunkel, 1985; Hagemeyer, 1994).

El oligonucleótido mutagénico se alinea con su región cognada de ADN de cadena sencilla y es extendido por la polimerasa de ADN. Esto genera una segunda hebra mutante que contiene las alteraciones específicas introducidas a través del oligonucleótido sintético. Esta parte del método es muy

similar a prácticamente todos los otros métodos basados en mutagénesis sitio-dirigida *in vitro*. Sin embargo, el principio de cómo seleccionar contra la hebra no mutante, es el que distingue a este método de los otros (Hagemeier, 1994).

La selección se basa en el uso de un ADN templado, que contiene un pequeño porcentaje de residuos de uracilo en vez de timina. Esto se consigue al hacer pasar el vector que lleva el ADN diana a través de una cepa de *E. coli* que carece de la enzima dUTPasa y la enzima uracilo N-glucosilasa (*dut -1 ung-1*). La delección de *dut* resulta en bacterias con altas concentraciones de dUTP, y como consecuencia dUTP compite con la timina para su incorporación en el ADN. Esta cepa no puede reparar la incorporación defectuosa de uracilo debido a que también carece de la enzima uracilo N-glucosilasa que normalmente conduce a la eliminación de residuos de uracilo del ADN. Como resultado, la cepa de *E. coli* (*dut-1, ung-1*) produce un vector de ADN de doble cadena que contiene una proporción de residuos de uracilo. El vector utilizado permite que el ADN templado de cadena sencilla pueda recuperarse de las bacterias que llevan el plásmido F (F') mediante un fago ayudador (Kunkel, 1985; Hagemeier, 1994).

El molde generado de cadena sencilla se utiliza entonces en la reacción de mutagénesis sitio-dirigida antes mencionada. Esto resulta en un vector de ADN de doble cadena en el cual, la hebra templado no mutante (pero no la hebra sintetizada *in vitro* con las mutaciones deseadas) contiene residuos de uracilo. Mediante la transformación de una alícuota de esta reacción *in vitro* en una cepa de *E. coli ung +*, la hebra templado que contiene uracilo se degradaría, por lo tanto, la mayor parte de la progenie contendría la mutación deseada (Kunkel, 1985; Hagemeier, 1994).

Con la elección correcta de la cepa de bacteria (*dut-1, ung-1, F'*) y del vector de ADN (fagémido), la producción de clonas se puede lograr en un mínimo de tiempo. Dado que esta reacción de mutagénesis tiene una eficacia muy alta (por lo general mayor al 50%) la detección de mutantes puede ser llevada a cabo directamente por secuenciación.

Juntos, la alta eficacia de este método y las etapas innecesarias de subclonación, hacen de este procedimiento de mutagénesis una alternativa valiosa y menos costosa que los métodos basados en PCR. La mutagénesis de Kunkel ha sido utilizada exitosamente para crear ADN con una secuencia deseada (Zoller y Smith, 1987), esto incluye la generación de bibliotecas de péptidos o proteínas por despliegue en fagos (Huang *et al.*, 2012; Rouet *et al.*, 2012).

1.1.6 Bacteriófagos filamentosos y despliegue en fagos

Los bacteriófagos filamentosos son un grupo de virus que solo infectan bacterias y no son capaces de infectar humanos. Están formados de dos componentes: su material genético y una cubierta proteica. Estos fagos contienen un genoma de ADN monocatenario circular, encerrado en un largo cilindro de proteínas que forman la cápside. Los bacteriófagos filamentosos infectan solo cepas de bacterias que expresan pili F. Los bacteriófagos (como el fago M13) no lisan a las células que infectan, en cambio se liberan de la célula infectada e incluso la célula sigue creciendo y dividiéndose (Barbas *et al.*, 2001).

Estos fagos presentan en su cubierta una proteína denominada pIII la cual es responsable de la unión del fago con el pili sexual de la bacteria, permitiendo así el inicio de la infección, durante la cual, el ADN viral de cadena sencilla es replicado (Smith y Petrenko, 1997).

Los bacteriófagos filamentosos son muy utilizados como vehículos de clonación y para desplegar proteínas. Tienen un genoma pequeño de aproximadamente 6400 bases de longitud, que tolera inserciones de genes en regiones no esenciales, lo que permite generar de manera relativamente sencilla ADN de cadena sencilla o doble. Además, permite obtener un alto número de copias de fagos debido a que la replicación del bacteriófago se da en armonía con el hospedero bacteriano y la célula infectada no es lisada, continuando así con su crecimiento (McCafferty *et al.*, 1990; Sambrook y Rusell, 2001).

La técnica del despliegue en fagos consiste en la selección *in vitro* de proteínas o péptidos, permitiendo identificar y aislar un péptido con características deseadas de un repertorio de millones de variantes. Se basa en la fusión de un gen codificante de una proteína de interés con el gen que codifica una proteína de la cápside del fago (como la proteína pIII), resultando en la expresión de la proteína deseada en su superficie (Figura 4), lo que permite generar repertorios o bibliotecas que pueden ser sujetos a pasos de selección y recuperación de clones para ser posteriormente identificados por secuenciación y finalmente pasar de un huésped bacteriano a otro, o ser clonado en diferentes vectores para su expresión como proteína soluble (Smith y Petrenko, 1997).

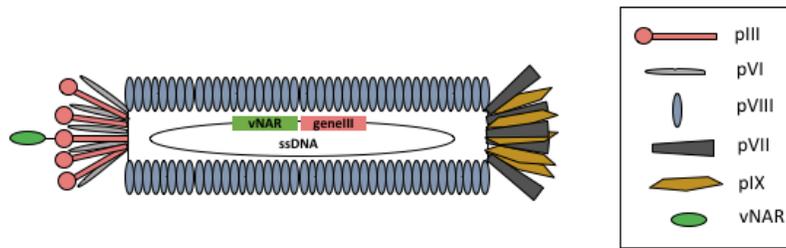


Figura 4. Representación del bacteriofago filamentoso M13 con un vNAR desplegado en la superficie. Mediante la fusión del gen codificante de una proteína vNAR de interés con el gen que codifica la proteína pIII de la cápside del fago, resulta en la expresión de la proteína vNAR deseada en su superficie del fago.

1.1.7 Vectores fagémidos

Los fagémidos son plásmidos que combinan características de plásmidos y de bacteriófagos filamentosos. Contiene un origen de replicación derivado del fago (principal región intergénica) así como el propio origen de replicación del plásmido y puede ser empaquetado en la envoltura del fago. La principal región intergénica del fago filamentoso contenida en los fagémidos, no codifica proteína pero contiene todas las secuencias de actuación en *cis* que son indispensables para el inicio y terminación de la síntesis del ADN viral y para la morfogénesis de las partículas de bacteriófago.

Se pueden clonar segmentos de ADN foráneo en los fagémidos y propagarlos como plásmidos de la manera usual. Sin embargo, cuando una cepa de *E. coli* que lleva un fagémido es infectada con el bacteriófago filamentoso adecuado, el modo de replicación del fagémido cambia en respuesta a los productos génicos expresados por el virus entrante. La proteína del gen II codificada por el virus ayudador presenta una muesca en un sitio específico en la región intergénica del fagémido y por lo tanto inicia la replicación del círculo rodante, el cual genera copias de una hebra del plásmido de ADN. Estas copias de cadena sencilla del ADN del plásmido son empaquetadas dentro de partículas de progeie del bacteriófago, las cuales son después secretadas al medio. Estas partículas secretadas pueden ser fácilmente recuperadas del medio por precipitación con polietilenglicol y el ADN de cadena sencilla purificado por extracción con fenol.

1.1.7.1 pComb3X

La serie de vectores fagémidos pComb3X, es un sistema bien establecido para el despliegue en fagos (Barbas *et al.*, 2001). Los vectores pComb3X están diseñados para expresar anticuerpos y otras proteínas en la superficie del fago e incluso para expresar estas proteínas de manera soluble.

El vector pComb3X tiene numerosos aspectos importantes que lo hacen adecuado para el despliegue de anticuerpos. Algunas de sus principales características son el promotor LacZ, un fragmento de pIII truncado (aa 203-406) que sirve como pareja de fusión para la proteína de interés, la etiqueta de hemaglutinina de la influenza HA que facilita la inmunodetección, una etiqueta de seis histidinas útil para purificación, resistencia a ampicilina, un codón ámbar de paro insertado entre el sitio Sfi I y el extremo 5' del fragmento del gen III. El sitio de restricción de Sfi I, permite la inserción del gen de interés en la correcta orientación y facilita el diseño de grandes bibliotecas con pasos mínimos (Barbas *et al.*, 2001).

1.1.8 VEGF y angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Es un proceso fisiológico fundamental para el desarrollo y el adulto, que requiere la acción coordinada de varios factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular en las células endoteliales y murales (Ferrana & Kerbel, 2005). La citocina proangiogénica, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A (nombrado como VEGF a partir de aquí) y sus receptores, son la vía de señalización mejor caracterizada en la angiogénesis del desarrollo (Ferrana & Kerbel, 2005). El gen de VEGF está organizado en ocho exones y siete intrones, que mediante splicing alternativo resulta en la generación de 4 isoformas diferentes de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆), siendo VEGF₁₆₅ la isoforma predominante. VEGF es una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 45 kDa (Figura 5) (Ferrana, 2004).

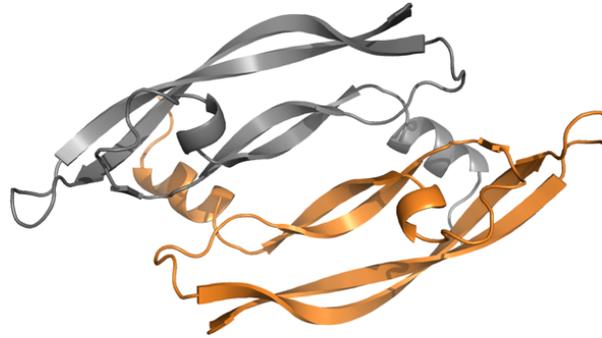


Figura 5. Estructura de VEGF resuelta por cristalografía de rayos X. Cadena A (gris), cadena B (anaranjado). Descrita por Muller *et al.* (1998) con PDB ID 1VPF, del RCSB Protein Data Bank.

VEGF tiene un papel importante en la proliferación y supervivencia de células endoteliales, en la permeabilidad vascular y neoangiogénesis (Ferrana, 2004; Morena *et al.*, 2008; Guangqi *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2016). Se ha establecido el papel de VEGF también en la angiogénesis tumoral (Ferrana & Kerbel, 2005), debido a que ha sido detectado en altas concentraciones en varios tipos de cáncer y metástasis (Ferrana, 2004; Morena *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2016). La inhibición de VEGF ha mostrado también suprimir la angiogénesis patológica en modelos de retinopatías que incluyen: la degeneración macular asociada con la edad (Nguyen *et al.*, 2013; Jaki y Zaletel, 2018) y retinopatía inducida por oxígeno (Camacho-Villegas *et al.*, 2018). Esto ha potenciado el interés de desarrollar fármacos inhibidores de VEGF. Actualmente existen dos anticuerpos monoclonales anti-VEGF, aprobados por la FDA. Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado, aprobado para su uso en tratamiento de cáncer colorectal metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), glioblastoma y cáncer renal metastásico (Ferrana & Kerbel, 2005; Morena *et al.*, 2008). Ranibizumab, un Fab monoclonal humanizado, aprobado para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (AMD) (Yu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Falavarjani & Nguyen, 2013; Camacho-Villegas *et al.*, 2018). Estos logros han corroborado la idea de que la angiogénesis es un blanco fundamental para el cáncer y otras enfermedades (Ferrana & Kerbel, 2005) y existe un interés creciente en buscar nuevos inhibidores de moléculas proangiogénicas, como VEGF.

1.1.9 Antígeno carcinoembrionario

En los últimos años, los biomarcadores han comenzado a desempeñar un papel cada vez más importante en la detección y el tratamiento de pacientes con neoplasias gastrointestinales. El antígeno carcinoembrionario (CEA), es una glicoproteína oncofetal de 200 kDa, el 50% de la molécula está compuesto por carbohidratos. CEA es un antígeno asociado a tumores, se conoce que se sobreexpresa en varios tipos de tumores de origen epitelial (Pavoni *et al.*, 2005; Ayat *et al.*, 2013). Para algunos tipos de cáncer, como el cáncer colorectal, el CEA es el antígeno blanco predilecto debido a que se expresa en casi todos los tumores (<95%) y está disponible en una alta densidad antigénica en la superficie celular (Garambois *et al.*, 2004). En tumores de pacientes con crecimiento de la masa tumoral, hay una mayor acumulación de CEA en la sangre. De esta manera, los niveles séricos de CEA, pueden utilizarse para monitorear la enfermedad recurrente en la vigilancia post-quirúrgica del cáncer colorectal. Esto ha convertido a CEA en un antígeno diana apropiado para el diagnóstico y la terapia de anticuerpos (Ayat *et al.*, 2013).

Varios anticuerpos anti-CEA han sido utilizados para localizar tumores sólidos que expresan-CEA (Garambois *et al.*, 2004; Imakiire *et al.*, 2004; Thomas y Balthasar, 2016). Actualmente, existe un anticuerpos anti-CEA (no terapéutico) llamado Arcitumomab (Wegener *et al.*, 2000; Erb y Nabi, 2000), aprobado por la FDA para detección de cáncer colorectal. Arcitumomab consiste en un fragmento Fab monoclonal, murino, conjugado al radioisótopo, tecnecio-99m, que es utilizado para el diagnóstico por imagen de cánceres colorectales (Wegener *et al.*, 2000).

Anticuerpos vNAR que sean capaces de reconocer a CEA, podrían presentar ventajas para su uso en como agentes de diagnóstico, debido a que su tamaño pequeño les brinda una buena penetración en tejidos (Kovaleva *et al.*, 2017; Camacho-Villegas *et al.*, 2018) y una rápida eliminación de la sangre (Müller *et al.*, 2012), que podría acelerar la eliminación del radioisótopo conjugado, en comparación a fragmentos de anticuerpo de mayor tamaño.

Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

El desarrollo de las bibliotecas sintéticas de anticuerpos ofrece la posibilidad de generar diversidad de anticuerpos, evitando la necesidad de inmunización de animales y reduciendo así, los factores que desaceleran el ritmo al cual un anticuerpo puede generarse. Los anticuerpos de dominios sencillos vNAR por sus características particulares, como tamaño pequeño, CDR3 largo, alta estabilidad térmica y química, representan un buen marco para la construcción de bibliotecas sintéticas.

Aún no se conoce de que manera la presencia o cantidad de cisteínas dentro del CDR3 de anticuerpos de bibliotecas sintéticas, puede afectar el éxito de construcción de las bibliotecas, debido a que la mayoría de los reportes hasta la fecha de construcción de bibliotecas sintéticas de anticuerpo, evitan la incorporación de cisteínas en las regiones CDR3.

Es por ello que en este trabajo, se busca construir bibliotecas sintéticas de anticuerpos a partir de tres marcos de dominios vNAR sin cisteína, con una y dos cisteínas dentro del CDR3, para evaluar si la presencia de estos residuos de cisteína favorece la construcción de bibliotecas sintéticas y sus resultados de selección contra diferentes antígenos.

2.2 Hipótesis

Una mayor cantidad de cisteínas en el CDR3 de fragmentos de anticuerpo vNAR de una biblioteca sintética, reduce el número de anticuerpos aislados contra diferentes antígenos.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Evaluar si la presencia y/o cantidad de cisteínas dentro del CDR3 de anticuerpos, en bibliotecas sintéticas, afecta la selección de anticuerpos contra diferentes antígenos.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Construir tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos vNAR sin cisteínas, con una y dos cisteínas dentro del CDR3, respectivamente.
- Evaluar la capacidad de reconocimiento de las bibliotecas contra diferentes antígenos.
- Caracterizar bioquímicamente y farmacológicamente a los anticuerpos aislados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1 Fagémido y cepas de *E. coli* utilizadas

La cepa CJ236 (New England BioLabs) de *E. coli* que carece de dUTPasa y uracilo N-glucosilasa funcionales, fue utilizada para generar el ADN de cadena sencilla (ADNss) que contenga uracilo. Para el despliegue en fagos se empleó el Bacteriófago M13K07 (Invitrogen). La cepa de *E. coli* TG-1 (Lucigen) que posee la dUTPasa y uracilo N- glucosilasa funcionales, se utilizó para seleccionar la hebra de ADN mutante. El fagémido utilizado fue pComb3X (Barbas *et al.*, 2001). Para la expresión de los anticuerpos recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen).

3.2 Selección y síntesis de marcos vNAR

Para la construcción de las bibliotecas sintéticas se seleccionaron como marcos tres secuencias de anticuerpos vNAR previamente aisladas en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas de CICESE (Figura 6). La selección se realizó considerando el número de Cys dentro del CDR3. Los marcos seleccionados fueron T1, T20 y TN16 que presentan 0, 1 y 2 Cys en el CDR3, respectivamente. Las secuencias seleccionadas como marco, provienen de dos bibliotecas de ANDc inmunes del tiburón cornudo *Heterodontus francisci* (*H. francisci*). T1 y T20 fueron aislados de una biblioteca inmune contra el factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), mientras que TN16 se aisló de una biblioteca inmune contra el factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

Para mejorar la eficiencia de selección durante el despliegue en fagos, los genes de los marcos vNAR se diseñaron para incluir tres codones de parada (no ámbar) después de la cisteína canónica del FR3 (justo antes del CDR3). Los codones de parada en los marcos están destinados a ser eliminados con los oligonucleótidos mutagénicos y previenen el despliegue de los dominios originales. Las secuencias de los 3 genes seleccionados fueron sintetizadas optimizadas para su uso en *E. coli* (Integrated ADN Technologies, IDT).

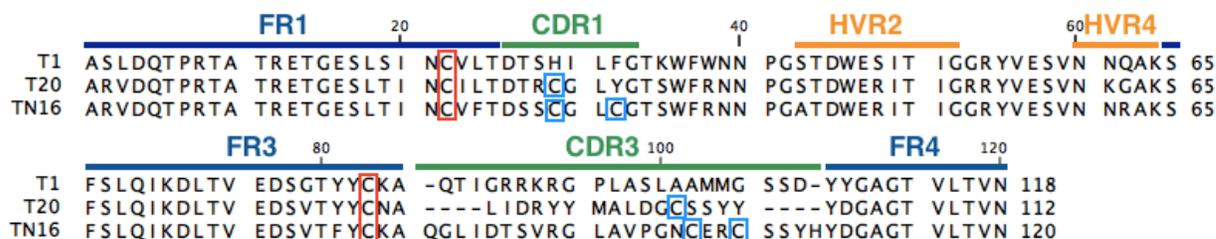


Figura 6. Secuencias de los dominios vNAR utilizados como marco para la construcción de las bibliotecas. T1 sin cisteínas, T20 con una cisteína y TN16 con dos cisteínas dentro del CDR3. Se marcan las diferentes regiones del vNAR. FR: framework, CDR: región determinante de la complementariedad, HRV: región hipervariable. Las cisteínas canónicas se encierran en rojo. Las cisteínas no canónicas se encierran en azul.

3.3 Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos

Se diseñó un oligonucleótido mutagénico para cada marco vNAR (Figura 7), respetando la longitud y el número de Cys dentro del CDR3. A excepción de los codones que codificaban Cys, el resto del oligonucleótido codificaba codones NNK (donde N es una mezcla equimolar de A, G, C, y T, y K es una mezcla equimolar de G y T). Se dejaron 6 a 7 tripletes (18-21 bases) antes y después de cada CDR3 para el solapamiento durante la reacción de alineamiento.

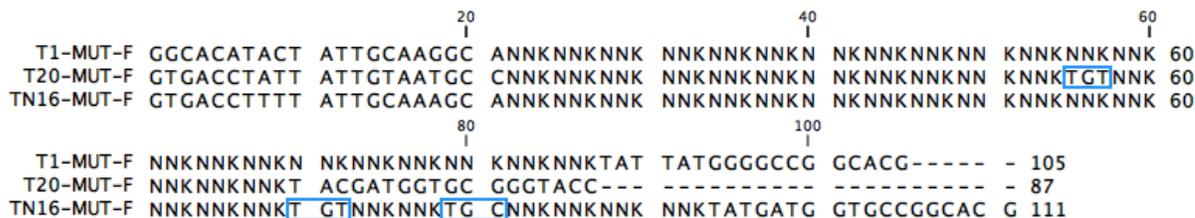


Figura 7. Oligonucleótidos mutagénicos utilizados para diversificar el CDR3 de las bibliotecas. T1-MUT-F utilizado con el marco T1. T20-MUT-F utilizado con el marco T20. TN16-MUT-F utilizado con el marco TN16.

3.4 Amplificación de los genes de interés e inserción de sitios de restricción Sfi I

Los tres genes de interés fueron amplificados por PCR con oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 2), que insertaban sitios de restricción Sfi I a los extremos para permitir la clonación en pComb3X. Las condiciones de corrida del PCR se muestran en la tabla 3. El producto de PCR se purificó con

el Kit Qiaquick gel extraction de QIAGEN. La muestra purificada se evaluó en gel de agarosa al 2 %.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos de T1, T20 y TN16 con sitios Sfi I

Oligonucleótido	Secuencia
T1-opt-Sfil-For	GGC GGG GCC CAG GCG GCC GCT AGC TTA GAT CAG ACG
T1-opt-Sfil-Rev	GTG GAG CAG GCC GGC CTG GCC ATT AAC CGT CAG AAC
T20-opt-Sfil-For	GGC GGG GCC CAG GCG GCC GCT CGT GTG GAC CAA ACA CCG
T20-opt-Sfil-Rev	GTG GAG CAG GCC GGC CTG GCC ATT GAC CGT TAA AAC GGT ACC
TN16-opt-Sfil-For	GGC GGG GCC CAG GCG GCC GCG CGC GTG GAC CAG ACA CCG
TN16-opt-Sfil-Rev	GTG GAG CAG GCC GGC CTG GCC ATT AAC GGT CAG CAC CGT GCC GGC

Tabla 3. Condiciones de PCR para amplificar secuencia de dominio vNAR con oligonucleótidos específicos

1X	95 °C	5 min
20X	95 °C	30 seg
	55 °C	45 seg
	72 °C	90 seg
1X	72 °C	10 min
	4 °C	∞

3.5 Digestión de los genes y vector pComb3X con la enzima Sfi I

Se realizó la digestión de los genes y el vector utilizando la enzima Sfi I (Promega) (tabla 4). Las reacciones se incubaron a 50 °C durante 5 h en termociclador.

Tabla 4. Reacción de digestión de los genes sintéticos y el vector pComb3X con la enzima Sfi I.

Buffer 10 X	5 µL
ADN	1 µg/µL
BSA acetilado (10 mg/mL)	0.5 µL
Enzima Sfi I (40 U)	1.25 µL
H ₂ O	Llevar a 50 µL
	50 µL

Los genes digeridos se purificaron utilizando el Kit QIAquick PCR purification de QIAGEN y se eluyó la muestra en H₂O. El vector pComb3X digerido se purificó a partir de gel de agarosa al 1.2 %, con el kit QIAquick gel extraction de QIAGEN, la muestra fue eluída en H₂O.

3.6 Ligación de los genes de interés en el vector pComb3X

La ligación se realizó utilizando la enzima ligasa T4 (New England Biolabs). La reacción de ligación se muestra en la tabla 5. Se utilizó una relación molar 1:3 Vector: Inserto (utilizando el NEBioCalculator).

Tabla 5. Reacción de ligación de los genes sintéticos en el vector pComb3X

Buffer	2 µL
Vector ADN (4 kb)	50 ng
Inserto (1 kb)	37.5 ng
T4 Ligasa	1 µL
H ₂ O	Llevar a 20 µL

Se puso una reacción sin inserto, como control negativo. La reacción de ligación se incubó a 16 °C durante toda la noche. La reacción se inactivó a 65 °C durante 15 min. Se transformaron 2 µL de la reacción de ligación en 50 µL de células electrocompetentes DH5 α . Las células transformadas se recuperaron en 3 mL de medio SOC, y se incubaron durante 1 h a 37 °C, 250 rpm. Luego se sembraron en placa de medio 2xYT (2x Yeast extract and Tryptone: (triptona 1.6 % (p/v), extracto de levadura 1.0 % (p/v), NaCl 0.5 % (p/v), pH 7.5)) + carbenicilina (100 µg/mL) y se incubaron toda la noche a 37 °C.

Se seleccionaron al azar cinco colonias cada ligación, se resembraron en placa de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) y se evaluaron por PCR utilizando los oligonucleótidos Ompseq (5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCAG-3') y gback (5'-GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC-3') como se describe en la tabla 6. El producto de PCR se evaluó en gel de agarosa al 2 %. Se seleccionaron dos muestras con producto de PCR del tamaño esperado para cada gen, se extrajo el ADN plasmídico y fue secuenciado para corroborar la clonación correcta. Se utilizó el oligonucleótido gback para secuenciar.

La purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) o con el kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen).

Tabla 6. Condiciones de PCR para amplificar secuencia de dominios vNAR con oligonucleótidos Ompseq y gback

1X	95 °C	5 min
20X	95 °C	30 seg
	55 °C	45 seg
	72 °C	90 seg
1X	72 °C	10 min
	4 °C	∞

3.7 Preparación de Células CJ236 quimiocompetentes y transformación con pComb3X

Se inocularon 10 mL de medio SB + cloranfenicol (5 µg/mL) con 1 colonia de *E. coli* CJ236 y se incubó a 37 °C, 250 rpm, toda la noche. Al siguiente día se inocularon 300 mL de medio SB + cloranfenicol con 3 mL de preinóculo, se incubó a 37 °C, 250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.4. El cultivo se transfirió a tubos de 50 mL estériles y se incubaron en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4000 rpm, durante 10 min a 4 °C. Se descartó el medio, los tubos se dejaron invertidos en toalla por 1 min. Se resuspendió cada pellet en 10 mL de solución CaCl₂ 0.1 M fría, se juntó la muestra de dos tubos en uno y se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó a 4000 rpm, 10 min, 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se drenaron los tubos invirtiéndolos 1 min. El pellet de cada tubo se resuspendió en 1 mL de CaCl₂ 0.1 M frío, se juntó toda la suspensión celular y se prepararon alícuotas de 50 µL. Se congeló en hielo seco y se almacenó a -70 °C.

Se transformaron células CJ236 quimiocompetentes con el vector pComb3X que contenía la secuencia de ADN templado. Se agregó 1 µL del plásmido a 50 µL células CJ236 quimiocompetentes, se incubó 30 min en hielo y 1 min a 42 °C, se pasó a hielo y se agregó lentamente 250 µL de medio SOC. Las células se incubaron 30 min a 37 °C sin agitación y 30 min a 37 °C y 250 rpm. La muestra se sembró en placas con medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2% y se incubaron a 37 °C toda la noche.

3.8 Producción de fago y ADNss que contenga uracilo

Se realizó la producción del fago ayudador M13K07 siguiendo la metodología descrita por Barbas *et al.*, (2001). Se estimó el título del fago preparado y se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

Para llevar a cabo la producción de ADN de cadena sencilla (ADNss) que contenga uracilo, se seleccionaron al azar 10 colonias de las células CJ236 transformadas con pComb3X que llevaba la secuencia de interés. Se inoculó cada colonia en 10 mL de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + cloranfenicol (5 µg/mL) + glucosa 2 % y se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) entre 0.4 a 0.6. Se infectaron los 10 mL de cultivo con 20 partículas de fago ayudador M13K07 por célula, el cultivo se incubó a 37 °C por 30 min sin agitación.

Las células se recuperaron centrifugando a 3300 rpm por 40 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 40 mL de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + kanamicina (50 µg/mL) + uridina (0.25 µg/mL) + glucosa 2% en matraz de 250 mL, se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 20 horas. Se centrifugó el cultivo a 3500 rpm, 15 min, 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubo nuevo de 50 mL. Se agregó a cada tubo 10 mL de solución PEG/NaCl (PEG 20% (p/v) / NaCl 2.5 M), se mezcló por inversión 3-4 veces y se incubó en hielo durante 1 h para precipitar los fagos. Se centrifugó a 3500 rpm, 15 min, 4 °C y se descartó el sobrenadante.

Se resuspendió cada pellet en 0.5 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM; pH 7.4) estéril y se pasó a tubo de 1.5 mL. Para eliminar la bacteria restante, se centrifugó a 10,000 rpm, 15 min. Se recuperó el sobrenadante, se juntó todo y se filtró a través de un filtro de 0.2 µM. A continuación se realizó la extracción de ADNss del fago con el kit QIAprep Spin M13 (QIAGEN). El ADNss purificado se cuantificó y evaluó en gel de agarosa al 1 %.

3.9 Mutagénesis de Kunkel

3.9.1 Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos

Se preparó una alícuota de los oligonucleótidos mutagénicos a 330 ng/µL. Se preparó la reacción de fosforilación agregando 2 µL de buffer TM 10 X (Tris 0.5 M, MgCl₂ 0.1 M, pH 7.5), 1 µL de DTT (100 mM), 11 µL de H₂O, 2 µL de la enzima T4 PNK (10 U/µL) y 2 µL de oligonucleótido mutagénico (330 ng/µL). La reacción se incubó 1 h a 37 °C.

3.9.2 Alineamiento del oligonucleótido fosforilado y el ADNss templado

Se preparó la reacción de alineamiento agregando 20 µg del ADNss uracilado preparado anteriormente, 20 µL del oligonucleótido mutagénico fosforilado, 25 µL de buffer TM 10 X y se llevó a 250 µL con H₂O. El alineamiento se llevó a cabo en termociclador utilizando el siguiente programa: 3 min a 90 °C, 3 min a 50 °C y 5 min a 20 °C. Posteriormente la reacción se pasó a hielo.

3.9.3 Reacción de relleno

Se preparó la siguiente reacción, 25 µL de ATP (10 mM), 37.5 µL de DTT (100 mM), 62.5 µL de dNTPs (10 mM), 15 µL de T4 ligasa (400 U/µL), 7.5 µL de T7 ADN polimerasa (10 U/µL). Se tomaron 60 µL de esta reacción preparada y se agregaron a los 250 µL de la reacción de alineamiento. La reacción se incubó toda la noche a 20 °C.

Al siguiente día, se evaluaron 8 µL de la reacción de relleno en gel de agarosa a 1 %. El ADN de doble cadena (ADNds) mutagénico obtenido fue purificado utilizando el kit QIAquick gel extraction (QIAGEN). Se utilizaron 2 columnas para la purificación y el ADN de cada una fue eluido en 35 µL de H₂O. Finalmente se mezclaron los 35 µL de cada columna (70 µL totales).

3.9.4 Electroporación del ADN mutagénico en células TG1

Por duplicado, Se mezclaron 35 µL del ADNds mutagénico con 350 µL de células electrocompetentes TG1. Cada mezcla se dividió en dos celdas de electroporación (0.2 cm) previamente enfriadas, para un total de cuatro electroporaciones. Se electroporó (V=2.5 kV) y las células fueron recuperadas lavando cada celda con 2.5 mL de medio 2xYT + glucosa 2 %. Se juntó toda la suspensión celular en un tubo de 50 mL y se incubó a 37 °C, 150 rpm, durante 1 h.

Se prepararon diluciones del cultivo (como se describe en el apartado 3.13.5) y los 10 mL de cultivo transformado se centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, dejando la suspensión celular en aproximadamente 1 mL de medio. El pellet fue cuidadosamente resuspendido con

ayuda de una punta de pipeta y se dividió en cuatro placas (60 mm) de 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2 % (~ 250 µL de suspensión celular en cada placa). Se incubaron a 37 °C, toda la noche.

Las bacterias crecidas en las placas fueron recuperadas lavando cada placa con 3 mL de 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2 %. Las células fueron utilizadas para preparar gliceroles y almacenar a -70 °C, para extracción de ADN plasmídico y para preparar fago de la biblioteca.

3.9.5 Diluciones para estimar el tamaño de la biblioteca

Previo al paso de centrifugación del cultivo transformado con el ADN mutagénico, se hicieron diluciones 10^1 - 10^{12} (de 1 mL) del cultivo. Se sembraron 100 µL de la dilución 10^1 - 10^8 en placa de 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2 %, y se incubó a 37 °C, toda la noche. Se contó el número de colonias en cada dilución para estimar el tamaño de la biblioteca.

Se seleccionaron 12 colonias al azar de las diluciones y cada una sirvió para inocular 3 mL de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2 %, se incubó a 37 °C, 250 rpm, toda la noche. Los cultivos se utilizaron para extraer el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). El DNA plasmídico se evaluó por PCR utilizando los oligonucleótidos Ompseq y gback (siguiendo el programa descrito en la tabla 6), el producto de PCR fue evaluado en gel de agarosa al 2 %. El ADN plasmídico de las clonas que amplificaron el fragmento de tamaño esperado fue secuenciado para corroborar la correcta inserción de mutagénesis.

3.9.6 Producción de fago de la biblioteca

Se inocularon 50 mL de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2 % con unas gotas de la suspensión de bacteria recuperada de las placas, hasta una OD_{600} = 0.05-0.1. El cultivo se incubó a 37 °C, 250 rpm, hasta alcanzar una OD_{600} =0.4-0.8. Se agregó fago ayudador M13K07 (20 partículas de fago por célula) y se incubó 30 min a 37 °C, sin agitación para permitir la infección. Las células infectadas se pasaron a tubo de 50 mL y se centrifugaron a 3500 rpm, durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante. El pellet se

resuspendió en 300 mL de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + kanamicina (50 µg/mL) y el cultivo se incubó a 28 °C, 250 rpm, durante 20 h.

El cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se recuperó, se juntó y se agregó 1/5 parte de volumen de solución PEG/NaCl, para precipitar los fagos (60 mL de solución PEG/NaCl). Se incubó en hielo, a 4 °C, durante 1 h. Se centrifugó el sobrenadante a 6000 rpm, 4 °C, durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante. El pellet de los fagos fue resuspendido cuidadosamente en un total de 20 mL de PBS 1X estéril. Los fagos fueron precipitados nuevamente agregando 1/5 parte de solución PEG/NaCl. Se incubó en hielo a 4 °C, durante 20 min. Se centrifugó a 3500 rpm, 4 °C, durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante. El pellet del fago se resuspendió en 20 mL de PBS 1X estéril. Se centrifugó a 3500 rpm, 4 °C, durante 15 min para eliminar los restos de bacteria. El sobrenadante se colectó en tubo nuevo. Se agregaron 10 mL de solución glicerol 60 %, se mezcló por inversión y se hicieron alícuotas de 1 mL de la muestra en tubo de 1.5 mL, finalmente se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

3.9.7 ELISA de funcionalidad de la biblioteca

Se preparó una placa de 96 pozos (2 mL de capacidad por pozo) con 1 mL/pozo de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + glucosa 2 %. Se inoculó cada pozo con una colonia aislada seleccionada al azar (utilizando las colonias de las diluciones preparadas para estimar el tamaño de la biblioteca). Se dejaron dos pozos en la esquina superior derecha y dos en la esquina inferior izquierda sin inocular, para utilizarlos como control de contaminación. Se incubó la placa a 37 °C, 250 rpm, hasta que los cultivos alcanzaran una $OD_{600}=0.6-0.8$. Se infectó cada pozo con 1 µL de fago ayudador M13K07 (10^{11}). La placa se incubó a 37 °C, 30 min, sin agitación. Posteriormente se centrifugó a 1700 rpm, 15 min. Se eliminó el sobrenadante por inversión, teniendo cuidado de no eliminar el pellet. La placa se incubó a 37 °C, 250 rpm, 20 min, para resuspender el pellet. Se añadió a cada pozo 1 mL de medio 2xYT + carbenicilina (100 µg/mL) + kanamicina (50 µg/mL) y se incubó toda la noche a 37 °C, 250 rpm. Se dejó recubriendo una placa de ELISA con 100 µL/pozo de anti-HA tag 1.5 µg/µL (150 ng por pozo) y se incubó toda la noche a 4 °C.

Al siguiente día se eliminó por inversión la solución anti-HA tag de la placa. Se bloquearon los pozos agregando 200 µL de BSA 4% en PBS 1X, y se incubó 1 h a temperatura ambiente (TA). 20 minutos previos a terminar el tiempo de bloqueo, se centrifugó la placa de 96 pozos con el cultivo de fagos a 3500 rpm, 4 °C, durante 15 min y se puso a TA para utilizar a continuación. Se eliminó la solución de bloqueo de placa

de ELISA y se agregaron 100 μ L del sobrenadante de fago diluido 1:1 en BSA 4 %-PBS 1X. Se dejaron dos pozos en la esquina superior derecha y dos en la esquina inferior izquierda como blanco y se agregó solo 100 μ L de BSA 4%. La placa se incubó 1 h, a TA. Se eliminó la solución de fago y se lavó la placa 6-10 veces con Tween 0.1 % en H₂O destilada. Se agregó a cada pozo 100 μ L de anticuerpos anti-M13-HRP (1:5000) en solución BSA 4 %-PBS 1X. Se incubó 1 h, a TA. Se eliminó la solución de anticuerpo, se lavó la placa 6-10 veces con Tween 0.1 % en H₂O destilada, se agregaron a cada pozo 100 μ L de solución de revelado TMB, se incubó la placa 15 min, a 37 °C. Finalmente se agregaron 50 μ L de solución stop (HCl 1N) y se leyó la placa a 405 nm, en lector de placa.

3.10 Validación de las bibliotecas por despliegue en fagos

3.10.1 Selección de antígenos

Se seleccionaron siete antígenos para la validación de las bibliotecas, los cuales fueron seleccionados con base a sus diferencias estructurales o diferentes orígenes y no necesariamente por sus características funcionales. Los antígenos seleccionados fueron: 1) eritrocitos de gallina, los cuales poseen una membrana externa rica en carbohidratos y algunas proteínas de membrana como glicoforina A y acuaporinas; 2) Aquaporina 1 (AQP1); 3) VEGF, una glicoproteína dimérica, el monómero tiene un peso de 21 kDa y esta formada de 7 laminas β antiparalelas y 2 hélices α ; 4) Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (FGF-2), una proteína no glicosilada de 18 kDa, compuesta de 12 hojas β antiparalelas; 5) Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), una glicoproteína de 22 kDa que consiste de 4 hélices α en una configuración arriba-arriba abajo-abajo; 6) Glicoforina humana A (GYPA), glicoproteína más frecuente en la membrana plasmática de los eritrocitos humanos, formada de hélices α , rica en glucógeno y ácido siálico; 7) Antígeno Carcinoembrionario (CEA), glicoproteína de 200 kDa, presenta un gran número de glicosilaciones.

3.10.2 Reamplificación de la biblioteca sintética

Se inocularon 50 mL de medio SB con 50 μ L de células ER2738 electrocompetentes. El cultivo se incubó a 37 °C, 250 rpm, hasta alcanzar una OD₆₀₀=1. Se agregaron 100 μ L de fago de la biblioteca sintética

y se incubó 15 min, a TA. Se agregaron 10 μL de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se prepararon diluciones 10^{-2} y 10^{-4} del cultivo y se sembraron 1 y 10 μL de la dilución 10^{-4} en placa de 2xYT + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. El cultivo infectado se transfirió a un matraz de 500 mL y se agitó a 250 rpm, 37 °C, 1 h. Se agregaron 15 μL de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó 1 h a 250 rpm, 37 °C. Se agregaron 4 mL de fago ayudador M13K07 (10^{-11}), 146 μL de medio SB y 75 μL de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El cultivo se incubó a 37 °C, 250 rpm, 1.5-2 h. Se agregaron 280 μL de kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se continuó agitando toda la noche bajo las mismas condiciones.

Se pasó el cultivo a tubos cónicos de 50 mL (40 mL por tubo) y se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a tubo nuevo y se agregó a cada tubo 10 mL de solución PEG/NaCl. Se incubaron los tubos en hielo a 4 °C, durante 30 min. Se centrifugó a 9000 rpm, 15 min y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante. Los tubos se drenaron invirtiendo en papel secante. El pellet del fago se resuspendió cuidadosamente en 2 mL totales de PBS 1X- BSA 1% y se pasó a tubo de 2 mL. La muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min. Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de 0.2 μM y se recuperó en tubo nuevo. El fago quedó listo para utilizarse en la primera ronda de selección. Se contaron las colonias de las diluciones para estimar el título de entrada de la biblioteca.

3.10.3 Rondas de Selección

Se dejó inmovilizando el antígeno de interés en dos pozos de una placa de 96 pozos (250 ng en 50 μL de PBS 1X por pozo). Se cubrió la placa y se incubó toda la noche a 4 °C. Se eliminó la solución de antígeno de la placa y se bloquearon los pozos agregando 150 μL de solución de bloqueo (PBS 1X-BSA 3%). Se tapó la placa y se incubó 1 h a 37 °C. Se eliminó la solución de bloqueo por inversión y se agregaron 50 μL del fago fresco preparado de la biblioteca a cada pozo. Se tapó la placa y se incubó a 37 °C durante 2 h. Cuando había transcurrido aproximadamente 1 h de incubada la placa, se puso un cultivo de 5 mL de medio SB con 5 μL de células ER2738 electrocompetentes. El cultivo se incubó a 37 °C, 250 rpm hasta alcanzar una $\text{OD}_{600}=1$. Una vez transcurridas las 2 h de incubación de la placa, se eliminó la solución de fagos invirtiendo la placa. Se realizaron lavados agregando a cada pozo 150 μL de solución de lavado (PBS 1X- Tween 0.05%), se pipeteó arriba y abajo 5 veces y se dejó incubando 5 min con el buffer de lavado. Se eliminó la solución invirtiendo la placa y se repitieron los lavados para un total de cinco en esta ronda 1 (se aumento a 10 lavados para la ronda 2 y 3; y a 15 para la ronda 4). Después de eliminar el último lavado

se agregó a cada pozo 50 μL de tripsina (10 mg/mL) fresca (preparada durante el último lavado), se tapó la placa y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Para estimar el título de entrada de la biblioteca (Input) se prepararon diluciones (10^{-3} , 10^{-6} y 10^{-9}) del fago obtenido en la reamplificación de la biblioteca (o del fago obtenido en la ronda anterior, para las subsecuentes rondas). Se infectaron 50 μL de células ER2738 electrocompetentes ($\text{OD}_{600}=1$) con 1 μL de la dilución 10^{-9} , se incubó 15 min, a TA y se sembraron los 50 μL en placa de 2xYT + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la placa se incubó a 37 °C toda la noche.

Una vez transcurridos los 30 min de incubación con la tripsina, se recuperaron los fagos tripsinizados pipeteando cuidadosamente 10 veces arriba y abajo. Los fagos fueron transferidos a un tubo de 50 mL que contenía 2 mL de cultivo de células ER2738 electrocompetentes ($\text{OD}_{600}=1$). Se incubó 15 min, a TA. Se agregaron 6 mL de medio SB y 1.6 μL de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para estimar el título de salida (número de clonas infectadas), se diluyeron 2 μL del cultivo infectado, en 200 μL de medio SB (dilución 1:100) y se sembraron 10 μL y 100 μL de esta dilución en placa de 2xYT + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Los 8 mL de cultivo fueron incubados a 37 °C, 250 rpm, durante 1 h. Posteriormente se agregó 2.4 μL de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se agitó una h más a 250 rpm y 37 °C. El cultivo fue transferido a un matraz de 500 mL, se agregó 2 mL de fago ayudador M13K07 (10^{-11}), 90 mL de medio SB y 46 μL de carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El cultivo se incubó a 37 °C, 250 rpm, por 1.5-2 h. Finalmente se agregaron 140 μL de kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se siguió incubando toda la noche a 250 rpm y 37 °C.

Se dejó inmobilizando 250 ng (en 50 μL de PBS 1X) del antígeno de interés en un pozo de una placa de ELISA (se utilizó solo un pozo con antígeno para las rondas 2, 3 y 4). Se cubrió la placa y se incubó toda la noche a 4 °C.

Al siguiente día, se eliminó la solución de antígeno de placa, se agregaron 150 μL de solución de bloqueo (PBS 1X-BSA 3%). Se tapó la placa y se incubó 1 h a 37 °C. El cultivo puesto el día anterior se transfirió a tubos de 50 mL (40 mL por tubo), se centrifugó a 4000 rpm, durante 15 min y el sobrenadante se recuperó en tubo nuevo de 50 mL. Para la precipitación de los fagos, se agregó a cada tubo 10 mL de solución PEG/NaCl. Se incubaron los tubos en hielo a 4 °C, durante 30 min. Se centrifugó a 9000 rpm, 15 min y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante. Los tubos se drenaron invirtiendo en papel secante. El pellet del

fago se resuspendió cuidadosamente en 2 mL totales de PBS 1X- BSA 1% y se pasó a tubo de 2 mL. La muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 min. Se recuperó el sobrenadante, se filtró a través de un filtro de 0.2 μ M y se recuperó en tubo nuevo. Los fagos quedaron listos para utilizarse en la siguiente ronda de selección.

Se continuó la siguiente ronda de selección (Ronda 2) eliminando la solución de bloqueo y agregando a la placa 50 μ L del fago fresco preparado. La placa se incubó 2 h a 37 °C. El procedimiento siguiente fue el mismo que para la Ronda 1. Se realizaron 4 rondas de selección.

3.10.4 Producción de fagos de colonias aisladas

Para producir fago de diferentes colonias aisladas, corroborar que desplegaban una proteína vNAR completa y secuenciar, se seleccionaron al azar ~ 40 colonias de las placas del título de salida de la ronda 3 y ronda 4. Se puso un preinóculo de la colonia en 1 mL de medio SB + carbenicilina (100 μ g/mL) y se incubó a 37 °C, 250 rpm, durante toda la noche. Al siguiente día se utilizaron 100 μ L del preinóculo para inocular 1 mL de medio SB + carbenicilina (100 μ g/mL). Los cultivos se incubaron a 37 °C, 250 rpm hasta alcanzar una densidad a 600 nm (OD_{600}) de 0.6-0.8. Una vez alcanzada la OD_{600} se infectó el cultivo con 100 μ L de fago ayudador M13K07 (10^{11}). Se incubó 30 min a 37 °C, sin agitación para permitir la infección. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 1700 rpm, durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante por inversión, teniendo cuidado de no eliminar el pellet. Se resuspendió cuidadosamente el pellet y se añadió al tubo 1 mL de medio SB + carbenicilina (100 μ g/mL) + kanamicina (50 μ g/mL). El cultivo se incubó toda la noche a 37 °C, 250 rpm.

3.10.5 ELISA de fagos

Se recubrieron pozos de una placa de ELISA de 96 pozos (1 pozo por cada fago a probar) con anti-tag HA sin conjugar (150 ng/pozo), se añadió un pozo con PBS 1X como blanco. La placa se incubó toda la noche a 4 °C. Al siguiente día se eliminó la solución anti-tag HA de la placa por inversión, se bloquearon los pozos agregando 150 μ L de solución de bloqueo (BSA 3%, PBS 1X) y se incubó la placa 1 h a 37 °C. Aproximadamente 15 minutos antes de terminar la incubación con la solución de bloqueo se centrifugaron

los cultivos individuales de bacteriófago producido a partir de las diferentes colonias (apartado 3.10.4) a 3,500 rpm, 4 °C durante 15 min.

Una vez transcurrida la hora de incubación, se eliminó la solución de bloqueo, se agregó a cada pozo 10 μ L de solución de bloqueo (BSA 3%-PBS 1X) + 40 μ L de sobrenadante del cultivo de bacteriófago, como control positivo se puso un pozo con 10 μ L solución de bloqueo, 39 μ L PBS 1X , y 1 μ L de la biblioteca de fagos que se estuviera probando, como blanco se utilizó un pozo con 50 μ L de PBS 1X. La placa se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se eliminó la solución de fago, se lavó la placa 5 veces con solución de lavado (Tween 20 0.05 % - PBS 1X). Se agregó a cada pozo 50 μ L de anticuerpo anti- M13-HRP (1-5000) en solución BSA 1%- PBS 1X, se incubó la placa con el anticuerpo 1 h a 37 °C. Se eliminó la solución de anticuerpo y se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se agregó a cada pozo 50 μ L de solución de revelado (TMB) según las instrucciones del fabricante, se incubó 15 min a 37 °C, finalmente se agregó a cada pozo 50 μ L de solución stop (HCl 1N) y la placa se leyó en lector de placas a 405 nm.

Finalmente, se purificó ADN plasmídico de las clonas que resultaron positivas y fue secuenciado (SeqXcel, San Diego).

3.11 Transformación de células BL21 (DE3) electrocompetentes

Una vez que se seleccionaron los plásmidos que contenían anticuerpos vNAR completos y en marco de lectura, se llevó a cabo su transformación en células de *E. coli* BL21 (DE3) electrocompetentes. Se mezclaron 50 μ L de células BL21 (DE3) electrocompetentes con 1 μ L de plásmido, se pasó a una celda de electroporación (0.2 cm) previamente enfriada y se electroporó (V=2.5 kV). Las células transformadas fueron recuperadas en 3 mL de medio de cultivo SOC (triptona 2 % (p/v), extracto de levadura 0.5 % (p/v), NaCl 0.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 20 Mm, glucosa 20 mM) y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante una hora. Se sembró 1 μ L y 10 μ L de cultivo en placas con medio de 2xYT + carbenicilina (100 μ g/mL).

Se seleccionaron 5 colonias al azar y se evaluaron por PCR, para confirmar su correcta transformación, mediante la amplificación del fragmento de tamaño esperado al utilizar los oligonucleótidos Ompseq y gback. Se utilizó el programa descrito en la tabla 6. El producto de PCR fue evaluado en gel de agarosa al 2%.

3.12 Expresión y extracción periplásmica de anticuerpos vNAR recombinantes

Se puso un preinóculo de 5 mL de medio SB + carbenicilina (100 µg/mL) con la colonia de interés y se incubó toda la noche a 250 rpm y 37 °C. El preinóculo sirvió para inocular 500 mL de medio SB + carbenicilina (100 µg/mL). Se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcanzo una $OD_{600}=0.6-0.8$. Se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG 1 mM e incubando a 37 °C, 250 rpm durante 6 h más. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm, durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

Se extrajo la proteína del periplasma, siguiendo la metodología descrita en el manual QIAexpressionist (QIAGEN). El pellet correspondiente a 100 mL del cultivo se resuspendió en 35 mL de solución Tris-HCl 30 mM y sacarosa 20%, fría, pH 8.0. La muestra se agitó suavemente en baño de hielo. Se agregó EDTA 1 mM y se continuó agitando por 10 min. Se centrifugó a 8000 x g, 4 °C, por 20 min. Se almacenó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 35 mL de $MgSO_4$ 5 mM frío y se agitó suavemente por 20 min en baño de hielo. La muestra se centrifugó a 8000 x g, 4 °C, durante 20 min. El sobrenadante fue recuperado. Se evaluó la presencia de la proteína en los sobrenadantes mediante ensayo de ELISA. Los sobrenadantes que contenían la proteína se almacenaron a -20 °C.

3.13 Ensayo ELISA para evaluar expresión de los vNARs recombinantes

En una placa de ELISA de 96 pozos se agregó por triplicado 50 µL de los sobrenadantes del extracto periplásmico. La placa se incubó por 2 h a 37°C (o toda la noche a 4 °C). Se eliminó la solución de la placa y los pozos se bloquearon con 150 µL/pozo de solución de bloqueo (BSA 3 %, PBS 1 X) durante 1 h a 37 °C. Se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 50 µL/pozo de anticuerpo anti-HA-HRP (1:1000) en solución de BSA 1 %, PBS 1 X, la placa fue incubada por 1 h, a 37 °C. Se descartó el sobrenadante y los pozos se lavaron tres veces con solución PBS 1 X-Tween 0.05 %. Finalmente se agregaron 50 µL/pozo de solución de revelado TMB, la placa se incubó por 15 min a 37 °C y se determinó su absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas. Como control negativo se utilizó BSA 1%.

3.14 Purificación de los anticuerpos recombinantes

Para la purificación de la proteína recombinante se utilizó la metodología de purificación por cromatografía de afinidad a metales de acuerdo descrita en el protocolo NiNTA de QUIAGEN con algunas modificaciones. Pevio a la purificación, el pH de la muestra que contenía el extracto periplásmico se ajustó a pH 8.0 y se clarificó centrifugando 30 min, 10,000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se cargó en una columna de plástico de 10 mL (Poly- Prep® Chromatography Columns BioRad), la cual contenía 1 mL de resina Ni-NTA Agarose (QUIAGEN). El extracto se pasó tres veces a través de la columna, posteriormente se realizó un lavado con 15 mL de buffer de lavado 1 (Imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0) y un segundo lavado agregando a la columna 10 mL de buffer de lavado 2 (Imidazol 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0). La proteína fue eluida en cinco a siete fracciones de 500 µL con el buffer de elución (Imidazol 250 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0), con un tiempo de incubación de 5 min entre cada una. La proteína purificada se evaluó en un gel desnaturizante de tricina al 12% teñido con azul de Coomassie y por Western blot utilizando el anticuerpo anti-HA. Una vez comprobada la presencia de la proteína de interés, se juntaron las eluciones en las cuales se detectó la proteína.

3.15 Inmunodetección de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se anañizaron por SDS-PAGE y western blot. La metodología de Tricina-SDS- PAGE se realizó de acuerdo a lo descrito por Schägger y von Jagow (1987). Las proteínas del gel fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 µm (BioRad), con el sistema de transferencia semi-seco, Trans-Blot Semi-Dry Transder Cell (BioRad), a un amperaje constante de 200 mA, 20 V máximo, durante 1 h. La membrana fue incubada durante 2 horas a TA y agitación moderada en solución de bloqueo (PBS 1 X-Tween 0.05 %), con leche descremada 5 % (p/v) (Svelty® de Nestle®). La membrana se lavó 3 veces con solución PBST (PBS 1 X-Tween 0.05 %) y se incubó durante 2 horas a TA con agitación moderada en una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-HA (Roche) en PBST con leche descremada 1 % (p/v). La membrana se lavo 3 veces con PBST y finalmente las proteínas fueron detectadas por colorimetría empleando el reactivo DAB Substrate Kit (Thermo Scientific) o por quimioluminiscencia con el reactivo Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

Las fracciones purificadas en las cuales se detectó presencia de la proteína por western blot fueron juntadas y dializadas contra PBS 1 X con agitación constante a 4 °C utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer® de 7,000 MWCO (Thermo Scientific), realizando dos recambios de 2 horas y un recambio final de 12 horas. La proteína dializada se cuantificó utilizando el kit micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific). La proteína recombinante dializada y cuantificada fue almacenada a -20 °C.

3.16 Ensayo ELISA para evaluar la habilidad de reconocimiento de los vNARs a su blanco

En una placa de ELISA de 96 pozos, se inmovilizaron 250 ng/pozo del antígeno de interés (por triplicado). La placa se incubó por 2 h a 37°C (o toda la noche a 4 °C). Se eliminó la solución de antígeno de la placa y los pozos se bloquearon con 150 µL/pozo de solución de bloqueo (BSA 3 %-PBS 1 X) durante 1 h a 37 °C. Se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 50 µL/pozo del anticuerpo vNAR recombinante a probar, purificado y dializado, la placa se incubó 1 h a 37 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pozos tres veces con solución PBS 1 X-Tween 0.05 %. Se agregaron 50 µL/pozo de anticuerpo anti-HA-HRP (1:1000) en solución de BSA 1 %-PBS 1 X, la placa fue incubada por 1 h, a 37 °C. Se descartó el sobrenadante y los pozos se lavaron nuevamente tres veces. Finalmente se agregaron 50 µL/pozo de solución de revelado TMB, la placa se incubó por 15 min a 37 °C y se determinó su absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas. Como control negativo se utilizó BSA 1%.

Los vNAR que mostraron reconocimiento positivo por su antígeno blanco, fueron utilizados en ensayo ELISA de sandwich (dos veces repetido), para evaluar su capacidad de reconocimiento al antígeno original de los marcos utilizados para las bibliotecas. Se utilizaron 250 ng de vNAR purificado (por triplicado) como anticuerpo de captura y se incubó toda la noche a 4 °C. Después de bloquear los pozos por 1 h a 37 °C con solución de bloqueo, se agregaron 125 ng de TGFβ recombinante humano (PeproTech) y se incubó por 1 h a 37 °C. Para detectar el antígeno capturado se utilizó el mAb comercial anti-TGFβ ID11.16.8 (1:3,000) (Bioxcell) y se incubó 1 h a 37 °C. El sandwich se detectó con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a HRP (1:10,000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), incubando 1 h a 37 °C. Finalmente el ELISA se reveló con TMB y la absorbancia se leyó a 450 nm. El mAb comercial anti-TGFβ ID11.16.8 se utilizó como control positivo en un formato ELISA indirecto para comparar la eficiencia de unión a TGFβ.

3.16.1 Titulación de anticuerpos anti-CEA

Se realizó una titulación de los tres anticuerpos anti-CEA que presentaron el mejor resultado de reconocimiento en el ensayo ELISA. Se realizaron siete diluciones seriadas de los anticuerpos partiendo de un stock de 4 µg/mL. Se probó por triplicado cada dilución contra el antígeno cognado. Se utilizó 50 ng de CEA por pozo (en 50 µL), y se siguió la metodología descrita en el apartado 3.16.

3.17 Síntesis y clonación de los genes del anticuerpo VS2-5 (anti-VEGF)

Se diseñaron y enviaron sintetizar (Integrated ADN Technologies, IDT) cuatro versiones del anticuerpo VS2-5 obtenido de la biblioteca VS2 contra VEGF para sustituir el codón ámbar que presentaba en su CDR3 (Figura 8): VS2-5CQ donde se cambió el codón de parada por una glutamina (Q) (*99Q); VS2-5CE sustitución del codón ámbar por un ácido glutámico (E) (*99E). Debido a que VS2-5 incorporó en su CDR3 dos Cys adicionales (posición 89 y 94) a las que tenía la secuencia original, se diseñaron dos versiones más, donde las dos nuevas Cys fueron sustituidas por alanina (A). VS2-5AQ donde se cambiaron las dos Cys por alanina y el codón de parada fue sustituido por una Q (C89A, C94A, *99Q); y VS2-5AE, en la cual las dos Cys fueron sustituidas por alanina y el codón ámbar se sustituyó por un E (C89A, C94A, *99E).

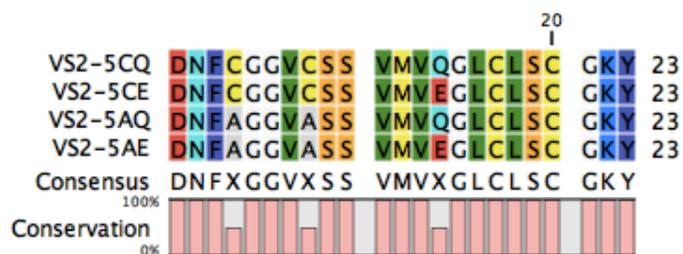


Figura 8. CDR3 de las cuatro versiones de VS2-5. Se diseñaron cuatro versiones del gen VS2-5 que incluían los siguientes cambios: VS2-5CQ (*99Q); VS2-5CE (*99E); VS2-5AQ (C89A, C94A, *99Q) y VS2-5AE (C89A, C94A, *99E).

Para realizar la clonación de los cuatro genes de interés en pComb3X, los genes fueron amplificados por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 7) que insertan sitios de corte Sfi I a los extremos del gen. Las condiciones de corrida se muestran en la tabla 3. El producto de

PCR se evaluó en gel de agarosa al 2% y se purificó con el Kit Qiaquick gel extraction de QIAGEN. La digestión y ligación de las versiones VS2-5 se realizó de acuerdo a lo descrito en los apartados 3.5 y 3.6, respectivamente. Las proteínas se expresaron, purificaron y almacenaron a -20°C.

Tabla 7. Oligonucleótidos específicos de las versiones VS2-5

Oligonucleótido	Secuencia
VS25AQ-NcoI-SfiI-F	CAT GCC ATG GCC CAG GCG GCC GCG CGT GTA GAC CAA ACT
VS25AQ-NcoI-SfiI-R	CCG CTC GAG GCC GGC CTG GCC ATT GAC AGT CAG TAC CGT
VS25AE-NcoI-SfiI-F	CAT GCC ATG GCC CAG GCG GCC GCG CGC GTG GAC CAA ACA
VS25AE-NcoI-SfiI-R	CCG CTC GAG GCC GGC CTG GCC ATT TAC CGT TAA TAC GGT
VS25CQ-NcoI-SfiI-F	CAT GCC ATG GCC CAG GCG GCC GCG CGT GTC GAC CAG ACC
VS25CQ-NcoI-SfiI-R	CCG CTC GAG GCC GGC CTG GCC ATT GAC AGT CAG TAC GGT
VS25CE-NcoI-SfiI-F	CAT GCC ATG GCC CAG GCG GCC GCG CGT GTA GAT CAA ACC
VS25CE-NcoI-SfiI-F	CCG CTC GAG GCC GGC CTG GCC ATT AAC GGT TAA TAC GGT

3.18 Modelado *in silico* de los anticuerpos anti-VEGF e interacción energética con VEGF

3.18.1 Modelado por homología de los anticuerpos anti-VEGF

La estructura tridimensional de los anticuerpos vNAR (VS0-4 y VS1-20) se predijo por modelado basado en homología utilizando MODELLER v.9.16 (Eswar *et al.*, 2007), a través de una estrategia conocida como “Modelado avanzado”. Se realizó una búsqueda mediante BLAST-P de las moléculas más parecidas a las proteínas de interés, para identificar la estructura andamio consenso para el modelado. Los vNARs fueron modelados basándose en tres proteínas andamio distintas, cada una con más del 50% de identidad con las proteínas de interés. Los andamios de referencia fueron descargados del RCSB Protein Data Bank (PDB), con ID de PDB: 4HGK, 2I26 y 2I24.

3.18.2 Dinámica molecular – estrategia de recocido simulado

Después del modelado por homología, la estructura tridimensional de los vNAR se refinó mediante cálculos de recocido simulado (SA) con un software llamado “Nanoscale Molecular Dynamics” (NAMD) (Phillips *et al.*, 2005) seguido del análisis y visualización de los resultados utilizando el software de gráficos

moleculares “Visual Molecular Dynamics” (VMD) (Humphrey *et al.*, 1996) y MacPyMOL: PyMOL v1.7.4.4 Edu Enhanced para Mac OS X. Para evaluar la calidad del modelo (porcentaje de residuos de la molécula que se encuentran en regiones favorecidas), se obtuvieron los gráficos de Ramachandran de los vNAR con la herramienta de servidor PROCHECK (Wang y Zhang, 2013).

Las simulaciones se realizaron en todos los casos en una caja de agua como solvente, con condiciones de contorno periódicas, donde se asumió un conjunto NPT - un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes. La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 300 °K. Estas condiciones de contorno periódicas se acoplaron a las etapas de recocido (calentamiento) y relajación (enfriamiento) de forma iterativa. Después del recocido y enfriamiento, cada andamio mutado se sometió a un análisis de dinámica molecular a 300 °K y 1 atm durante 50 ns. El análisis de las coordenadas de la trayectoria del átomo y las energías se escribieron en el disco cada diez ps. Después del recocido simulado y los cálculos de dinámica molecular, las diferentes estructuras de conformación se agruparon en función de su estabilidad energética total durante la simulación, para encontrar la conformación de proteínas más termodinámicamente estable, seleccionando la estructura con el mayor tiempo de existencia.

3.18.3 Acoplamiento, afinidad proteína-proteína y predicciones de superficie de interacción

Previo a los análisis de acoplamiento e interacción, se preparó la molécula blanco. Se descargó la estructura de VEGF resuelta por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2.5Å, descrita por Muller *et al* (1998), del RCSB Protein Data Bank.

Para predecir el posible sitio de unión de los anticuerpos VS0-4 y VS1-20 a VEGF, se aplicó un protocolo de acoplamiento proteína-proteína, utilizando la herramienta web ClusPro (Comeau *et al.*, 2004). El algoritmo de acoplamiento evalúa diferentes complejos putativos con complementariedades de superficie favorables. Los complejos obtenidos se filtraron para su posterior agrupamiento, seleccionando aquellos con buenas energías ibres electrostáticas y de desolvatación. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó MacPyMOL: PyMOL v1.7.4.4 Edu Enhanced para Mac OS X. Para cada anticuerpo se eligió el complejo con mejor afinidad y orientación de unión y estos se sugirieron como posibles complejos VEGF-VS0-4 y VEGF-VS1-20.

Para identificar las regiones de interacción proteína-proteína predichas, se utilizó la herramienta Peptidederive en el servidor ROSIE, con la configuración predeterminada. Para el cálculo de acoplamiento, Peptidederive proporcionó una gráfica con las posibles residuos implicados en la interacción proteína-proteína, clasificada según la energía de la función de puntuación de Rosetta - Unidades de energía de Rosetta (REU) (London *et al.*, 2010; Lyskov *et al.*, 2013; Sedan *et al.*, 2016), que normalmente se asume que es un sustituto de la constante de afinidad derivada de ΔG .

Para una mejor interpretación de los resultados, se ejecutó la rutina computacional ClusPro-Peptidederive en un complejo control, previamente reportado (V13_P98Y/VEGF) (Millán-Gómez *et al.*, 2018). Se realizaron los cálculos del control positivo para tener una referencia de los valores REU obtenidos para el complejo de interacción de un anticuerpo vNAR (V13_P98Y) que ha sido evaluado contra VEGF *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.18.4 Análisis de la actividad de bloqueo de VS0-4 y P98Y en la interacción VEGF/VS1-20 por ELISA competitivo

Los modelos *in silico* de VS1-20, VS0-4 y P98Y predijeron los posibles sitios de unión de estos anticuerpos a la molécula de VEGF. Los análisis *in silico* se corroboraron por ELISA competitivo (dos veces repetido) para evaluar si estos anticuerpos tenían un epítipo sobrepuesto y podrían bloquear la unión del otro a VEGF. Las placas se recubrieron con 250 ng de VEGF recombinante humano (PeproTech) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se bloquearon los pozos con solución de bloqueo por 1 h a 37 °C. Por triplicado se agregaron 250 ng de proteína soluble VS0-4, P98Y, VS1-20 (control positivo), el vNAR no relacionado CV0-43 (control negativo) o PBS y la placa se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizaron 3 lavados con PBST, se agregó fago VS1-20 en una dilución 10^{-3} y se incubó 1 h a 37 °C. La placa se lavó 3 veces con PBST y la unión del fago VS1-20 se detectó con anticuerpo anti-M13 (1:5000) (Sigma Aldrich), incubando 1 h a 37 °C. La placa se lavó 3 veces con PBST, el ELISA fue revelado con TMB y la absorbancia se leyó a 450 nm.

3.19 Evaluación de la función de los anticuerpos de las bibliotecas sintéticas

3.19.1 Evaluación del efecto antiangiogénico *in vitro* de los anticuerpos anti-VEGF

La angiogénesis *in vitro* se midió utilizando un ensayo tridimensional basado en esferoides de células endoteliales de acuerdo a lo descrito por Korff, 2004.

3.19.1.1 Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

Se pipetearon 20 mL de medio de crecimiento de células endoteliales (ECGM) (Cell Applications, Inc.), en una botella T-75. Se partió de un vial de células HUVEC pase 2, criopreservadas en nitrógeno líquido. Se descongelaron las células rápido, colocando la mitad inferior del vial en un baño de agua a 37 °C, por 1 min. Se retiró el vial del baño de agua, se secó y se descontaminó su exterior con alcohol 70 %, en campana de seguridad biológica. Se removió cuidadosamente la tapa del vial, se resuspendieron cuidadosamente las células en el vial pipeteando gentilmente cinco veces con pipeta de 2 mL. La suspensión celular se pasó a la botella T-75 que contenía 20 mL de ECGM. Se tapó la botella y se balanceó suavemente para distribuir uniformemente las células. Se colocó la botella en una incubadora humidificada a 37 °C, 5 % CO₂, aflojando la tapa para permitir el intercambio de gases. Se realizó un cambio de medio a las 24 h para eliminar las trazas de DMSO. Se realizó cambio de medio cada dos días hasta que las células alcanzaron una confluencia de ~ 80 %. Una vez alcanzada la confluencia deseada, las células se utilizaron para la formación de esferoides y el resto se criopreservó.

3.19.1.2 Tripsinización de células HUVEC a temperatura ambiente

Se cultivaron células HUVECs del segundo pasaje, hasta alcanzar una confluencia de ~ 80%. Las células se tripsinizaron a TA, para ello, se removió el medio de la botella cuidadosamente, se lavó dos veces la monocapa de células con 5 mL de solución de Hank's (HBSS) (Cell Applications, Inc.) y se eliminó cuidadosamente la solución. Se pipetearon 5 mL de solución Tripsina/EDTA (Cell Applications, Inc.), en la botella T-75. Se balanceó la botella cuidadosamente para asegurarse que la solución cubriera todas las células. Se removieron 4.5 mL de la solución inmediatamente. Se tapó nuevamente la botella y se

monitoreó el progreso de la tripsinización a TA bajo microscopio invertido durante 1-2 min. Se despegaron las células de la superficie de cultivo golpeando el costado de la botella contra la palma de la mano, hasta que la mayoría de las células estuvieran sueltas. Se pipetearon 5 mL de solución neutralizante de tripsina (Cell Applications, Inc.) dentro de la botella y se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico estéril de 50 mL. Se lavó la botella con 5 mL adicionales de solución neutralizante de tripsina y se transfirió la solución al mismo tubo cónico de 50 mL. Se centrifugó a 1200 rpm, por 6 min. Se eliminó sobrenadante teniendo cuidado de no perturbar el botón celular. Se golpeó ligeramente la punta del tubo cónico con el dedo para aflojar el botón celular y se resuspendieron las células en 10 mL de medio ECGM suplementado con 10 % SFB. Las células se contaron en cámara de recuento celular y se calculó el número de células por μL .

3.19.1.3 Formación de esferoides de células endoteliales (HUVEC)

Previó a la tripsinización y conteo celular se prepararon 40 mL de medio ECGM suplementado con 20 % de metocel y 10 % SFB. Se realizaron los cálculos de la dilución de células para formar esferoides de aproximadamente 400 células/pozo (para 4 placas de 96 pozos con 400 células/100 μL por pozo), y se colocó la solución de células en los 40 mL de ECGM preparado con metocel y SFB. Se colocó la solución anterior en una canaleta de plástico y se pipetearon 100 μL por pozo en 4 placas de 96 pozos de fondo U, no adherentes. Se incubó por 24 h en incubadora humidificada a 37 °C, 5 % CO_2 , para permitir la formación de los esferoides.

3.19.1.4 Inclusión de los esferoides en gel de colágeno

Se prepararon 10 mL de solución metocel con 20 % SFB. Adicionalmente se preparó un tubo con 4 mL de colágeno más 0.5 mL de Medio 199. El colágeno se mantuvo en hielo hasta el momento de usarse. Se recolectaron los esferoides con pipeta de 100 μL , utilizando puntas a las que se les cortó 1-2 mm de la punta con tijera estéril. Los esferoides se colocaron en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugaron a 300 g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió cuidadosamente en 4.5 mL de solución metocel + SFB preparada previamente. Se agregaron 90 μL de solución HEPES 1M. Posteriormente se neutralizó el colágeno (manteniéndolo en hielo) con NaOH 1 N, estéril, frío, hasta alcanzar el color adecuado. Una vez neutralizado el colágeno, se agregó inmediatamente a la solución metocel + SFB que

contenía los esferoides y se mezcló con una pipeta de 10 mL fría teniendo cuidado de no formar burbujas. Rápidamente en una placa de 24 mL, fondo plano, no adherente, se colocó 1 mL por pozo de la solución, utilizando solo los 8 pozos centrales. El resto de los pozos fueron cubiertos con 1 mL de PBS estéril. La placa se dejó a TA, 10 min y posteriormente se incubó a 37 °C por 30 min para permitir que el colágeno gelificara.

3.19.1.5 Angiogénesis *in vitro*: tratamiento de los esferoides con VEGF y anticuerpos anti-VEGF

Se diluyó VEGF en medio basal (MB) sin suplementar a una concentración de 1 µg/mL. Se preincubó 50 µL de la dilución de VEGF (50 ng totales) con 50 µL de anticuerpo anti-VEGF VS1-20 o VS0-4 a 200 µg/mL (10 µg totales), durante media hora a TA. Posteriormente se agregaron 100 µL de los diferentes tratamientos a los esferoides. Los tratamientos fueron: 1) MB; 2) VEGF (50 ng) + MB; 3) VEGF + VS1-20; 4) VEGF + VS0-4. La placa se incubó 4 horas en incubadora humidificada a 37 °C, 5 % CO₂. Posteriormente se agregaron 10 µg más de anticuerpo anti-VEGF (en 50 µL de PBS) y la placa se siguió incubando bajo las mismas condiciones para un total de 24 h. Finalmente, los esferoides se fijaron agregando 1 mL de formalina 10 %. La angiogénesis *in vitro* se cuantificó digitalmente midiendo la longitud de las ramificaciones que crecieron de cada esferoide, utilizando un microscopio invertido (Olympus, Germany) y el software digital Image Pro. Se analizaron 20 esferoides por grupo.

3.19.2 Reconocimiento a CEA en la superficie de células de cáncer de colon HCT-116 por citometría de flujo

3.19.2.1 Cultivo de la Línea Celular HCT-116

Se cultivó la línea celular de cáncer de colon HCT-116 (ATCC® CCL-247™). El medio de cultivo utilizado fue McCoy's 5A (Corning), suplementado con 1 % antibiótico antimicótico (Penicilina 10,000 U/mL, Estreptomocina 10 µg/mL y anfotericina B 5 µg/mL; Sigma-Aldrich) y 10 % suero fetal bovino (Corning). Se partió de un criovial que contenía 1 mL de células criopreservadas de pase 4 (P4). Las células se descongelaron cuidadosamente en baño maría (37 °C). Un mL de células del criovial, se paso a tubo Corning de 15 mL que contenía 9 mL del medio de cultivo suplementado y se centrifugó a 800 g, por 5 min

a TA. El medio se eliminó cuidadosamente invirtiendo el tubo. El botón celular se resuspendió suavemente en 1 mL de medio de cultivo suplementado y se pasó a una placa de cultivo celular de 100 mm que contenía 9 mL de medio de cultivo suplementado. La placa se incubó a 37 °C, con atmósfera parcial de CO₂ del 5 %. Las células se revisaron diariamente, utilizando un microscopio invertido (EVOS). Se realizaron 2 lavados con 6 mL de PBS 1X, pH 7.4, estéril, y se adicionaron 10 mL de medio suplementado nuevo aproximadamente cada 2-3 días, dependiendo de la confluencia del cultivo.

3.19.2.2 Marcaje extracelular de CEA por Citometría de flujo

Las placas de cultivo de las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 (expresión de CEA) y cáncer de mama MDA-231 (control negativo de expresión en CEA), con una confluencia de 80-90 %, se incubaron por 10 minutos a 4°C, para comenzar a desprender las células de la placa. Consecutivamente, la monocapa se raspó suavemente con el émbolo (pistón/tapón de hule plano) de una jeringa de insulina, para terminar de despegar las células, lavando la caja de cultivo con solución de Hanks frío. Todo el contenido celular de la placa se depositó a tubo de 15 mL a 4°C. Una vez cosechadas y lavadas las células se centrifugaron a 135 g por 3 min a 4°C para retirar el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml Hanks. El conteo celular se realizó por exclusión de azul de tripán al 0.4% para ajustar a 500,000 células en 100 microlitros de Hanks.

Previo a la adición del anticuerpo se bloquearon 500,000 células con BSA 1% + suero de ratón 1% en solución Hanks por 10 min a 4°C, para evitar marcajes inespecíficos, seguidos de un lavado con solución de Hanks. Posteriormente se añadió la mezcla del Anti-CEA CV0-43 + Anti-HA-FITC pre-incubado por 1 hora a 37°C, con el siguiente esquema:

Tubo 1: Células sin teñir

Tubo 2: Células + Anti-HA-FITC

Tubo 3: Células + CV0-43 Anti-CEA (1.25 µg) + HA-FITC

Tubo 4: Células + CV0-43 Anti-CEA (2.5 µg) + HA-FITC

Tubo 5: Células + CV0-43 Anti-CEA (5.0 µg) + HA-FITC

Una vez añadido el anticuerpo se incubó por 1 hora a 4°C continuado con dos lavados con Hanks para eliminar el exceso de anticuerpo no unido al CEA. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 400 microlitros de Hanks y se analizaron en el citómetro de flujo (Attune-applied Biosystems) donde se adquirieron 100,000 eventos totales. El análisis citométrico se realizó con el software Flowjo ver.10.4.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Amplificación de los genes sintéticos y ligación en el vector pComb3X

La figura 9 muestra la amplificación por PCR de los tres genes de interés (T1, T20 y TN16) que se encontraban previamente clonados en un vector pGEM, a los cuales se les insertó a los extremos sitios de corte para la enzima Sfi I (Fig. 9A). Se amplificó un fragmento del tamaño esperado (~ 400 pb). Una vez que se corroboró la correcta amplificación de los genes, la reacción de PCR se purificó y los fragmentos purificados se evaluaron en gel de agarosa (Fig. 9B).

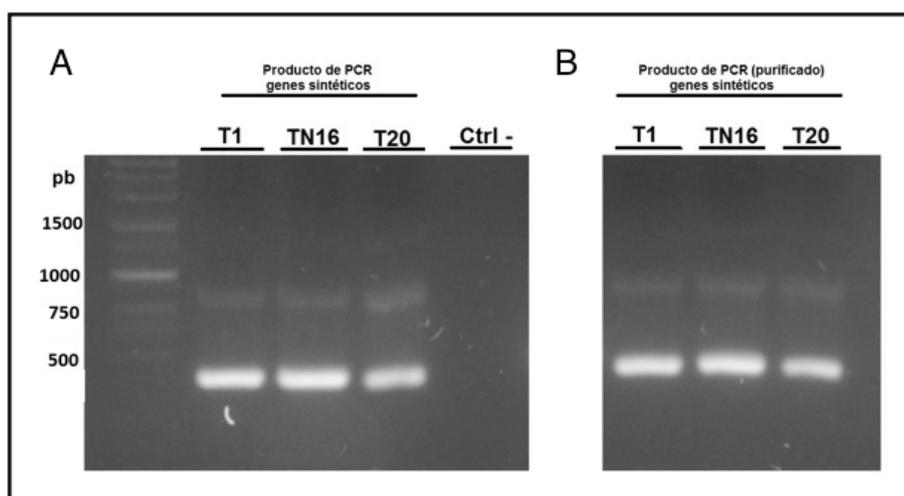


Figura 9. Amplificación de los genes sintéticos. A) Genes T1, T20 y TN16 amplificados. B) Producto de PCR purificado. Gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio.

Los genes sintéticos purificados que provenían de la amplificación anterior y el vector pComb3X fueron digeridos con la enzima Sfi I. Los genes digeridos fueron purificados directamente de la reacción de digestión, mientras que la digestión del vector pComb3X se llevó a cabo a partir de un gel de agarosa al 1.2 %. La figura 10 muestra el vector pComb3X digerido con la enzima Sfi, se observaron dos fragmentos en el gel, uno de ~3350 pb correspondiente al vector digerido y otro fragmento más pequeño de ~ 400 pb, correspondiente al gen de un fragmento vNAR que se encontraba previamente clonado en el vector. El vector pComb3X digerido fue purificado del gel para ser utilizado en la clonación de los genes sintéticos.

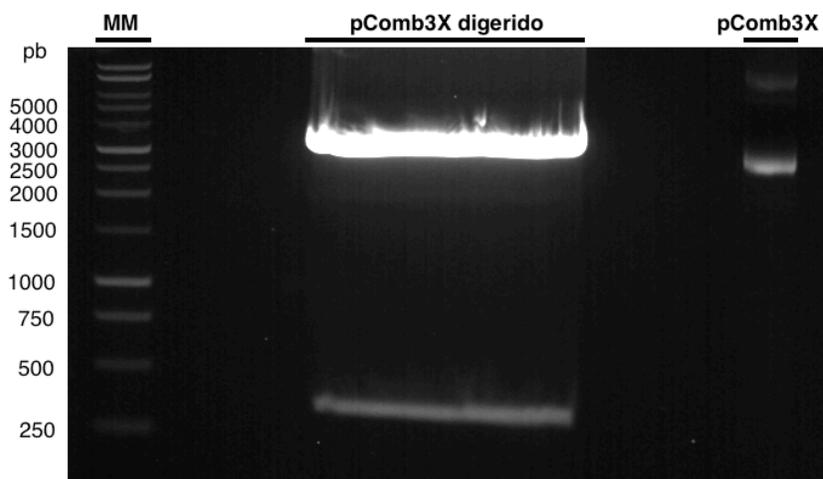


Figura 10. pComb3X digerido con Sfi I. pComb3X digerido (izquierda) con Sfi I. pComb3X: Vector sin digerir (derecha). Gel de agarosa al 1.2 %, teñido con bromuro de etidio.

La reacción de ligación de los genes sintéticos T1, T20 y TN16 se transformó en células DH5 α y las células transformadas fueron sembradas en placa de 2xYT + carbenicilina (100 μ g/mL). Para todas las ligaciones hubo crecimiento de bacterias en placa. Como se esperaba, no se observó crecimiento para el control negativo, que correspondía a una ligación del vector sin inserto. Se seleccionaron al azar 5 colonias de la ligación de cada gen y fueron evaluadas por PCR para corroborar la amplificación del fragmento del tamaño esperado. Las cinco colonias de cada ligación amplificaron el fragmento del tamaño esperado (~400 pb). Se seleccionaron dos colonias de cada ligación, se les extrajo el ADN plasmídico y fue secuenciado.

Los resultados de secuenciación mostraron que las dos clonas evaluadas de cada gen, presentaban el gen de interés correctamente clonado, completo y en marco, por lo que se seleccionaron para seguir trabajando con ellas.

4.2 Construcción de las bibliotecas sintéticas

Previo a iniciar con los pasos de la mutagenesis de kunkel, se produjo fago ayudador para ser utilizado en la producción de ADNss y en la selección de anticuerpos contra los diferentes antígenos durante el Panning. El título de bacteriófago ayudador obtenido fue de 5.8×10^{13} pfu/mL.

Para la producción de ADN de cadena sencilla uracilado, se transformaron células CJ236 quimiocompetentes con el vector pComb3X que llevaba la secuencia T1, T20 y T16, por separado. La transformación fue exitosa y hubo crecimiento de colonias aisladas para todas las transformaciones. Se seleccionaron 10 colonias al azar de cada transformación para la producción de ADNss. En la figura 11 se muestra un gel de agarosa 1% donde se evaluó el ADN de cadena sencilla producido, como control, se corrió el plásmido de doble cadena del que se partió. Se produjo alrededor de 70 a 80 ug de ADN de cadena sencilla uracilado para el gen de cada biblioteca, cantidad suficiente para los siguientes pasos de mutagénesis de Kunkel.

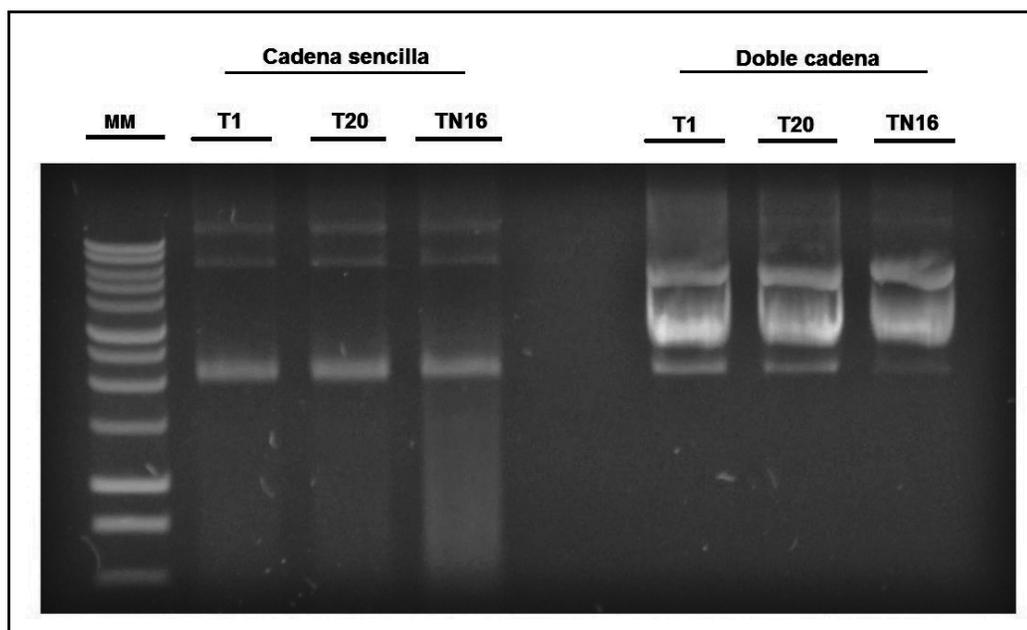


Figura 11. Producción de ADN de cadena sencilla uracilada. Se muestra el ADN de cadena sencilla que contiene uracilo y el ADN de doble cadena de cual se partió para la producción de cadena sencilla uracilada. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Una vez que se contaba con el ADNss uracilado se continuó con los siguientes pasos de mutagénesis de Kunkel. Se llevó a cabo la fosforilación de los oligonucleótidos mutagénicos con la enzima T4 PNK, el alineamiento del templado ADNss uracilado con los oligos fosforilados y la reacción de extensión o rellenado para completar la segunda hebra mutante. La figura 12 muestra un gel de agarosa al 1%, donde se observa el ADN de doble cadena mutagénico (ADNs) producido del gen T20 y el ADN monocatenario uracilado T20 utilizado como templado.

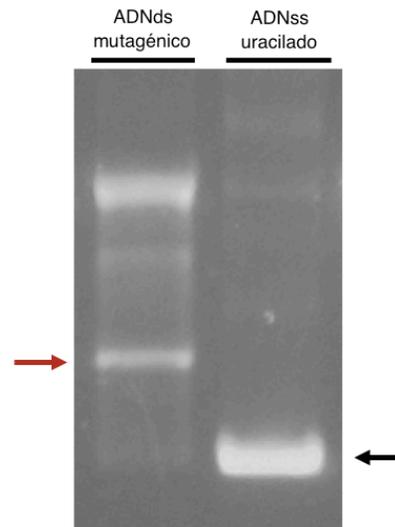


Figura 12. Síntesis de ADN de doble cadena mutagénico. El ADN monocatenario uracilado T20 (ADNs) marcado con flecha negra, se convirtió en ADN bicatenario mutagénico (ADNs) utilizando oligonucleótidos mutágenicos, T7 polimerasa y T4 ligasa. La flecha roja, marca el producto de ADNs deseado, correctamente extendido y ligado. El ADNs tiene una movilidad electroforética más baja que ADNs. Gel de agarosa al 1%.

El ADNs mutagénico fue purificado y se utilizó para transformar células TG1. A partir de las células transformadas se prepararon diluciones 10^{-1} - 10^{-12} para estimar el tamaño de las bibliotecas. Los tamaños obtenidos para las bibliotecas fueron de 1.8×10^9 , 6.7×10^9 y 5.7×10^{11} , para T1, T20 y TN16 respectivamente.

Se seleccionaron 10 colonias al azar de cada biblioteca, se les extrajo ADN plasmídico y se evaluaron por PCR para corroborar que amplificaran el fragmento del tamaño esperado (~ 400 pb) al utilizar los oligonucleótidos Ompseq y gback. En la figura 13 se observa el producto de PCR obtenido para todas las clonas evaluadas, las 10 colonias de cada biblioteca amplificaron el fragmento esperado de ~ 400 pb. El ADN plasmídico de las 10 clonas evaluadas fue secuenciado para corroborar la correcta inserción de variabilidad en las bibliotecas.

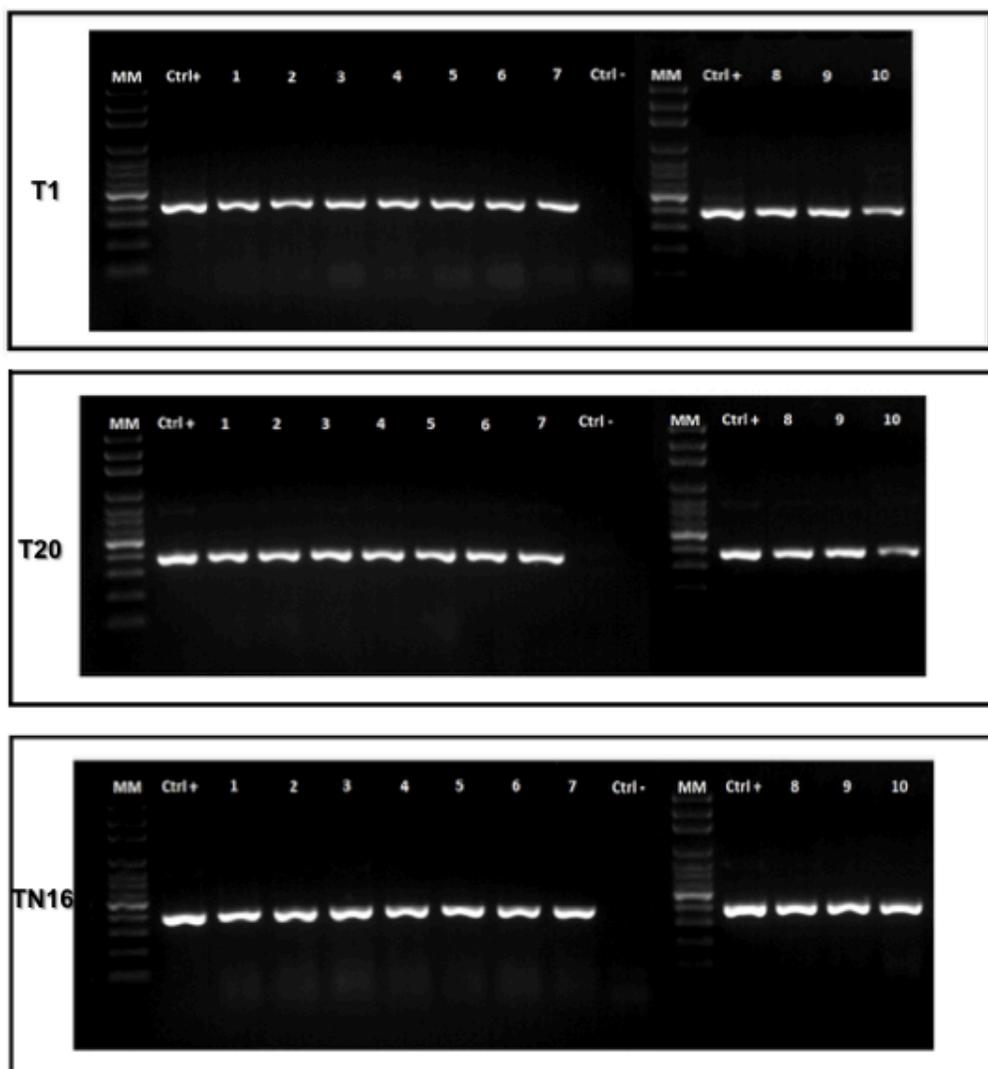


Figura 13. PCR de colonias de las bibliotecas. Se evaluaron 10 clonas obtenidas de la transformación en TG-1 para cada gen (1-10). (Ctrl +) plásmido pComb3X + el gen original de cada biblioteca (T1, T20 y TN16). (Ctrl –) reacción de PCR sin ADN. Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

Los resultados de secuenciación mostraron para T1 que de las 10 secuencias obtenidas, siete eran secuencias nuevas y diferentes (Figura 14) y tres correspondían a la secuencia original. Mientras que para T20 y TN16 seis secuencias eran nuevas, completas y diferentes (Figura 15 y 16 respectivamente) y cuatro correspondían a la secuencia original.

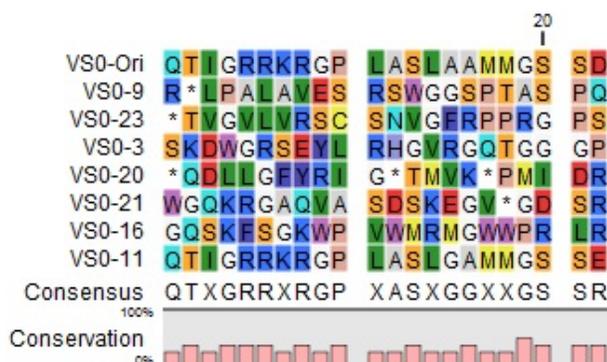


Figura 14. Variabilidad obtenida en el CDR3 a partir del marco T1. Siete de 10 clonas secuenciadas presentaron una secuencia diferente en el CDR3 a la del marco T1 utilizado.

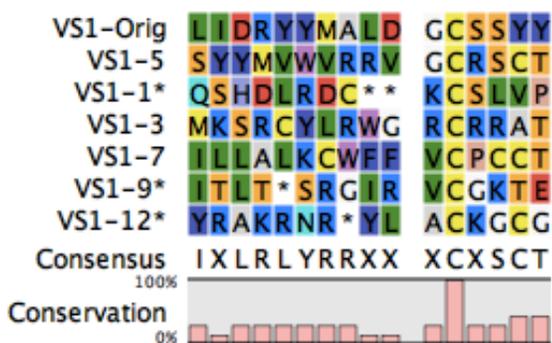


Figura 15. Variabilidad obtenida en el CDR3 a partir del marco T20. Seis de 10 clonas secuenciadas presentaron una secuencia diferente en el CDR3 a la del marco T20 utilizado. La cisteína representativa dentro del CDR3 de esta biblioteca (posición 12 dentro del CDR3) se mantuvo en todas las clonas.

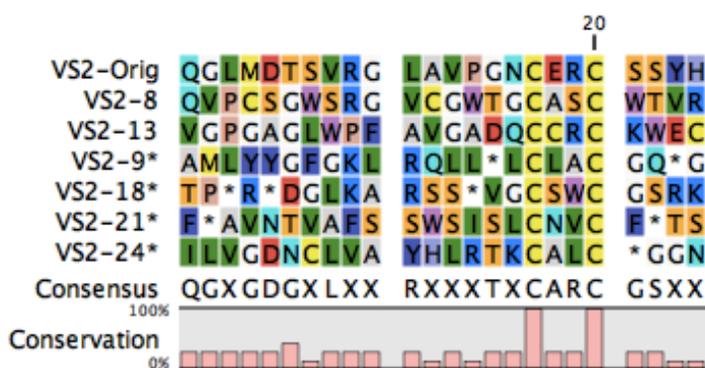


Figura 16. Variabilidad obtenida en el CDR3 a partir del marco TN16. Siete de 10 clonas secuenciadas presentaron una secuencia diferente en el CDR3 a la del marco TN16 utilizado. Las cisteínas representativas dentro del CDR3 de esta biblioteca (posición 17 y 20 dentro del CDR3) se mantuvo en todas las clonas.

Debido a que T1, T20 y TN16 corresponden al nombre del gen del cual se partió para la construcción de cada biblioteca, a partir de este punto las bibliotecas fueron renombradas como: VS0, VS1 y VS2, respectivamente. Donde el número dentro del nombre de la biblioteca denota el número de cisteínas que originalmente están presentes en el CDR3 del marco utilizado para cada biblioteca.

Se realizó un reajuste del tamaño de las bibliotecas considerando el porcentaje de variabilidad que se obtuvo para cada una (70, 60 y 60 % para VS0, VS1 y VS2, respectivamente). El tamaño final obtenido para cada biblioteca se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Tamaño estimado de las bibliotecas sintéticas

Biblioteca	Tamaño estimado
VS0	1.2×10^9
VS1	4.0×10^9
VS2	3.4×10^{11}

4.3 Validación de las bibliotecas sintéticas

La validación de las bibliotecas se realizó seleccionando contra siete antígenos: eritrocitos de gallina, aquaporina, VEGF, FGF-2, LIF, GYPA y CEA. En todos los casos la selección se realizó durante 4 rondas, mediante panning.

4.3.1 Selección contra eritrocitos de gallina

Al finalizar las rondas de selección se tomaron 20 clonas al azar a partir de la ronda 3 y 4 de selección con cada biblioteca, se evaluaron por PCR utilizando los oligonucleótidos Ompseq y gback. Todas las clonas amplificaron el fragmento del tamaño esperado ~ 400 pb. Se llevó a cabo la extracción del plásmido de las 20 clonas y fueron secuenciados.

Los resultados de secuenciación mostraron para VS0 dos secuencias nuevas y completas (T1.5 y T1.12), de estas dos secuencias T1.5 no presentaba codón ámbar de parada, mientras que T1.12 presentaba dos codones de paro (Figura 17).

```

T1.5  YYCKARENLE PWLRWRETEN RVDSVGGYYG AG 32
T1.12 YYCKADTRTS SRGCGVAG** CGWCVIIGYYG AG 32
Consensus YYCKAXXXXX XXXXXXXXEN XXXXVXGYYG AG

```

Figura 17. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-eritrocitos de gallinas. La secuencia incluye 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

Para la biblioteca VS1 se obtuvieron nueve secuencias nuevas, de las cuales tres (T2, T5 y T9) fueron secuencias sin codón de parada ámbar y las seis restantes (T8, T13, T14, T15, T18 y T19) presentaban uno o más codones de parada dentro del CDR3. En todos los casos se mantuvo la cisteína característica dentro del CDR3 de esta biblioteca (Figura 18).

```

T2  YYCNARKGPL DGVPRTCCKG GYDGAG 26
T5  YYCNATWIGD IRGRALCASS SYDGAG 26
T9  YYCNAPCDVN NRGVGCRCVM KYDGAG 26
T8  YYCNARSLYR ETDNFC*LN TYDGAG 26
T13 YYCNAQDTSL GH*IFTCRDR RYDGAG 26
T14 YYCNAKG*RV KVGSHACAHQ LYDGAG 26
T15 YYCNAKG*RV KVGSHACAPQ LYDGAG 26
T18 YYCNAFF*CD SM*AIWC*MH MYDGAG 26
Consensus YYCNAXGXR XKXGXHCAXQ LYDGAG

```

Figura 18. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-eritrocitos de gallinas. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

No se obtuvo ninguna secuencia nueva de las muestras provenientes de la biblioteca VS2. Todas las secuencias obtenidas correspondieron a la secuencia original de TN16.

4.3.2 Selección contra AQP1

Al finalizar las rondas de selección se tomaron 20 clonas al azar de la ronda 3 y 4 y se evaluaron por PCR utilizando los oligonucleótidos Ompseq y gback. Los resultados de secuenciación mostraron para la biblioteca VS0 dos secuencias de anticuerpos nuevas y completas: AQ14 y AQ16 (Figura 19) y una secuencia que incorporó un codón de parada ámbar (AQ10). No se obtuvo secuencia nueva y sin codón de parada con VS1, sin embargo se obtuvo una secuencia nueva que incorporó un codón de parada ámbar

dentro de su CDR3 (AQ1) (Figura 20). De igual manera, para VS2 no se obtuvieron secuencias nuevas, completas, sin codón ámbar, pero si dos secuencias de anticuerpos que presentaban uno o más codones ámbar en su CDR3.

```

AQ14  YYCKAITKET  LGWLGHFTTP  RRGWWRAYYG  AG 32
AQ16  YYCKALMSHF  GSTWPRVFKW  LGLGPKSYYG  AG 32
AQ10  YYCKALTES*  ENPWCSVVRW  GVAELVGYG   AG 32
Consensus  YYCKALTXXX  XXXWXXVXXW  XXXXXXXYYG  AG

```

Figura 19. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-AQP1. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

```

AQ1  YYCNA*TGVEVPKER*CLWPGYDGAG

```

Figura 20. CDR3 de la clona aislada durante la selección VS1-AQP1. La secuencia incluye 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

4.3.3 Selección contra VEGF

Se tomaron 20 clonas al azar de la ronda 3 y 4 de selección con cada biblioteca, se evaluaron por PCR utilizando los oligonucleótidos Ompseq y gback, se extrajo el ADN plasmídico de las clonas positivas y fue secuenciado.

Los resultados de secuenciación para la biblioteca VS0 mostraron cuatro secuencias nuevas de las cuales dos eran secuencias completas y sin codón de parada ámbar dentro del CDR3 (V0-4 y V0-42) y las otras dos secuencias presentaban uno o más codones de parada dentro del CDR3 (V0-33 y V0-46) (Figura 21).

```

VS0-4  YYCKAQTIGR  RKRGPLASLA  AMMGSSDYGG  AG 32
VS0-42 YYCKAQPQDK  DDDSLVQCVA  DGMGFLYYG   AG 32
VS0-33 YYCKAMVSGY  HASCGMARAG  WL*VMRHYYG  AG 32
VS0-46 YYCKADSECL  *VKVLRGCYV  SLLSGYVYYG  AG 32
Consensus  YYCKAQXXGX  XXXXLXACXA  XLXXGXXYYG  AG

```

Figura 21. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-VEGF. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

Para la biblioteca VS1 de las muestras enviadas a secuenciación se obtuvieron nueve secuencias nuevas y diferentes, de las cuales, tres fueron secuencias sin codón de parada dentro del CDR3 (VS1-11, VS1-20 y VS1-24) y seis fueron secuencias nuevas que presentaban uno o más codones de parada dentro del CDR3 (VS1-7, VS1-10, VS1-13, VS1-14, VS1-16 y VS1-21). Se mantuvo la cisteína característica dentro del CDR3 de esta biblioteca (Figura 22).

VS1-11	YYCNAWR	QCS	FAVRWG	CSVL	GYDGAG	26
VS1-20	YYCNAV	TTSP	GGVDS	FCCVA	SYDGAG	26
VS1-24	YYCNAE	VQTD	REVQG	ACMRP	GYDGAG	26
VS1-7	YYCNA	DF*AV	WFVCE	CCRIR	SYDGAG	26
VS1-10	YYCNAV	VRS	H	KIVYW*CGES	GYDGAG	26
VS1-13	YYCNA	SQ*LL	VGR	TSNCWCM	SYDGAG	26
VS1-14	YYCNA	ALPWV	WKFG*LCQMG	GYDGAG	26	
VS1-16	YYCNAV	TTSP	GGVDS	FCCVA	L*DGAG	26
VS1-21	YYCNA	YNGIL	WNGWG	SCRLLV	*YDGAG	26
Consensus	YYCNAV	XTSX	WGVDS	FCXVA	GYDGAG	

Figura 22. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-VEGF. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

En cuanto a la biblioteca VS2 todas las muestras enviadas correspondieron a una sola secuencia (VS2-5), la cual incorporaba un codón de parada ambar dentro del CDR3, la secuencia mantuvo las dos cisteínas canónicas de esta biblioteca dentro del CDR3 (Figura 23).

VS2-5 FYCKADNFCGGVCSVMV*GLCLSCGKYYYD GAG

Figura 23. CDR3 de la clona aislada durante la selección VS2-VEGF. La secuencia incluye 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

4.3.4 Selección contra FGF-2

De la selección contra FGF-2 se tomaron ~ 40 clonas al azar, se produjo fago de las colonias individuales y se realizó ELISA de fagos utilizando HA-tag como antígeno de captura, para evaluar las clonas que desplegaban un fago completo en el cual la mutagénesis había ocurrido correctamente. Las colonias que tuvieron un resultado positivo, fueron secuenciadas.

De la biblioteca VS0 se secuenciaron 15 muestras, los resultados mostraron dos secuencias nuevas, completas y sin codón de parada en el CDR3 (FGV0-6 y FGV0-31) y cuatro secuencias nuevas y diferentes pero que incorporaban uno o más codones de parada dentro del CDR3 (FGV0-10, FGV0-21, FGV0-26 y FGV0-33) (Figura 24).

FGV0-6	YYCKALSVPN	FFSWWHEKGR	WRYEGRGYG	AG 32
FGV0-31	YYCKADPWLW	VSGWWSKIW	GNRVARRYG	AG 32
FGV0-10	YYCKASVMPW	GYADWVGG*	KGTAMGKYYG	AG 32
FGV0-21	YYCKAR*RLY	*ADYMSDSL	SHCYVWGYYG	AG 32
FGV0-26	YYCKAHRVLH	CFSR*GDLRF	VSGREEEYYG	AG 32
FGV0-33	YYCKAPRWYS	MMKKAYSSD*	*AK*ASGYG	AG 32
Consensus	YYCKAXRXLW	XFSXWXXXXX	XXXXARGYYG	AG

Figura 24. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-FGF-2. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

De la biblioteca VS1, se secuenciaron 15 clonas. Los resultados mostraron tres secuencias nuevas, completas y sin codón de parada ámbar dentro del CDR3 (FGV1-17, FGV1-27 y FGV1-162) y siete secuencias nuevas que incorporaban uno o más codones de parada ámbar dentro del CDR3 (FGV1-1, FGV1-2, FGV1-9, FGV1-14, FGV1-15, FGV1-18 y FGV1-26). Todas las secuencias mantuvieron la cisteína característica dentro del CDR3 de la biblioteca (Figura 25).

FGV1-17	YYCNAVFRF	TCVVFRCMSQ	RYDGAG	26
FGV1-27	YYCNAPWLCS	VGATVRCITLV	MYDGAG	26
FGV1-162	YYCNAPTDM	QLSGGLCGIR	GYDGAG	26
FGV1-1	YYCNA*LRSE	YA*RVCCGE	RYDGAG	26
FGV1-2	YYCNA*LRSE	YA*RVCCGE	RYDGAG	26
FGV1-9	YYCNAWCGRN	VWVAATCT*G	WYDGAG	26
FGV1-14	YYCNATSRRS	GL*RIPCCGG	SYDGAG	26
FGV1-18	YYCNAGSVIL	ENN*VYCKTC	YDYGAG	26
FGV1-26	YYCNASVVA*	NYVIVCSLL	*YDGAG	26
Consensus	YYCNAPXXRX	XXXRVXCXGX	RYDGAG	

Figura 25. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-FGF-2. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

Los resultados de secuenciación para la biblioteca VS2 no mostraron ninguna secuencia nueva y completa. Todas las secuencias obtenidas correspondieron a la secuencia original de TN16.

4.3.5 Selección contra LIF

Una vez finalizadas las rondas de selección se tomaron ~ 40 clones al azar de las dos últimas rondas de selección contra LIF con cada biblioteca, se produjo fago de las colonias individuales, se realizó ELISA de fagos y las colonias que tuvieron un resultado positivo fueron secuenciadas.

De la biblioteca VS0 se secuenciaron 15 clones, se obtuvieron siete nuevas secuencias completas y sin codón de parada ámbar dentro del CDR3 (LIVO-2, LIVO-4, LIVO-10, LIVO-12, LIVO-14, LIVO-21 y LIVO-43). Se obtuvieron cuatro secuencias nuevas adicionales, pero incorporaban uno o más codones de parada ámbar dentro del CDR3 (LIVO-6, LIVO-13, LIVO-37 y LIVO-45) (Figura 26).

LIVO-2	YYCKAHTKWG	EEPLSWKLVG	AALINRSYYG	AG 32
LIVO-4	YYCKAYLSVE	RHYCEFSGIT	WLNACAYYG	AG 32
LIVO-10	YYCKAAVRRY	KGFLGYHYWN	WLDYHPFYYG	AG 32
LIVO-12	YYCKARTSLR	KGFRWRKSWL	MGERGAVYYG	AG 32
LIVO-14	YYCKAKLHRA	MVGRWARAVR	SRCCARNYYG	AG 32
LIVO-21	YYCKAVGETV	RSVMYGVWGW	DWGGSGLYYG	AG 32
LIVO-43	YYCKAMDVRV	CMRCEWATM	TETTRREYYG	AG 32
LIVO-6	YYCKANWWP*	LLRGMKLPWV	LPLYSVSYG	AG 32
LIVO-13	YYCKAVGVT*	PSGNL*RRWS	HYGL*AYYYG	AG 32
LIVO-37	YYCKAMTFESH	LR S*FMCFWY	EAFRCGVYYG	AG 32
LIVO-45	IYCKAKGASR	DWGNVC**SL	PLGVRVCYYG	AG 32
Consensus	YYCKAXXXRX	XXGXEWXAWL	WLGXXRXYG	AG

Figura 26. Alineamiento del CDR3 de clones aislados durante la selección VS0-LIF. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

Para la biblioteca VS1 se secuenciaron 15 clones, de las secuencias obtenidas dos correspondieron a secuencias nuevas, completas y sin codón de parada ámbar dentro del CDR3 (LIV1-16 y LIV1-152) y cinco correspondieron a secuencias nuevas que incorporaban uno o más codones de parada ámbar dentro de su CDR3 (LIV1-15, LIV1-24, LIV1-26, LIV1-36 y LIV1-102). Nuevamente se apreció que la cisteína característica en el CDR3 de esta biblioteca se mantuvo durante la mutagénesis (Figura 27).

LIV1-16	YYCNAPALG	SRWGRLCWSH	LYDGAG	26
LIV1-152	YYCNAVLEIF	AVESGQCWGT	EYDGAG	26
LIV1-15	YYCNA*FSVF	VRYSCCSPF	VYDGAG	26
LIV1-24	YYCNAR*LHA	PSEIWLCEGL	CYDGAG	26
LIV1-26	YYCNAECDG*	SGMTKVCKLS	NYDGAG	26
LIV1-36	YYCNAFQVY	MFAPPVCNSV	*YDGAG	26
LIV1-102	YYCNATTP*C	GGFVCGCSWY	VYDGAG	26
Consensus	YYCNAXXXVF	SXEXXCXXX	VYDGAG	

Figura 27. Alineamiento del CDR3 de clones aislados durante la selección VS1-LIF. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

Para la biblioteca VS2 se secuenciaron 15 clones de las dos últimas rondas de selección. Se obtuvieron solo dos secuencias nuevas y completas (LIV2-7 y LIV2-42), ambas secuencias incorporaron un codón de parada ámbar dentro del CDR3 (Figura 28).

```

LIV2-7  FYCKALGPYT DI*WTEKLQA FCTTCWLSSY DGAG 34
LIV2-42 FYCKA*APDC GRTVRSKCS FCHLCGLEVY DGAG 34
Consensus FYCKALXPXX XXTXXXXXXX FCXXCXLXXY DGAG

```

Figura 28. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS2-LIF. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

4.3.6 Selección contra Glicoforina humana A

Se realizó ELISA de fagos a ~ 40 clonas seleccionadas al azar de las dos últimas rondas de selección contra GYPA. Se extrajo el ADN plasmídico de las clonas que tuvieron un resultado positivo y fue secuenciado.

Se secuenciaron 15 clonas de la biblioteca VS0. Se obtuvieron tres secuencias nuevas y completas, dos de ellas sin codón de parada ámbar en su CDR3 (GPV0-2 y GPV0-106) y una más que incorporó un codón de parada ámbar en dicho CDR (GPV0-29) (Figura 29).

```

GPV0-2  YYCKAVSDIT LRMVSCAWQG SCPSMRRYYG AG 32
GPV0-106 YYCKAMRWVL RGGALAEHRA CRAGRRLYYG AG 32
GPV0-29 YYCKAAPL GK LPVVLGGPVI WV*RLRVYYG AG 32
Consensus YYCKAXXXXX LXXVLXXXXX XXXXXRXYG AG

```

Figura 29. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-GYPA. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

De la selección con la biblioteca VS1 se secuenciaron 14 muestras. Los resultados de secuenciación mostraron cuatro secuencias nuevas (GPV1-3, GPV1-23, GPV1-67 y GPV1-70) las cuales incorporaban 1 o 2 codones de parada dentro del CDR3. Se mantuvo la cisteína característica en el CDR3 de esta biblioteca. (Figura 30).

GPV1-3	YYC	NAPWYRD	*LVLWLCWWW	AYDGAG	26
GPV1-23	YYC	NAMGLIH	TNL**ACLTV	TYDGAG	26
GPV1-67	YYC	NAEACCV	*RFEKCCILD	GYDGAG	26
GPV1-70	YYC	NAR*RRR	SAVLEGC*TV	TYDGAG	26
Consensus	YYCN	AXXXRX	XXVLXXCXTV	TYDGAG	

Figura 30. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-GYP A. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

De la biblioteca VS2, se secuenciaron cuatro muestras. No se obtuvo ninguna secuencia nueva y completa.

4.3.7 Selección contra CEA

Se realizó ELISA de fagos a 40 clonas seleccionadas al azar de las rondas de selección 3 y 4 contra CEA. Los plásmidos de las colonias que tuvieron un resultado positivo fueron secuenciados.

Se secuenciaron 20 muestras de la biblioteca VS0. Se obtuvieron doce secuencias nuevas, completas y sin codón de parada ámbar en el CDR3 (CV0-13, CV0-28, CV0-30, CV0-36, CV0-43, CV0-47, CV0-74, CV0-75, CV0-76, CV0-80, CV0-84 y CV0-91) (Figura 31).

CV0-13	YYCKAFSARL	YWFNKVMGTG	KRWPWAMYYG	AG	32
CV0-28	YYCKALSGRM	FRPLGVWLPR	MSMRTRKYYG	AG	32
CV0-30	YYCKAMALTA	PSKTVGRHLC	VCWGALLYYG	AG	32
CV0-36	YYCKAFGVGR	GLLGGWSGFG	PWLRGRGYYG	AG	32
CV0-43	YYCKADMVWS	WWGGWRPVRR	LGWKGWSYYG	AG	32
CV0-47	YYCKASVLRG	KYGWSSLISGG	LPRLIGTYYG	AG	32
CV0-74	YYCKAGYRAH	GFHPWAPWGG	VQRLWRWYYG	AG	32
CV0-75	YYCKAKTIGR	RKRGPLASLA	AMMGSSDYYG	AG	32
CV0-76	YYCKAIASEF	AVNWFGLWR	KIMSQWGYG	AG	32
CV0-84	YYCKARTIGR	RKRGPLASLA	AMMGSSDYYG	AG	32
CV0-91	YYCKAGYGR	SILGFLFGHY	GPRLHGAYG	AG	32
Consensus	YYCKA	XXXRX	XXGXLXXLG	XXMXXRXYG	AG

Figura 31. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS0-CEA. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

De la selección con la biblioteca VS1 se secuenciaron 10 muestras. Los resultados de secuenciación mostraron cinco secuencias nuevas y completas, tres de ellas sin codón de parada ámbar en el CDR3 (CV1-5, CV1-65 y CV1-75) y dos más que incorporaron un codón ámbar en el CDR3 (CV1-2 y CV1-3) (Figura 32).

CV1-5	YYCNAWQAEG	FKCLPRCGEN	SYDGAG	26
CV1-65	YYCNAEAGWG	KFWNGWCKPA	TYDGAG	26
CV1-75	YYCNAWYDGL	GPMV GQCKTD	FYDGAG	26
CV1-2	YYCNA* KTTY	CQVMNKCCMW	GYDGAG	26
CV1-3	YYCNAKSR I	WSQARVCK* K	KYDGAG	26
Consensus	YYCNAWKXXG	XXXXGXCKXX	XYDGAG	

Figura 32. Alineamiento del CDR3 de clonas aisladas durante la selección VS1-CEA. Las secuencias incluyen 5 aminoácidos antes y después del CDR3. La región CDR3 está subrayada en negro.

Para la biblioteca VS2, fueron secuenciadas tres muestras. No se obtuvo ninguna secuencia nueva y completa.

4.4 Expresión de los anticuerpos y capacidad de reconocimiento a su blanco

Para la expresión de los anticuerpos como proteína recombinante, se decidió seguir trabajando con aquellos anticuerpos que no presentaron codón de parada ámbar en la región CDR3, ya que estos podían ser directamente transformados en una cepa de expresión como BL21 (DE3), mientras que aquellos que habían incorporado uno o más codones de parada ámbar en su CDR3 necesitaban de un paso adicional de sustitución del codón ámbar por una glutamina (Q), lo que podía incrementar el tiempo de validación de las bibliotecas.

Los anticuerpos que mostraron una absorbancia de al menos el doble de la del BSA utilizado como control negativo, fueron considerados con expresión positiva y fueron evaluados mediante ELISA para confirmar su capacidad de reconocimiento al antígeno blanco.

4.4.1 Anticuerpos anti-eritrocitos de gallina

Los anticuerpos T1.5, proveniente de la biblioteca VS0; y T2, T5 y T9, provenientes de la biblioteca VS1, fueron transformados en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), se llevó a cabo la expresión de la proteína y la subsecuente extracción periplásmica de la misma. Mediante ensayo ELISA se evaluó y observó expresión de los tres anticuerpos. Las proteínas fueron evaluadas en un ensayo de aglutinación de eritrocitos de gallina para corroborar su capacidad de reconocimiento al antígeno cognado. Los tres anticuerpos tuvieron un resultado positivo en el ensayo.

4.4.2 Anticuerpos anti-AQP1

Los dos anticuerpos anti-AQP1 evaluados (AQ14 y AQ16) presentaron una buena expresión en comparación al control negativo BSA 1% (Figura 33).

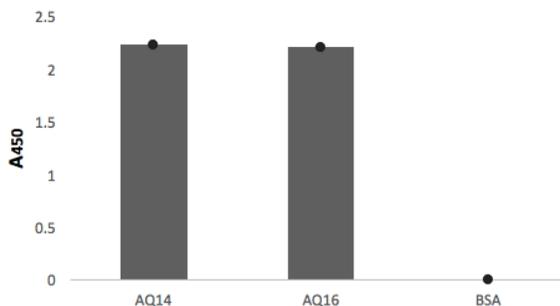


Figura 33. Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-AQP1. AQ14 y AQ16 mostraron expresión positiva (con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -). Ctrl - BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

Se evaluó mediante ensayo ELISA la capacidad de los dos anticuerpos anti-AQP1 para reconocer a su blanco. La figura 34 muestra los resultados del ELISA, ambos anticuerpos fueron capaces de reconocer al antígeno.

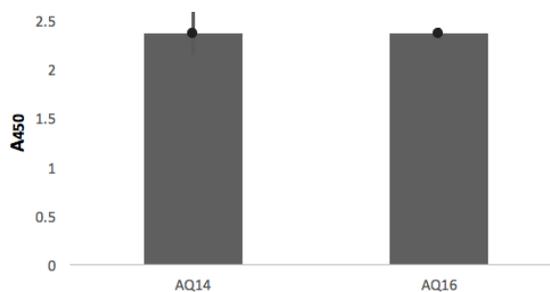


Figura 34. Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a AQP1. AQ14 y AQ16 mostraron reconocimiento por el antígeno. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.4.3 Anticuerpos anti-VEGF

Se seleccionaron para expresión los anticuerpos VS0-4 y VS0-42 de la biblioteca VS0; y VS1-11, VS1-20 y VS1-24 de la biblioteca VS1. De la biblioteca VS2 no se contaba con ningún anticuerpo contra este antígeno sin codón de parada ámbar en el CDR3. Los resultados de expresión se muestran en la figura 35. Los dos anticuerpos correspondientes a la biblioteca VS0 mostraron una buena expresión. En cuanto a los anticuerpos de la biblioteca VS1, solo se observó expresión para VS1-20. Se utilizó como control negativo de expresión BSA 1% y como control positivo de expresión se utilizó V13, un anticuerpo anti-VEGF proveniente de una biblioteca inmune, previamente reportado (Camacho-Villegas *et al.*, 2018).

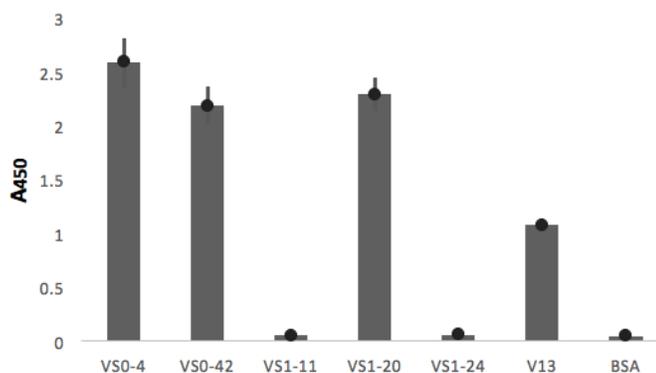


Figura 35. Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-VEGF. VS0-4, VS0-42 y VS1-20 mostraron expresión positiva (con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -). Ctrl +, V13. Ctrl -, BSA 1 %. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

Se evaluó la capacidad de reconocer a VEGF, de los tres anticuerpos que presentaron expresión (VS0-1, VS0-42 y VS1-20). Se utilizó V13 como control positivo de reconocimiento. De los tres anticuerpos evaluados, VS0-4 (de la biblioteca VS0) y VS1-20 (de la biblioteca VS1) mostraron reconocimiento al antígeno (Figura 36).

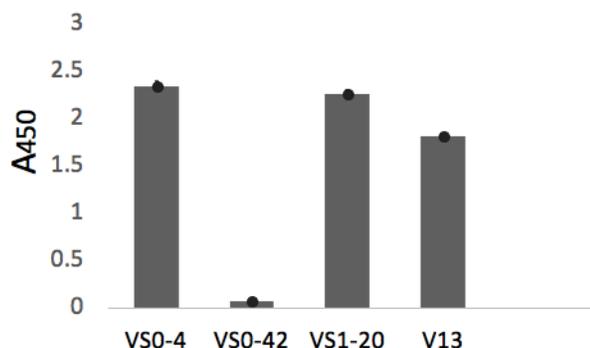


Figura 36. Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a VEGF. VS0-4 y VS1-20 mostraron reconocimiento por el antígeno. Ctrl (+) V13. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.4.4 Anticuerpos anti-FGF-2

De los anticuerpos obtenidos de las diferentes bibliotecas en la selección contra FGF-2, se seleccionaron para expresión los anticuerpos FGV0-6 y FGV0-31 de la biblioteca VS0; y FGV0-17, FGV0-27 y FGV0-162 de la biblioteca VS1. De la biblioteca VS2 no se contó con ningún anticuerpo contra este antígeno. La figura 37 presenta resultados de expresión. Los cinco anticuerpos evaluados presentaron expresión, los dos anticuerpos correspondientes a la biblioteca VS0 mostraron una mejor expresión que los correspondientes a la biblioteca VS1. Se utilizó como control negativo de expresión BSA 1%.

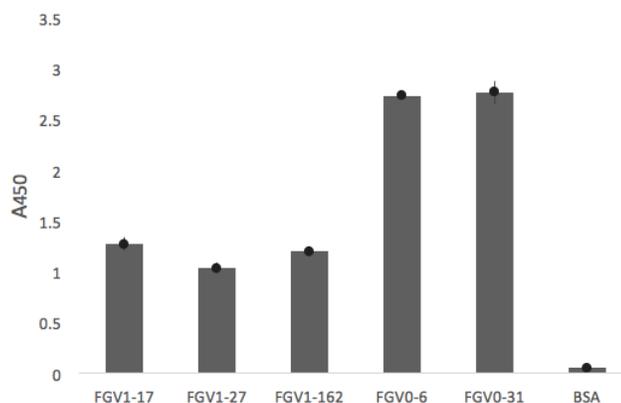


Figura 37. Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-FGF-2. FGV1-17, FGV1-27, FGV1-162, FGV0-6, y FGV0-31 mostraron expresión positiva (con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -). Ctrl -, BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

Se evaluó la capacidad de reconocimiento a FGF-2 de los cinco anticuerpos expresados. No se contó con control positivo de reconocimiento. De los cinco anticuerpos evaluados, los dos anticuerpos correspondientes a la biblioteca VS0 (FGV0-6 y FGV0-31) mostraron capacidad de reconocimiento al antígeno; mientras que ninguno de los tres anticuerpos de la biblioteca VS1, mostró reconocimiento contra FGF-2 (Figura 38).

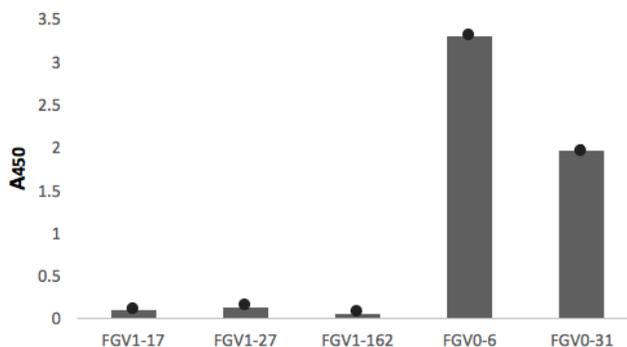


Figura 38. Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a FGF-2. FGV0-6 y FGV0-31 mostraron reconocimiento por el antígeno. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.4.5 Anticuerpos contra LIF

Se expresaron los anticuerpos LIV0-2, LIV0-4, LIV0-10, LIV0-12, LIV0-14, LIV0-21 y LIV0-43 de la biblioteca VS0; y LIV1-16 y LIV1-152 de la biblioteca VS1. De los ocho anticuerpos provenientes de la biblioteca VS0, cuatro mostraron expresión (LIV0-2, LIV0-4, LIV0-10 y LIV0-43), mientras que de los dos anticuerpos expresados de la biblioteca VS1 no se observó buena expresión, LIV1-16 alcanzó a presentar una ligera señal. Se utilizó como control negativo de expresión BSA 1% (Figura 39).

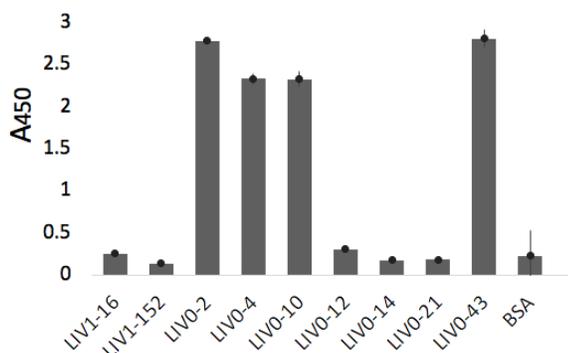


Figura 39. Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-LIF. LIV0-2, LIV0-4, LIV0-10 y LIV0-43 mostraron expresión positiva, con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -. Ctrl - BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

Se evaluó la capacidad de reconocimiento a LIF de los cuatro anticuerpos expresados correspondientes a VS0 y del anticuerpo LIV0-16 de la biblioteca VS1. No se contó con control positivo de reconocimiento. De los cinco anticuerpos evaluados, solo LIV0-2 correspondiente a la biblioteca VS0 mostró reconocimiento al antígeno (Figura 40).

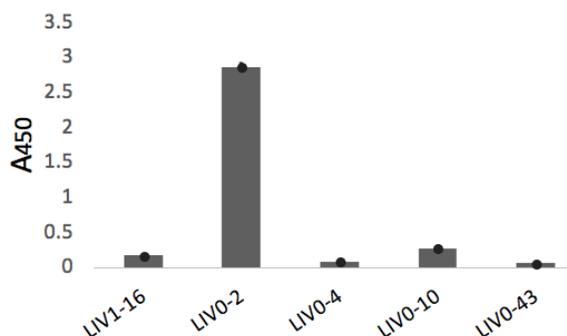


Figura 40. Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a LIF. LIV0-2 mostró reconocimiento por el antígeno. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.4.6 Anticuerpos contra GYPA

Se indujo expresión de los anticuerpos GPV0-2 y GPV0-106. Solo se observó expresión del anticuerpo GPV0-2. Se utilizó como control negativo de expresión BSA 1% (Figura 41). GPV0-2 fue capaz de reconocer a su antígeno en ELISA de fagos, pero no como proteína soluble.

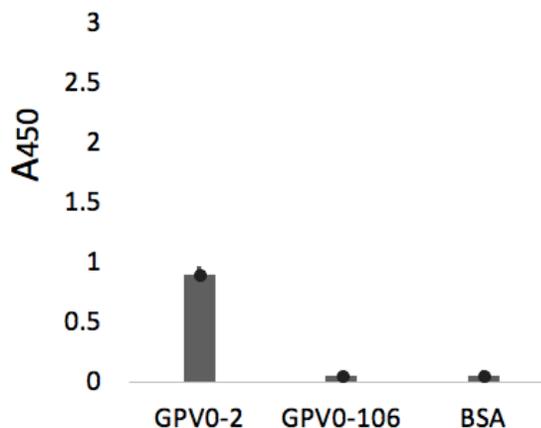


Figura 41. Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-GYPA. GPV0-2 mostró expresión positiva (con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -). Ctrl -, BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.4.7 Anticuerpos contra CEA

Se llevó a cabo la expresión de los anticuerpos CV0-13, CV0-28, CV0-30, CV0-36, CV0-43, CV0-47, CV0-74, CV0-75, CV0-76, y CV0-84 de la biblioteca VS0; y CV1-15, CV1-65 y CV1-75 de la biblioteca VS1. De la biblioteca VS2 no se contó con ningún anticuerpo contra este antígeno. De los once anticuerpos provenientes de la biblioteca VS0, diez mostraron expresión (solo CV0-30 no), mientras que de los tres anticuerpos expresados de la biblioteca VS1, CV1-65 mostró expresión. Se utilizó como control negativo de expresión BSA 1% (Figura 42).

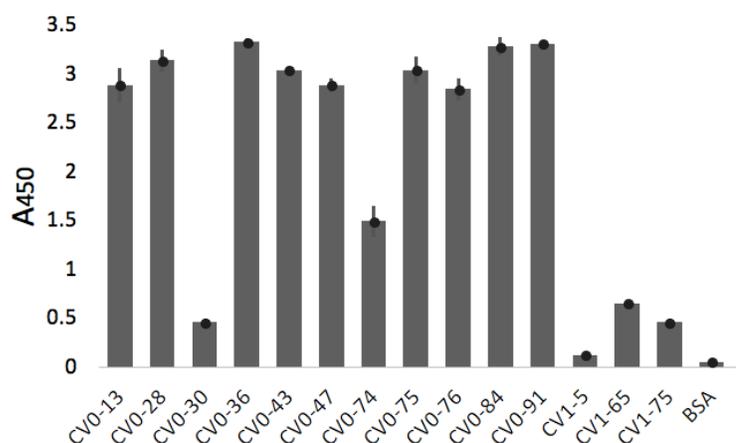


Figura 42. Ensayo ELISA para evaluar expresión de anticuerpos anti-CEA. CV0-13, CV0-28, CV0-36, CV0-43, CV0-47, CV0-74, CV0-75, CV0-76, CV0-84, CV0-91 y CV1-65 mostraron expresión positiva (con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -). Ctrl -, BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

Se evaluó la capacidad de reconocimiento a CEA de los 11 anticuerpos expresados. No se contó con control positivo de reconocimiento. De los 11 anticuerpos evaluados, 3 correspondientes a la biblioteca VS0 (CV0-13, CV0-28 y CV0-43) mostraron reconocimiento a CEA. CV0-43 sugirió el mayor reconocimiento. El anticuerpo evaluado de la biblioteca VS1 no mostró reconocimiento a CEA (Figura 43).

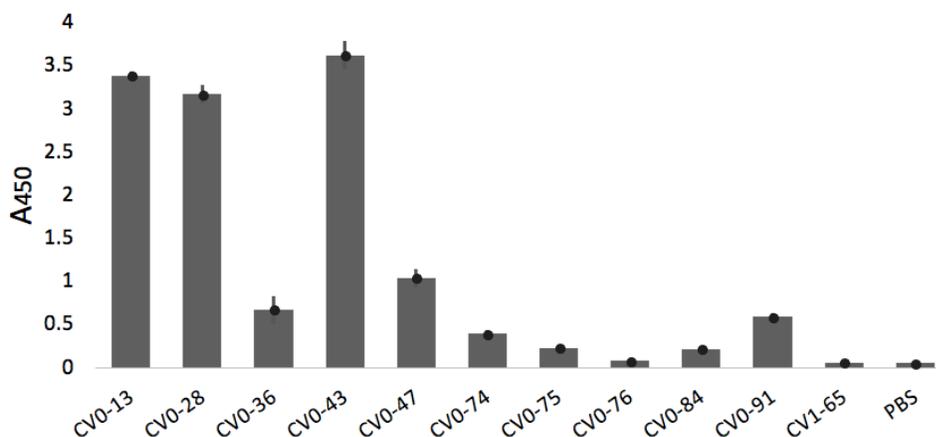


Figura 43. Ensayo ELISA para evaluar el reconocimiento a CEA. CV0-13, CV0-28 y CV0-43 mostraron reconocimiento por el antígeno. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

CEA fue el antígeno contra el que se aisló el mayor número de anticuerpos con reconocimiento positivo a su blanco. Se seleccionaron los tres anticuerpos anti-CEA con el mejor resultado de reconocimiento para realizar una titulación del reconocimiento a CEA. Previo al ELISA, los anticuerpos fueron purificados y cuantificados.

Se prepararon siete diluciones seriadas de los anticuerpos partiendo de una concentración inicial 4 µg/mL (200 ng/pozo), se utilizaron 50 ng/pozo de citocina y cada dilución se evaluó por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 44, nuevamente CV0-43 mostró el mejor reconocimiento a CEA al utilizar diferentes diluciones del anticuerpo, seguido por CV0-28.

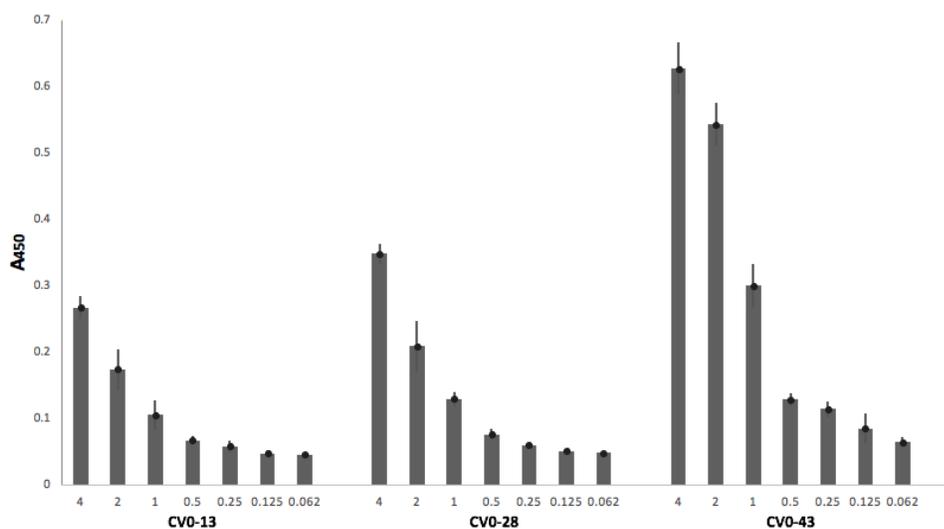


Figura 44. Titulación del reconocimiento de anticuerpos anti-CEA. ELISA de reconocimiento a CEA utilizando siete diluciones (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.062 µg/mL) de los anticuerpos CV0-13, CV0-24 y CV0-43. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.5 Evaluación de reactividad cruzada de anticuerpos vNAR contra TGFβ.

Para asegurar que los vNARs que habían sido considerados con reconocimiento positivo, fueran específicos para su antígeno blanco, se evaluó por ELISA de sandwich su unión a TGFβ (el blanco de las clonas T1 y T20 utilizadas como marcos), debido a que todas las clonas evaluadas provenían de las bibliotecas VS0 y VS1. La eficiencia de unión se comparó con el mAb comercial anti-TGFβ ID11.16.8, realizado en ELISA indirecto. Ninguno de los vNARs evaluados mostró una respuesta de unión positiva a TGFβ (Figura 45). La reactividad de los vNARs fue siete veces inferior a la reactividad del mAb ID11.16.8 utilizado como control positivo.

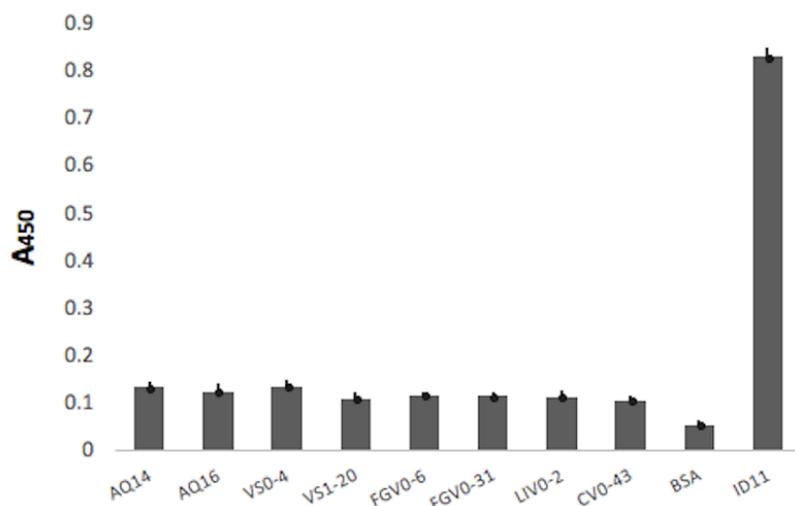


Figura 45. Evaluación de reactividad cruzada de anticuerpos vNAR contra TGFβ. Se utilizó a AQ14, AQ16, VS0-4, VS1-20, FGV0-6, FGV0-31, LIV0-2 y CV0-43 como anticuerpos de captura en un ELISA de sándwich para evaluar su unión a TGFβ, el antígeno blanco de los marcos utilizados para las bibliotecas VS0 y VS1. El mAb comercial anti-TGFβ ID11.16.8 se usó para detectar al antígeno de captura. Se utilizó BSA al 1% como control negativo. El mAb anti-TGFβ ID11.16.8 se utilizó como control positivo, en un formato ELISA indirecto. Ninguna de las proteínas vNAR evaluadas mostró una respuesta positiva de unión al TGFβ, la reactividad de las proteínas vNAR fue siete veces inferior a la reactividad del control positivo. A₄₅₀: Absorbancia a 450 nm.

La tabla 9 resume los resultados obtenidos de la validación de las bibliotecas sintéticas. La biblioteca VS0 sugirió el mejor resultado con al menos un anticuerpo con reconocimiento contra todos los antígenos evaluados. VS1 presentó anticuerpos con reconocimiento para 2 de los antígenos, mientras que la biblioteca VS2 no ha podido ser probada en ensayos de reconocimiento, debido a que todos los anticuerpos que han sido aislados de ella han presentado codones de parada ámbar en el CDR3.

Tabla 9. Resumen de las clonas totales obtenidas durante la validación de las bibliotecas sintéticas. Se enlistan las clonas sin o con* codón de parada ámbar.

Biblioteca	Eritrocitos	AQP1	VEGF	FGF	LIF	GYPA	CEA
VS0	2 (1 y 1*) 1 con rec.	2 (2) 2 con rec.	5 (3 y 2*) 1 con rec.	6 (2 y 4*) 2 con rec.	11 (7 y 4*) 1 con rec.	3 (2 Y 1*) 1 con rec.	11 (10) 7 con rec.
VS1	9 (3 Y 6*) 3 con rec	2 (2*)	9 (3 y 6*) 1 con rec	10 (3 y 7*)	7 (2 y 5*)	4 (4*)	5 (3 y 2*)
VS2	-	2 (2*)	1 (1*)	-	2 (2*)	-	-

4.6 Expresión y purificación de anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA

Los anticuerpos anti-VEGF que presentaron reconocimiento en el ensayo de ELISA (VS0-4 y VS1-20), y el anticuerpo anti-CEA (CV0-43) que presentó el mejor reconocimiento por ELISA, fueron expresados en mayor volumen y purificados. La purificación se eluyó en cinco o seis fracciones de 500 μ L para los anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA, respectivamente. Se evaluaron 10 μ L de las eluciones por SDS-PAGE y Wester Blot utilizando el anticuerpo anti-HA-HRP, para confirmar la presencia de las proteínas vNAR. La figura 46 muestra el resultado de la inmunodetección de los anticuerpos anti-VEGF. La mayor cantidad de proteína para ambas muestras anti-VEGF se observó en las eluciones 1 y 2. Estas dos fracciones se juntaron y dializaron contra PBS, finalmente fueron cuantificadas. Para VS0-4 se obtuvo una concentración de 55 μ g/mL y para VS1-20 31 μ g/mL. Se repitió un ELISA de reconocimiento a VEGF con VS0-4 y VS1-20 utilizando los anticuerpos purificados y cuantificados. Se utilizaron 250 ng/pozo de antígeno y 450 ng/pozo de anticuerpo (por triplicado). Se utilizó BSA 1 % como control negativo. Los resultados del reconocimiento a VEGF por ensayo ELISA con VS0-4 y VS1-20 (Figura 47) mostraron que los anticuerpos reconocen mejor a su blanco que a BSA.

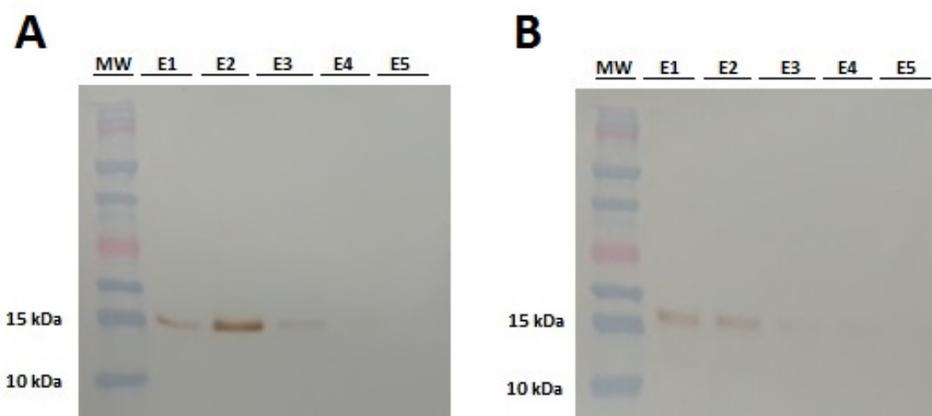


Figura 46. Western blot de los anticuerpos anti-VEGF purificados. A) Western blot VS0-4 purificado. B) Western blot VS1-20 purificado. Para ambas muestras, se observó proteína en la E1-E3. (MM) marcador molecular. (E1-E5) Elución 1-5.

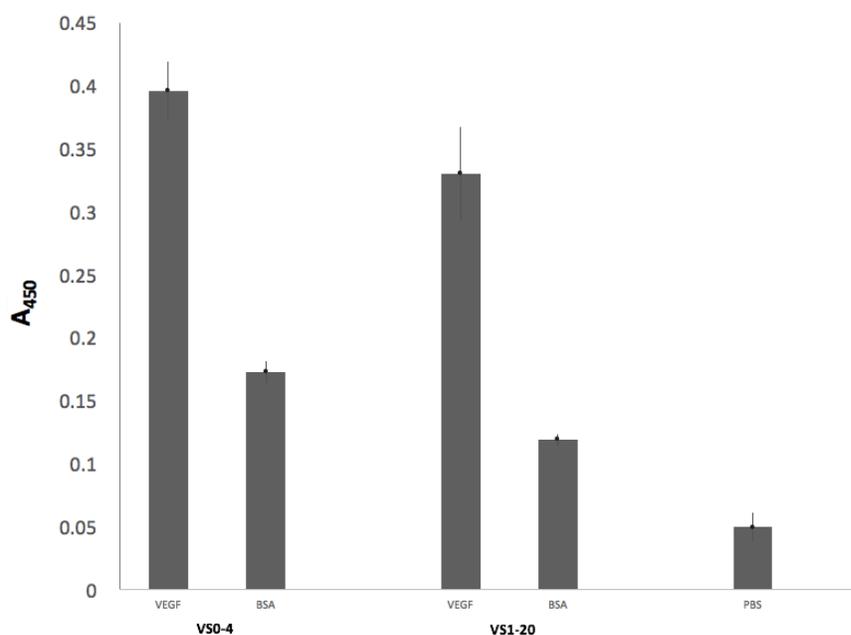


Figura 47. Ensayo ELISA para evaluar reconocimiento a VEGF. Reconocimiento a VEGF por los anticuerpos VS0-4 y VS1-20. 250 ng/pozo de antígeno y 450 ng/pozo de anticuerpo. Ctrl (-) BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

La figura 48 muestra los resultados de inmunodetección del anticuerpo CV0-43, se observó proteína en todas las eluciones. Las seis eluciones de CV0-43 se juntaron y dializaron contra PBS, finalmente fueron cuantificadas obteniendo una concentración de 25 µg/mL. La figura 49 muestra el ELISA de reconocimiento a CEA, utilizando CV0-43 y BSA 1 % como control negativo, se utilizaron 250 ng/pozo de antígeno y 175

ng/pozo de anticuerpo (por triplicado), se observa que CV0-43 tiene mejor reconocimiento a CEA que a BSA.

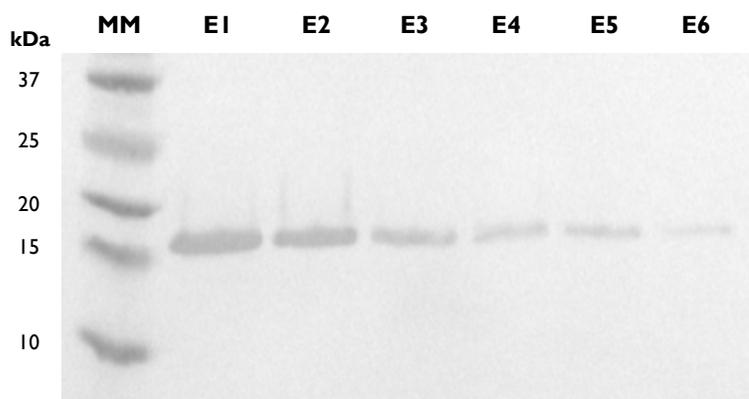


Figura 48. Western blot del anticuerpo CV0-43, anti-CEA, purificado. Se observó proteína en las 6 eluciones. (MM) marcador molecular. (E1-E6) Elución 1-6.

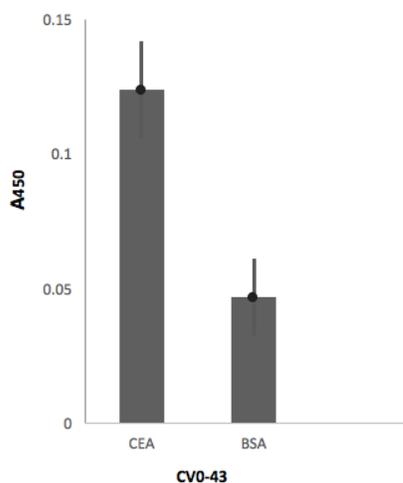


Figura 49. Ensayo ELISA para evaluar reconocimiento a CEA. Reconocimiento a CEA utilizando el anticuerpo CV0-43. Ctrl (-) BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.6.1 clonación del anticuerpo anti-VEGF VS2-5

El anticuerpo VS2-5 obtenido de la biblioteca VS2 contra VEGF, no pudo ser expresado debido a que había incorporado en su CDR3 un codón de parada ámbar durante la mutagénesis. Para llevar a cabo la expresión de este anticuerpo es necesario hacer un cambio en dicha posición, sustituyendo por una glutamina. Se diseñaron y enviaron sintetizar cuatro versiones de VS2-5 (Figura 8). VS2-5CQ y VS2-5AQ se

clonaron en pComb3X y se expresaron. La figura 50 muestra la evaluación de la expresión en ensayo ELISA de los anticuerpos VS2-5CQ y VS2-5AQ. Ambos anticuerpos mostraron expresión. Se evaluó el reconocimiento a VEGF por estas dos versiones de VS2-5 en ELISA. Se utilizaron 450 ng de anticuerpo y 250 ng/pozo de VEGF. El reconocimiento se evaluó por triplicado para cada anticuerpo (Figura 51). Ninguno de los dos anticuerpos VS2-5 presentó reconocimiento a VEGF.

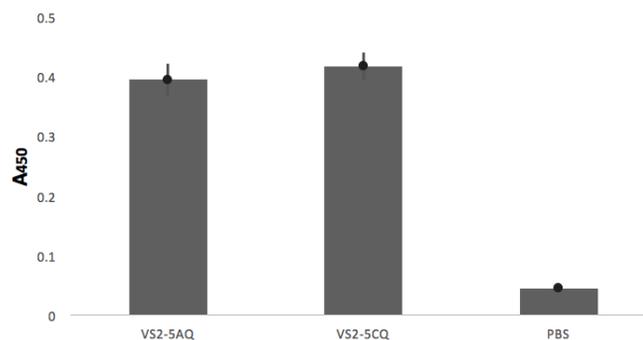


Figura 50. ELISA para evaluar expresión de VS2-5AQ y VS2-5CQ. VS2-5AQ y VS2-5CQ mostraron expresión positiva (con una absorbancia de al menos el doble que el Ctrl -). A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

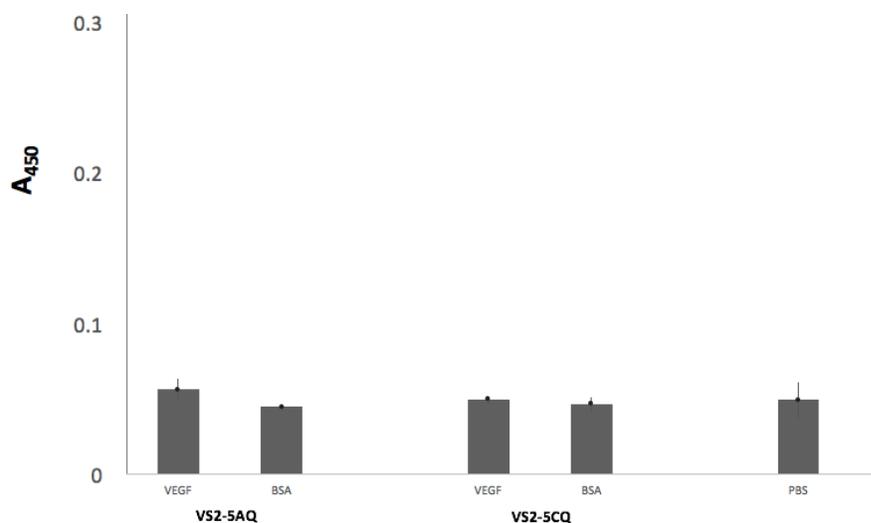


Figura 51. ELISA para evaluar el reconocimiento a VEGF. Reconocimiento a VEGF por los anticuerpos VS2-5AQ y VS2-5CQ, utilizando 250 ng/pozo de antígeno y 450 ng/pozo de anticuerpo. Ctrl (-) BSA 1%. A₄₅₀= Absorbancia a 450 nm.

4.7 Modelado *in silico* de los vNARs anti-VEGF: Modelado por homología y dinámica molecular

Se realizó una búsqueda de la molécula más parecida a las proteínas de interés para utilizar como andamio. Se encontró a 4HGK, un dominio vNAR con 59 % de homología a los anticuerpos de interés. 4HGK fue descargada del RCSB Protein Data Bank (PDB), esta estructura fue descrita por Olland, *et al* (2008) mediante el método de difracción de rayos X, con una resolución de 3.04 Å. Los modelos de VS0-4 y VS1-20 fueron refinados por dinámica molecular. Se obtuvieron cinco posibles conformaciones a lo largo de la dinámica. Se seleccionaron las estructuras con el tiempo de existencia más largo (el modelo 3 para VS0-4 y VS1-20). Los modelos tridimensionales refinados de los vNARs mostraron un porcentaje de residuos en las regiones más favorecidas de 89.3% para VS0-4 y 90.7% para VS1-20 (Figura 52A, B).

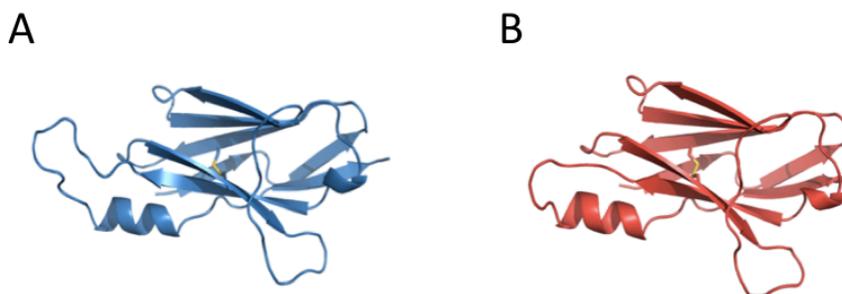


Figura 52. Estructura tridimensional de VS0-4 y VS1-20. A) Modelo tridimensional refinado de VS0-4, con un porcentaje de residuos en las regiones más favorecidas de 89.3%. B) Modelo tridimensional refinado de VS1-20 con un porcentaje de residuos en las regiones más favorecidas de 90.7% para VS1-20.

4.7.1 Docking, afinidad proteína-proteína y predicciones de superficie de interacción de los anticuerpos anti-VEGF

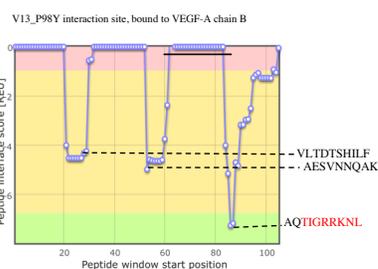
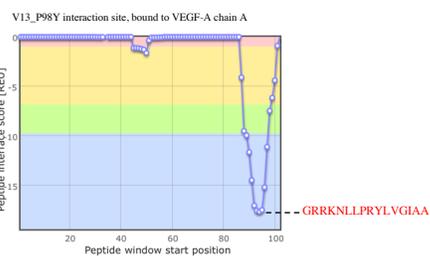
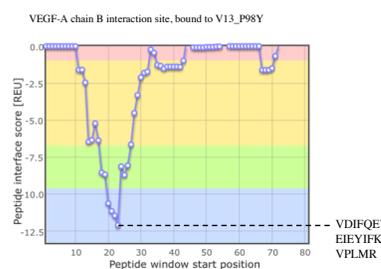
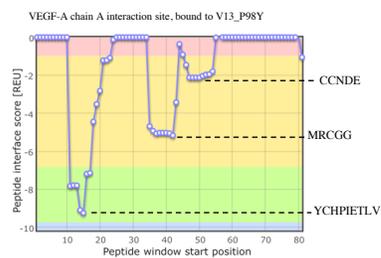
Para los análisis de acoplamiento se descargó la estructura de VEGF resuelta por cristalografía de rayos X, con una resolución de 2.5 Å, descrita por Muller *et al* (1998) con PDB ID 1VPF, del RCSB Protein Data Bank (Figura 5). Se generaron cuatro posibles interacciones entre los anticuerpos vNAR (V13_P98Y, VS0-4 y VS1-20) y VEGF, por análisis de interacción proteína-proteína, con la finalidad de identificar el complejo que explicara mejor la unión entre cada vNAR y VEGF. Se realizó un análisis comparativo de la energía de interacción de cada modelo (Tabla 10). En el modelo control V13_P98Y, se identificó una

puntuación de interacción -38.94 REU. El loop CDR3 de V13_P98Y tuvo la puntuación más alta de interacción en el complejo (Figura 53A, B). El complejo VS0-4/VEGF obtuvo una puntuación de interacción de -29.97 REU. Se identificó el sitio de interacción de VS0-4 con VEGF. El loop CDR3 está involucrado en la unión con la cadena A y B de VEGF (Figura 53C, D). El complejo VS1-20/VEGF obtuvo una puntuación de interacción de -39.62 REU. El loop CDR3 de este vNAR interactúa con la cadena B de VEGF (Figura 53E, F). De los modelos de interacción obtenidos *in silico*, VS1-20 sugiere la mejor interacción con VEGF.

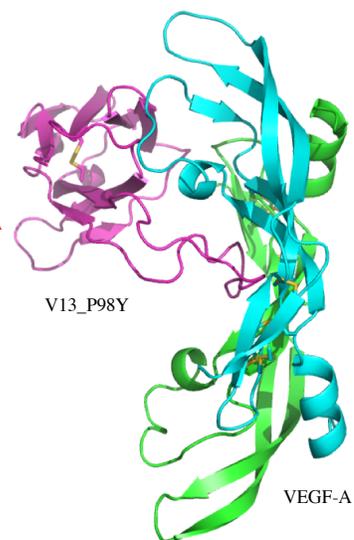
Tabla 10. Valores de interacción de los complejos vNAR/VEGF. Los aminoácidos del CDR3 que tienen el mayor contacto con la molécula de VEGF se muestran en rojo.

VNAR	Sitio de interacción, unido a la cadena A de VEGF	Sitio de interacción de la cadena A de VEGF	Sitio de interacción, unido a la cadena B de VEGF	Sitio de interacción de la cadena B de VEGF	Puntuación TOTAL (REU)
V13_P98Y	GRRKNLLPRYLVGIAA	YCHPIETLV	AQTIGRRKNL	VDIFQEYPDEIEYFKCVPLM	-38.94
VS0-4	RRKRGPLASLAAMM	SYCHPI	AAMMGSSDY	PDEIEYIFKP	-29.97
VS1-20	IGGRYVESVN	GCCNDEGLECVP	SPGGVDSFCCV	DIFQEYPDEIEY	-39.62

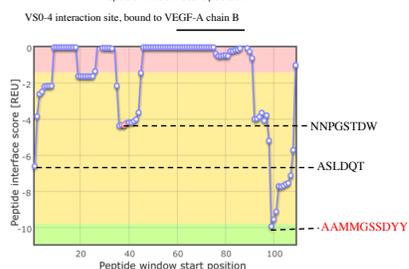
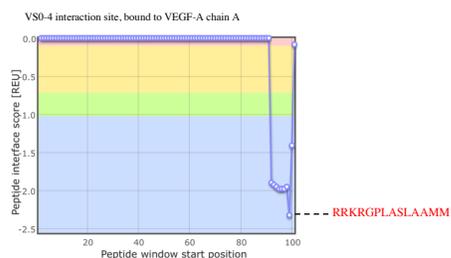
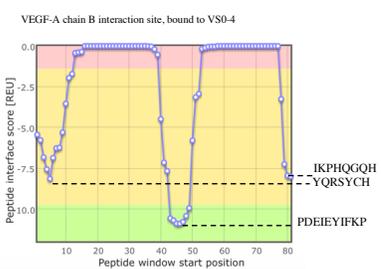
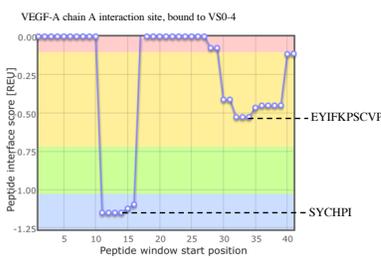
A



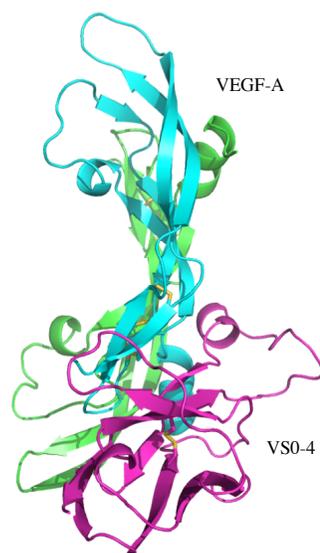
B



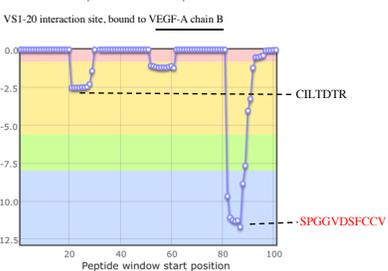
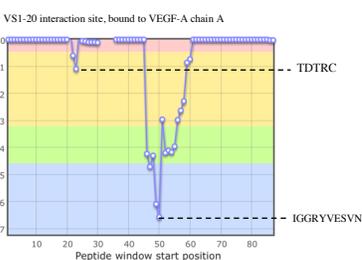
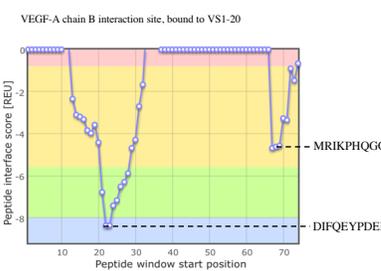
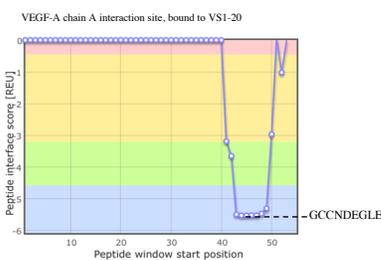
C



D



E



F

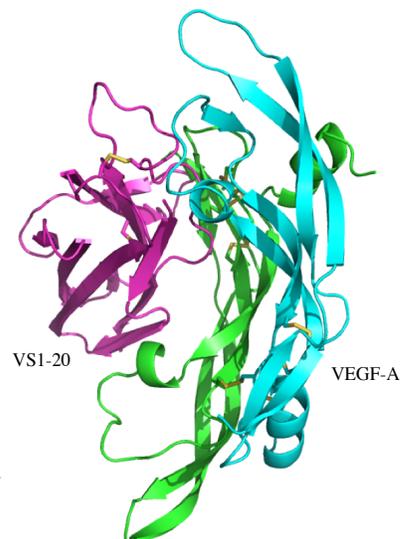


Figura 53. Análisis de interacción proteína-proteína en la herramienta web ClusPro y Peptiderive. A) Gráfico de las regiones de interacción del control positivo vNAR V13_P98Y con VEGF, en rojo se marca la secuencia del CDR3 del vNAR. B) Complejo V13_P98Y/VEGF, VNAR en magenta y VEGF en verde y cian. C) Trazado de los sitios de interacción de Peptiderive del complejo VS0-4/VEGF, en rojo la secuencia de CDR3 del vNAR. D) Complejo VS0-4/VEGF. E) Análisis peptiderive del complejo VS1-20/VEGF, indica en rojo la secuencia de interacción del CDR3 del vNAR con VEGF. F) complejo de VS1-20/VEGF-A.

4.7.2 Actividad de bloqueo de VS0-4 y V13_P98Y en la interacción VEGF / VS1-20

Debido a que el análisis *in silico* de la interacción proteína-proteína predijo que VS1-20 reconoce un epítipo muy cercano al de V13_P98Y pero distante al de VS0-4 en la molécula de VEGF (Figura 54), los resultados del análisis *in silico* fueron probados mediante un ELISA competitivo, para evaluar si VS1-20 y V13_P98Y tenían epítopos sobrepuestos y podían bloquear la unión del otro a VEGF. Los vNARs solubles VS0-4, V13_P98Y o VS1-20 fueron utilizados para unirse a VEGF y posteriormente se evaluó si el fago VS1-20 era capaz de reconocer un epítipo disponible en la molécula de VEGF, o si los vNARs solubles bloqueaban la interacción VEGF/fago VS1-20.

La figura 54 muestra los resultados de la reducción de señal para cada vNAR. Como control negativo se utilizó el vNAR no relacionado CV0-43. PBS se utilizó como control para representar el 100 % de unión. Cuando se comparó la reducción de señal de los vNARs solubles VS0-4, V13_P98Y y VS1-20 con el control PBS, VS1-20 mostró la mayor reducción de señal (~ 75% de reducción de unión) mientras que P98Y mostró ~ 65% de reducción de unión. Al evaluar VS0-4 se observó ~ 25% de reducción de señal. Menos de 5 % de reducción de señal se observó al evaluar el control negativo.

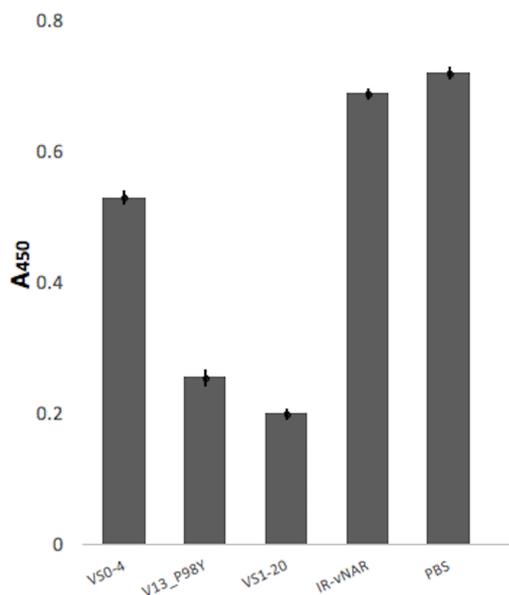


Figura 54. Capacidad de unión del fago VS1-20 a VEGF mediante ELISA competitivo. El fago VS1-20 se probó para reconocer a VEGF en un ELISA competitivo con VS0-4 soluble o V13_P98Y. Se utilizó VS1-20 soluble como control positivo. El vNAR no relacionado CVO-43 (IR-vNAR) se utilizó como control negativo. El control de PBS se utilizó para representar el 100% de unión. La unión de VS1-20 fue detectada con el anticuerpo anti-M13-HRP. Cuando se probó el fago VS1-20 para reconocer VEGF en el ensayo competitivo con VS1-20 soluble, V13_P98Y, VS0-4 e IR-vNAR, la reducción de señal osciló entre 75%, 65%, 25% y 5%, respectivamente, en comparación con el control de PBS. La mayor reducción de señal se detectó cuando se evaluó el VS1-20 soluble. A₄₅₀: Absorbancia a 450 nm.

4.8 Ensayos de actividad de los anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA

4.8.1 Evaluación del efecto antiangiogénico de VS0-4 y VS1-20 en un modelo de angiogénesis utilizando esferoides tridimensionales de células endoteliales

Se evaluó el efecto anti-angiogénico de los anticuerpos anti-VEGF aislados de bibliotecas sintéticas en un modelo tridimensional de esferoides de células endoteliales (EC), los cuales fueron estimulados con VEGF y tratados con los diferentes anticuerpos. Se cuantificó la longitud acumulativa de las ramificaciones después de 24 h de tratamiento. Se utilizaron como control positivo V13 y V13_P98Y, dos anticuerpos anti-VEGF, con efecto antiangiogénico previamente reportado (Camacho-Villegas *et al.*, 2018; Millán-Gómez *et al.*, 2018). La figura 55 muestra los resultados del ensayo de angiogénesis *in vitro*. VEGF (5 ng/mL) estimula fuertemente la formación de brotes de angiogénesis originados de esferoides de EC (hasta tres veces más longitud acumulativa de las ramificaciones que el control sin estímulo con VEGF (Figura 55 A,B, G)). Cuando

los esferoides estimulados con VEGF se trataron con los anticuerpos anti-VEGF: VS1-20, VS0-4, V13_P98Y y V13 se observó una inhibición significativa ($P < 0.001$) de las ramificaciones de los esferoides, en comparaciones a los esferoides que solo fueron tratados con VEGF (Figura 55C-G). El tratamiento con VS1-20 presentó la mayor inhibición de brotes de angiogénesis de los esferoides (hasta un 74% menos de longitud acumulativa de las ramificaciones que el control solo con el estímulo de VEGF).

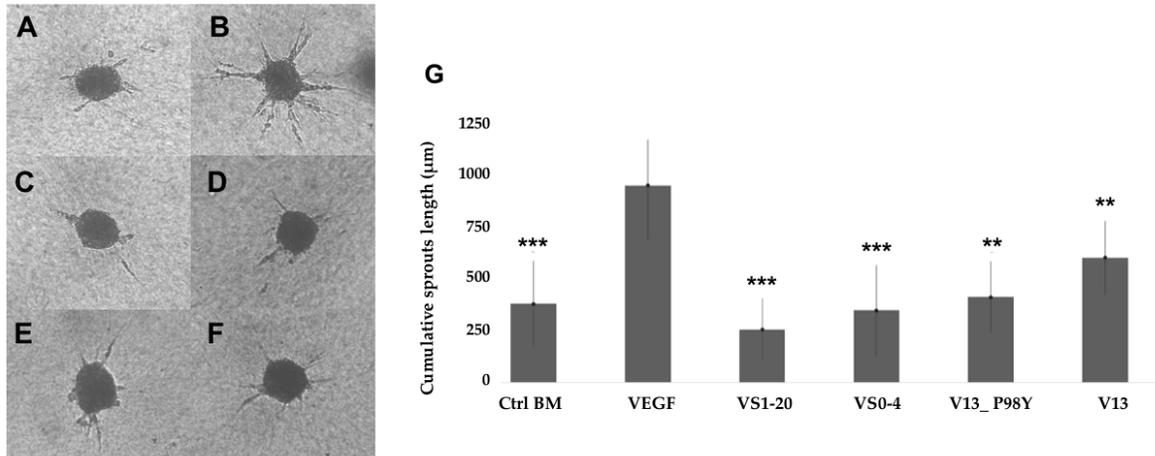


Figura 55. Ensayo de angiogénesis 3-Dimensional *in vitro* basado en esferoides de células endoteliales (EC) incluidas en gel de colágeno. Esferoides de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) se trataron con VEGF y anticuerpos anti-VEGF. La longitud de los brotes que se originaron a partir de los esferoides se cuantificó digitalmente como se describió anteriormente en los materiales y métodos. (A) Control BM; (B) EC + VEGF (C); EC + VEGF + VS1-20; (D) EC + VEGF + VS0-4; (E) EC + VEGF + V13_P98Y; (F) EC + VEGF + V13; (G) La longitud acumulada de los brotes tipo capilares se midió después de 24 h de incubación. Los esferoides de los controles negativos tienen una baja formación de brotes basales, que pueden ser fuertemente estimulados por VEGF exógeno (50 ng / ml) e inhibidos al tratar las células con anticuerpos vNAR anti-VEGF (10 µg en el tiempo 0 y 10 µg 4 horas después). Los brotes de angiogénesis se inhibieron principalmente cuando los esferoides se trataron con anticuerpos VS1-20 y VS0-4 aislados de las bibliotecas sintéticas ($P < 0.001$), en lugar de los tratamientos con los anticuerpos control V13 y V13_P98Y ($P < 0.01$). BM (medio basal).

4.8.2 Marcaje extracelular de CEA por Citometría de flujo con el anticuerpo CV0-43

Se cultivó la línea de cáncer de colon, HCT-116 (carcinoma colorrectal). La figura 56 muestra las células HCT-116 bajo un objetivo 10X.

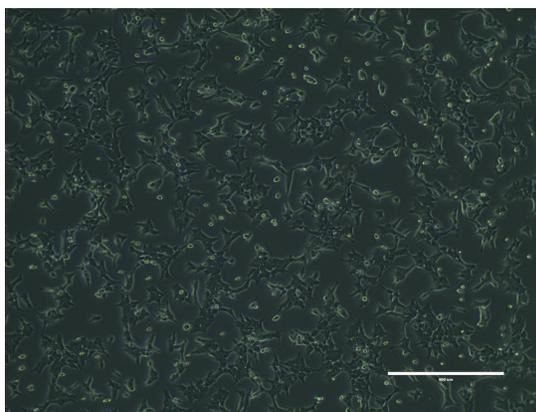


Figura 56. Morfología de las células HCT-116. Células HCT-116 en cultivo. Fotografía tomada con el microscopio invertido EVOS® XL Imaging System, bajo un objetivo 10X.

Al evaluar el anticuerpo anti-CEA CV0-43 en LAS líneas celulares HCT-116 y MDA-231 se observó un incremento en la intensidad media de fluorescencia (MFI) únicamente en las células de cáncer de colon HCT-116 que expresan CEA de manera constitutiva (figuras 57 y 58), alcanzando hasta 3 veces más que el control negativo (células + anti-HA-FITC) en la concentración de 5.0 μg , mientras que en las células de cáncer de mama (MDA-231) que no expresan CEA, el MFI se mantuvo sin cambios aparentes.

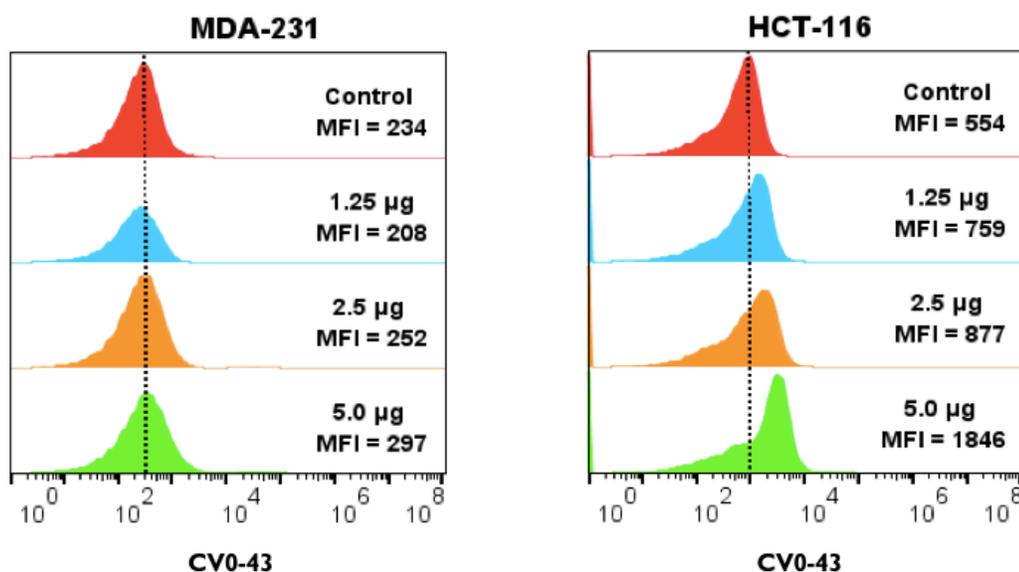


Figura 57. Histograma representativo de anti-CEA en dos líneas celulares. Células de cáncer de colon HCT-116 (CEA+) y cáncer de mama MDA-231 (CEA-) fueron teñidas con el anticuerpo anti-CEA, CV0-43 a tres concentraciones diferentes (1.25, 2.5 y 5 μg) y evaluado la intensidad media de fluorescencia (MFI). La línea punteada representa la media del control negativo el cual fue únicamente células con anticuerpo secundario (anti-HA-FITC).

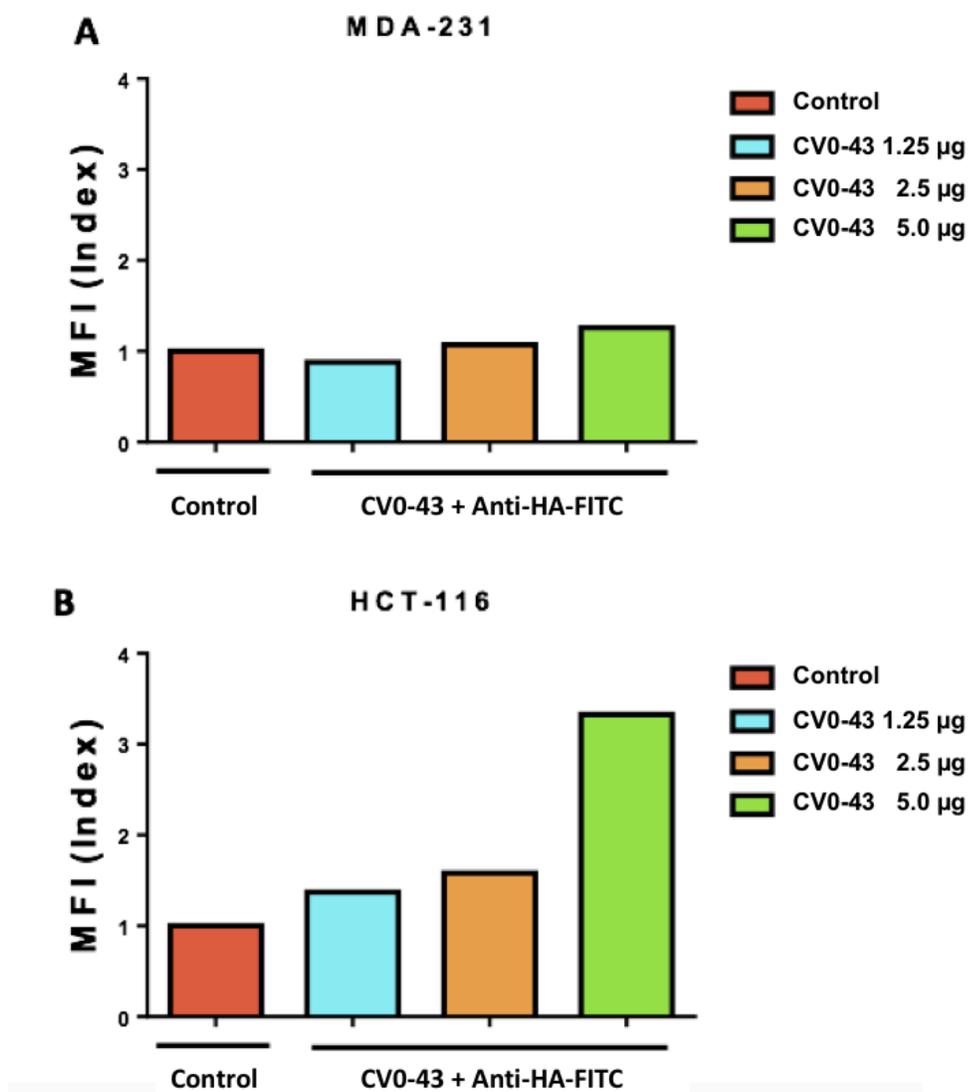


Figura 58. Índice de MFI. Índice de intensidad media de fluorescencia (MFI) en (A) células de cáncer de colon HCT-116 (CEA+) y (B) cáncer de mama MDA-231 (CEA-) teñidas con el anticuerpo anti-CEA, CV0-43 a tres concentraciones diferentes (1.25, 2.5 y 5 µg). Control negativo (Células + anti-HA-FITC). Se observó un incremento del MFI de hasta 3 veces más que el control negativo solo en las células de cáncer de colon HCT-116.

Capítulo 5. Discusión

Los anticuerpos de tiburón presentan características especiales que los vuelven atractivos como agentes terapéuticos y de diagnóstico, como tamaño pequeño, buena penetración en tejidos, CDR3 largo, así como buena solubilidad y estabilidad térmica y química (Fennell *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2013; Kovalenko *et al.*, 2013; Camacho-Villegas *et al.*, 2018). Se ha reportado que el sistema inmune de los tiburones ofrece una buena respuesta de anticuerpos contra diferentes proteínas de mamíferos, como: Tom 70, TNF α , factor activador de células B (BAFF), la proteína quinasa Ser/Thr Aurora-A, VEGF, entre otras (Nuttall *et al.*, 2003; Camacho-Villegas *et al.*, 2013; Häsler *et al.*, 2016; Ubah *et al.*, 2017; Camacho-Villegas *et al.*, 2018). Sin embargo, la respuesta de IgNARs de los tiburones, es un poco más lenta que el proceso similar observado en mamíferos, y la obtención de los anticuerpos deseados puede tardar hasta 6 meses (Kovaleva *et al.*, 2014). La construcción y uso de bibliotecas sintéticas de anticuerpos ha reducido el tiempo en que un anticuerpo puede ser aislado, debido a que evita los pasos de inmunización animal (Miersch *et al.*, 2012; Burgess *et al.*, 2016).

En este trabajo se presenta la construcción de tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos vNAR, utilizando marcos sin cisteínas, con una y dos cisteínas en la región CDR3, para reflejar el número de residuos de cisteínas que ocurren de manera natural en los diferentes tipos de anticuerpos vNAR (Shao *et al.*, 2007; Kovalenko *et al.*, 2013). Se diversificó sólo el CDR3 de los anticuerpos (conservando el número y posición de las cisteínas en esta región). El CDR3 es de especial interés ya que es el CDR que forma el mayor número de contactos con el antígeno, está localizado en el centro del sitio de unión a la molécula antigénica y es por mucho el “bucle” más diverso en longitud y secuencia de los CDRs (Almagro *et al.*, 2012). Se emplearon oligonucleótidos mutagénicos forward debido a que el vector fagémido utilizado, pComb3X, tiene un origen de replicación negativo.

Los tamaños obtenidos para las bibliotecas fueron de 1.8×10^9 , 6.7×10^9 y 5.7×10^{11} transformantes en total, para VS0, VS1 y VS2, respectivamente; el porcentaje de variabilidad fue de hasta 70%. La eficiencia de mutagénesis obtenida estuvo de acuerdo a lo esperado, considerando que la tecnología de mutagénesis de Kunkel ofrece eficiencias que van del 50-90 % (Firnberg & Ostermeier, 2012). Otros trabajos han reportado tamaños de bibliotecas sintéticas de dominios sencillos que van de 1×10^8 – 3×10^9 (Shao *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2014; Moutel *et al.*, 2016). Nuestras bibliotecas presentaron una buena diversidad con un repertorio moderado de recombinantes. Para mejorar la eficiencia de selección de las clonas obtenidas por la mutagénesis, las secuencias de los tres marcos se sintetizaron incluyendo tres codones de parada

(no ámbar) después de la cisteína canónica del FR3. Los oligonucleótidos mutagénicos fueron diseñados para eliminar estos tres codones de parada. Un alineamiento y extensión exitosas resulta en el despliegue correcto de la proteína en la superficie del fago. De esta manera, al cubrir una placa de ELISA con un anticuerpo contra la etiqueta HA que se encuentra en dirección forward de la secuencia del dominio vNAR, solo las clonas que despliegan un fago completo y funcional en el cual ha ocurrido mutagénesis de manera correcta, podrán ser identificadas utilizando un anticuerpo anti-M13-HRP. Bajo este principio, se evaluaron 92 clonas individuales seleccionadas al azar y porcentaje de funcionalidad obtenido, fue de aproximadamente 86 %. En conjunto, estos resultados confirman que dentro de las bibliotecas hay diversidad de secuencia con alta frecuencia de clonas funcionales.

La validación de la biblioteca se realizó seleccionando contra seis proteínas diferentes de mamífero (AQP1, VEGF, FGF-2, LIF, CEA y GYPA) y eritrocitos completos de gallina. La selección en todos los casos se realizó durante cuatro rondas, incrementando el rigor de selección durante cada una. Se aisló al menos un anticuerpo funcional contra cada antígeno probado al utilizar la biblioteca VS0. Para la biblioteca VS1 se obtuvieron anticuerpos funcionales contra VEGF y eritrocitos de gallina, adicionalmente, se obtuvieron algunos anticuerpos de esta biblioteca contra otros tres antígenos, sin embargo, no mostraron buena expresión o incorporaron codón de parada ámbar en su CDR3. Al utilizar la biblioteca VS2 durante la selección, no se obtuvo ningún anticuerpo funcional (sin codón de parada ámbar). Con el presente formato, la cepa de *E. coli* utilizada, inserta una glutamina (Gln) en lugar de detener la traducción, es necesario realizar más trabajo con todas las clonas aisladas de esta biblioteca, para determinar si son funcionales. Los vNARs con reconocimiento positivo a su antígeno diana se evaluaron para determinar su unión a TGF β , la molécula blanco de las clonas T1 y T20, utilizadas como marcos para las bibliotecas VS0 y VS1, respectivamente. Ninguno de los vNAR evaluados mostró una respuesta de unión positiva a TGF β , en comparación con la reactividad del mAb comercial ID11.16.8 utilizado como control positivo. Esto sugiere que no hay reactividad cruzada de los vNAR evaluados, con el antígeno de unión original de las clonas utilizados como marcos para las bibliotecas.

Durante la selección de las tres bibliotecas, se obtuvieron algunas secuencias de anticuerpo que incluían codón de parada ámbar en su CDR3. Como se mencionó, este codón es parcialmente suprimido en algunas cepas de *E. coli* como TG1 y ER2738 (Singaravelan *et al.*, 2010). Para acelerar la validación de las bibliotecas, se siguió trabajando con las clonas que no presentaban codón de parada ámbar. La utilización de pasos posteriores de sustitución de codón ámbar por Gln como: PCR con oligonucleótidos que modifiquen este codón o síntesis química de anticuerpos podría ser utilizada para evaluar más secuencias de anticuerpo.

Hasta este punto, la biblioteca VS0 del marco sin cisteínas en el CDR3 sugería los mejores resultados. El marco T1 utilizado para la construcción de esta biblioteca corresponde al vNAR de tipo IV, sin cisteínas en el CDR3 y con solo las dos cisteínas canónicas en el FR1 y FR3 (Kovalenko *et al.*, 2013; Barelle *et al.*, 2015). Para la construcción de la biblioteca VS1 se utilizó como marco un vNAR de tipo II (marco T20). La biblioteca VS1 también presentó buenos resultados de selección, pero se seleccionaron menos clonas que con la biblioteca VS0, no todos los anticuerpos pudieron ser evaluados debido a problemas de expresión, o la inserción de codón de parada ámbar.

La biblioteca VS2 fue la biblioteca de mayor tamaño, aunque poseía la menor diversidad (60%). Para la construcción de esta biblioteca se utilizó un marco con dos cisteínas en el CDR3, sin embargo, este marco no está en concordancia con los anticuerpos vNAR de tipo I, que han sido reportados solo para el tiburón nodriza (*G. cirratum*) (Streltsov *et al.*, 2004). Describimos a los anticuerpos con patrón de cisteínas similar al de TN16 y los proponemos como vNARs tipo V. Se aislaron solo 5 clonas al utilizar la biblioteca VS2, en todos los casos las secuencias incluyeron codón de parada ámbar. Los anticuerpos vNAR tienen alta frecuencia de aminoácidos polares y cargados en las regiones expuestas al solvente, que corresponde a la interfaz VH/VL de los anticuerpos convencionales, esto los hace altamente solubles en agua (Könning *et al.*, 2017). Sin embargo, La mutagénesis no previene la aparición de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, así como de cisteínas adicionales (Moutel *et al.*, 2016). Con esto, hipotetizamos que el hecho de tener el CDR3 más largo de las tres bibliotecas, con dos cisteínas invariables, más la posibilidad de la aparición de aminoácidos hidrofóbicos (y nuevos residuos de cisteína) que normalmente no están de manera natural en esta región, podría estar resultando en el plegamiento incorrecto de los dominios y quizás, esto podría explicar la falta de anticuerpos funcionales en esta biblioteca.

Al Qaraghuli y Ferro, 2016 evaluaron diferentes anticuerpos de dominio sencillo cristalizados en respuesta a varios antígenos. Estos anticuerpos incluían dominios vNAR de tipo I y II. Reportaron que cada tipo de vNAR contiene una conformación única del CDR3 (por ejemplo, vNAR tipo I plisado o vNAR tipo II extendido). El vNAR bien empaquetado de tipo I, podría permitir la penetración en los sitios activos de diferentes blancos, especialmente de enzimas. Con base en esto, podríamos suponer que la biblioteca VS2, que incluye dos cisteínas en el CDR3 como el vNAR tipo I, podría enfrentar antígenos con otras características estructurales a las evaluadas en este trabajo.

Los estudios del papel de residuos de cisteína en el CDR3 de fragmentos vNAR, durante la selección de bibliotecas de anticuerpos son aún escasos. Además, se han desarrollado algunas bibliotecas sintéticas de dominios sencillos que evitan intencionalmente la aparición de cisteínas dentro del CDR3 (Zielonka *et*

al., 2014; Moutel *et al.*, 2016; Könnig *et al.*, 2017). Nuestros resultados sugieren que los vNARs aislados de bibliotecas sintéticas que carecen de cisteínas en el CDR3, son más fácilmente seleccionados que aquellos vNAR con una o dos cisteínas en el CDR3, esto puede deberse a una topología más flexible y menos restricciones para el parátopo (Barelle *et al.*, 2015). Nuestros resultados sugieren también que tener un buen tamaño de biblioteca, no asegura el éxito de esta, como se muestra con los resultados de la biblioteca VS2.

Durante las selecciones con los diferentes antígenos, se aislaron varias clonas que incluían uno o más codones de parada ámbar en la región CDR3 aleatorizada. Hay 32 posibles combinaciones que se pueden formar con el codón NNK utilizado para diversificar el CDR3, estas incluyen los 20 aminoácidos y el codón de parada ámbar. Este codón de parada representa un 3 % de posibilidad de aparecer en cada posición del CDR3 de las bibliotecas. Estos CDR3 tienen una longitud de 22, 16 y 24 aminoácidos para VS0, VS1 y VS2, respectivamente. Las posibles combinaciones que se pueden formar al aleatorizar el CDR3, que incluyan este codón de parada, no necesariamente resultarán en anticuerpos funcionales o correctamente plegados. Sin embargo, cuando las bibliotecas se seleccionaron, fue común encontrar un número considerable de aglutinantes con el codón de parada ámbar en el CDR3. Como hemos mencionado, en cepas de *E. coli* como ER2738 utilizada durante el Panning en este trabajo, este codón es suprimido por una glutamina. La glutamina es un aminoácido de cadena lateral polar, que favorece la interacción con otros aminoácidos, que están cargados o son polares (Betts y Russell, 2003), mediante la formación de puentes de hidrógeno, generalmente está presente en la superficie de proteínas expuestas a un ambiente acuoso. Se conoce que los anticuerpos vNAR presentan una alta frecuencia de aminoácidos polares y cargados en las regiones expuestas al solvente (Könnig *et al.*, 2017). Por lo tanto, durante la selección, puede existir un enriquecimiento de las clonas que presentan el codón ámbar en la CDR3, lo que podría explicar la alta frecuencia de selección de aglutinantes con este codón.

Se seleccionaron los anticuerpos contra VEGF (VS0-4 y VS1-20) y CEA (CV0-43) para evaluar la actividad y función de los anticuerpos aislados de las bibliotecas sintéticas. Se realizó inmunodetección de los tres anticuerpos seleccionados y se expresaron en gran volumen. Las proteínas de interés presentaron el tamaño esperado de aproximadamente 15 kDa. Los niveles de expresión obtenidos fueron bajos con rendimientos alrededor de 0.25 mg/L. Otros estudios reportan niveles de expresión de anticuerpos vNAR recombinantes que van de 0.07 mg/L a 4 mg/L (Shao *et al.*, 2007; Camacho-Villegas *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). El vector pComb3X utilizado, es un fagémido y no un vector de expresión, por lo tanto, un cambio en este sistema podría resultar en rendimientos de expresión más altos. Se sabe también, que la eficiencia secretora de proteínas recombinantes es usualmente baja cuando se utilizan señales de secreción

(Hanagata *et al.*, 2014), como se observa en este trabajo. La expresión de proteínas recombinantes siempre es un reto y se deben evaluar diferentes condiciones con el objetivo de incrementar los niveles de expresión.

Para evaluar si los anticuerpos aislados de las bibliotecas sintéticas podrían rivalizar a los anticuerpos de una biblioteca inmune natural, se usaron los anticuerpos anti-VEGF (VS0-4 y VS1-20). El efecto antiangiogénico *in vitro* de VS0-4 y VS1-20 se comparó con el de dos vNAR anti-VEGF que fueron previamente reportados: V13, aislados de una biblioteca inmune natural (Camacho-Villegas *et al.*, 2018) y V13_P98Y, una versión mejorada de V13 que fue madurada *in silico* para incrementar la afinidad por su blanco (Millán-Gómez *et al.*, 2018). El efecto anti-angiogénico de los anticuerpos se midió en un ensayo de angiogénesis tridimensional *in vitro*, basado en esferoides de células endoteliales (EC), que imita la formación de brotes de angiogénesis *in vivo*, a través de la estimulación de las EC con VEGF (Korff & Augustin, 1999; Korff *et al.*, 2001). En este ensayo, las células endoteliales se cultivan en matrices de colágeno y metocel que estimulan la unión, la migración y rápida formación de túbulos por las EC, reflejando este evento *in vivo* (Staton *et al.*, 2004).

Los resultados del ensayo de angiogénesis *in vitro*, mostraron que la estimulación de las EC con VEGF, induce fuertemente la formación de brotes derivados de los esferoides. Estos brotes de angiogénesis fueron mayormente inhibidos al tratar los esferoides con los anticuerpos aislados de las bibliotecas sintéticas ($P < 0.001$), que al utilizar el tratamiento con los anticuerpos control V13 y V13_P98Y ($P < 0.01$). Los mejores resultados se obtuvieron con VS1-20, con un 74% menos de longitud acumulada de los brotes en comparación con el control sin tratamiento anti-VEGF. Se generó la estructura tridimensional de los anticuerpos anti-VEGF (VS0-4 y VS1-20) por modelado *in silico*. Los modelos tridimensionales refinados de los vNARs mostraron un porcentaje de residuos en las regiones más favorecidas de (A, B, L) de 89.3 % para VS0-4 y 90.7 % para VS1-20. Se espera que un modelo de buena calidad tenga arriba del 90 % de los residuos en las regiones más favorecidas (Wang y Zhang, 2013). El docking (acoplamiento), la afinidad proteína-proteína y las predicciones de interacción de superficie de los anticuerpos anti-VEGF sugirieron que VS1-20 y VS0-4 reconocen diferentes epítomos en la molécula objetivo y que VS1-20 tiene una mayor interacción con VEGF que VS0-4, e incluso que el anticuerpo control V13_P98Y, madurado *in silico* con un efecto anti-angiogénico *in vitro* e *in vivo* previamente reportado (Millán-Gómez *et al.*, 2018). Los resultados del análisis *in silico* fueron corroborados por ELISA competitivo, para evaluar si VS1-20 y V13_P98Y tienen un epítomo superpuesto y podrían bloquear la unión entre sí a VEGF. Cuando se probó el fago VS1-20 para reconocer VEGF en ELISA competitivo con VS0-4 o V13_P98Y soluble, se observó una reducción de señal del 25% y 65%, respectivamente. Como se esperaba, al evaluar VS1-20 soluble, se

observó la mayor reducción de señal, ya que se une al mismo sitio que el fago VS1-20. Se observó una reducción de señal menor al 5% al evaluar el control negativo (CV0-43). Los resultados de la actividad de bloqueo fueron similares para V13_P98Y y VS1-20 (65% y 75%, respectivamente). Estos resultados sugieren que VS1-20 y V13_P98Y tienen epítomos muy cercanos o superpuestos, que podrían bloquear la unión del otro a la molécula de VEGF. Estos resultados concuerdan con nuestra observación *in silico*.

El anticuerpo anti-CEA, CV0-43, fue capaz de reconocer a CEA soluble y en la superficie de células de cáncer de colon. El CEA es un blanco atractivo para propósitos inmunoterapéuticos debido a su perfil de expresión, su papel en la progresión tumoral y su inmunogenicidad. Se conoce que los anticuerpos vNAR presentan una rápida eliminación de sangre, una buena penetración en tejidos y baja inmunogenicidad, esto vuelve a CV0-43 una opción potencial como agente de detección de CEA en el suero y tumores sólidos de cáncer de colon para la práctica clínica.

Adicional a las bibliotecas sintéticas que se construyeron como objetivo principal de este trabajo, reportamos también la existencia de un tipo de vNAR con un patrón de cisteínas diferente al de todos los tipos de vNAR reportados previamente. Diferentes clonas de este nuevo tipo de vNAR han sido aisladas al menos 10 veces en nuestro grupo de trabajo, a partir del repertorio inmune natural de nuestro tiburón modelo *H. francisci*. Los vNARs, que proponemos como tipo V son similares al tipo I, con un par de cisteínas en el CDR3, sin embargo, no presentan cisteínas no-canónicas en el FR2 y FR4 que son características del tipo I (Streltsov *et al.*, 2004; Kovalenko *et al.*, 2013), en su lugar, poseen un par de cisteínas no canónicas en el CDR1 (posición 29 y 32). El loop CDR3 de los anticuerpos correspondientes a este grupo, ha mostrado longitudes de hasta 24 residuos de aminoácidos (con una longitud promedio de 16 aminoácidos). Se requieren más estudios para elucidar el arreglo de enlaces disulfuro del tipo V de vNARs propuesto.

En resumen, en este trabajo se construyeron tres bibliotecas sintéticas de anticuerpos vNAR y se obtuvieron mejores resultados de selección al utilizar la biblioteca construida a partir de marco sin cisteínas en el CDR3. Esto podría sugerir que el uso de marcos vNAR sin cisteínas en el CDR3 podría incrementar el aislamiento de anticuerpos funcionales de las bibliotecas sintéticas. Además, los resultados de los ensayos de angiogénesis *in vitro* con los anticuerpos anti-VEGF sugieren que los anticuerpos aislados de bibliotecas sintéticas pueden rivalizar a los anticuerpos aislados de bibliotecas inmunes naturales e incluso a los anticuerpos cuya afinidad ha sido mejorada a través de modelado *in silico*.

Capítulo 6. Conclusiones

Se construyeron tres bibliotecas sintéticas nombradas VS0, VS1 y VS2, con tamaños de 1.2×10^9 , 4×10^9 y 3.4×10^{11} ; y porcentaje de diversidad de 70, 60 y 60%, respectivamente. La construcción fue exitosa con base en el tamaño y diversidad reportados en la bibliografía, como adecuados para bibliotecas sintéticas.

Con la biblioteca VS0 se aisló al menos un anticuerpo con reconocimiento contra todos los antígenos evaluados. Con VS1 se obtuvo un anticuerpo con reconocimiento contra dos de los antígenos evaluados, mientras que con VS2 no se aislaron clonas sin codón de parada ámbar en el CDR3. Estos resultados sugieren que es más difícil aislar clonas funcionales al incrementar el número de cisteínas en el CDR3 de anticuerpos vNAR de bibliotecas sintéticas.

Los anticuerpos vNAR anti-VEGF: VS0-4 y VS1-20 son capaces de inhibir la angiogénesis *in vitro*, en un modelo de esferoides tridimensionales y pueden rivalizar a anticuerpos aislados de bibliotecas inmunes o mejorados por modelado *in silico*, para los cuales se ha reportado previamente un efecto anti-angiogénico *in vitro* e *in vivo* (Camacho-Villegas *et al.*, 2018; Millán-Gómez *et al.*, 2018). Los resultados de los ensayos de angiogénesis *in vitro* coinciden con los resultados obtenidos en los experimentos *in silico*, al evaluar los complejos VEGF/vNAR, donde se sugiere que VS1-20 tiene mejor reconocimiento por su blanco.

El anticuerpo vNAR anti-CEA, CV0-43 es capaz de reconocer a CEA soluble y en la superficie de células de cáncer de colon, HCT-116.

6.1 Perspectivas

- Medir la afinidad de unión de los anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA por sus blancos y compararlas con las de anticuerpos comercialmente disponibles contra estos antígenos.
- Evaluar toxicidad y farmacocinética de los anticuerpos anti-VEGF y anti-CEA.

- Hacer una búsqueda del vNAR tipo V en el transcriptoma y/o proteoma de tiburones *H. francisi*, para confirmar y completar el reporte de este tipo de vNAR en el repertorio inmune del tiburón cornudo.

Literatura citada

- Abbas, A.K., Litchman A.H., Pillaj, S. 2008. Inmunología celular y molecular. (6ta ed.) Elsevier Saunders.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Essential Cell Biology*. (5ta ed.) Gerald Science.
- Almagro, J.C., Fransson, J. 2008. Humanization of antibodies. *Frontiers in Bioscience*, 13, 1619-1633.
- Almagro, J.C., Raghunathan, G., Beil, E., Janecki, D.J., Chen, Q., Dinh T., LaCombe, A., Connor, J., Ware, M., Kim, P.H., Swanson, R.V., Fransson, J. 2012. Characterization of a high-affinity human antibody with a disulfide bridge in the third complementarity-determining region of the heavy chain. *Journal of molecular recognition*, 25, 125-135.
- Al Qaraghuli, M.M., Ferro, V.L. 2016. Analysis of the binding loops configuration and surface adaptation of different crystallized single-domain antibodies in response to various antigens. *Journal of Molecular Recognition*, 30, 2592.
- Ayat, H., Burrone, O.R., Sadghizadeh, M., Jahanzad, E., Rastgou, N., Moghadasi, S., Arbabi, M. 2013. Isolation of scFv antibody fragments against HER2 and CEA tumor antigens from combinatorial antibody libraries derived from cancer patients. *Biologicals*, 41, 345-354.
- Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. 2001. Phage display: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbo: New York, NY, USA.
- Barelle, C., Gill, D.S., Charlton, K. 2013. Shark novel antigen receptors--the next generation of biologic therapeutics?. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 655, 49-62.
- Barelle, C.J., Kolmar, H., Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Doreen, K. 2015. Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *mAbs*, 7, 15-25.
- 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, 240-258
- Benhar, I. 2007. Design of synthetic antibody libraries. *Expert Opinion on Biological Therapy, Informa Healthcare*, 7(5), 763-779.
- Betts, M.J., Russell, R.B. 2003. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinformatics for Geneticists*. Edited by Barnes, M.R., Gray, I.C. Copyright 2003 John Wiley & Sons, Ltd, Chaper 14, 289-316.
- Burgess, S.G., Oleksy, A., Cavazza, T., Richards, W., Vernos, I., Matthews, D., Bayliss, R., Bayliss, R. 2016. Allosteric inhibition of Aurora-A kinase by a synthetic vNAR domain. *Open Biology*, 6, 160089.
- 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, 80-85.
- Camacho-Villegas, T., Mata-González, M., García-Ubbelohd, W., Núñez-García, L., Elosua, C., Paniagua-Solis, J., Licea-Navarro, A. 2018. Intraocular Penetration of a vNAR: In Vivo and In Vitro VEGF165 Neutralization. *Maine Drugs*, 16, 113.

- Chen, J.J., Ebmeier, S.E., Sutherland, W.M., Ghazi, N.G. 2011. Potential penetration of topical ranibizumab (Lucentis) in the rabbit eye. *Eye*, 25, 1504–1511.
- Chen, G., Sidhu, S.S. 2014. Design and Generation of Synthetic Antibody Libraries for Phage Display. *Methods in Molecular Biology*, 1131, 113-131.
- Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., Camacho, C.J. 2004. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32, 96–99.
- Conrath, K.E., Wernery, U., Muyldermans, S., Nguyen, V.K. 2003. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Developmental & Comparative Immunology*, 27, 87-103.
- Diaz, M., Stanfield, R.L., Greenberg, A.S., Flajnik, M.F. 2002. Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development. *Immunogenetics*, 54, 501-512.
- Dooley, H., Flajnik, M.F., Porter, A.J. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular Immunology*, 40: 25–33.
- Ellerin, T., Rubin, R.H., Weinblatt, M.E. 2003. Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor α Therapy. *Arthritis & Rheumatism*, 48(11), 3013-3022.
- Erb, D.A., Nabi, H.A. 2000. Clinical and Technical Considerations for Imaging Colorectal Cancers with Technetium-99m-Labeled AntiCEA Fab Fragment. *Journal of nuclear medicine technology*, 28, 12-18.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., Sali, A. 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. Current Protocols in Protein Science. Editorial board, John E Coligan. Chapter 2:, Unit 2.9.
- Falavarjani, K.G., Nguyen, Q.D. 2013 Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: A review of literature. *Eye*, 27, 787–789.
- Fennell, B.J., Darmanin-Sheehan, A., Hufton, S.E., Calabro, V., Wu, L., Müller, M.R., Cao, W., Gill, D., Cunningham, O., Finlay, W.J.J. 2010. Dissection of the IgNAR V Domain: Molecular Scanning and Orthologue Database Mining Define Novel IgNAR Hallmarks and Affinity Maturation Mechanisms. *The Journal of Molecular Biology*, 400, 155-170.
- Ferrara, N. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*, 25:4, 581–611.
- Ferrara, N., Kerbel, R.S. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *NATURE*, 438, 967-974.
- Finlay, W.J.J., Almagro, J.C. 2012. Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery. *Frontiers in Immunology*, 3(342), 1-18.
- Firnberg, E., Ostermeier, M. 2012. PFunkel: Efficient, Expansive, User-Defined Mutagenesis. *PLoS One*, 7, 1-10.

- Garambois, V., Glaussel, F., Foulquier, E., Ychou, M., Pugnère, M., Luo, R.X., Bezabeh, B., Pèlegri, A. 2004. Fully human IgG and IgM antibodies directed against the carcinoembryonic antigen (CEA) Gold 4 epitope and designed for radioimmunotherapy (RIT) of colorectal cancers. *BMC cancer*, 4, 75.
- Goodchild, S.A., Dooley, H., Schoepp, R.J., Flajnik, M., Lonsdale, S.G. 2011. Isolation and characterisation of Ebolavirus-specific recombinant antibody fragments from murine and shark immune libraries. *Molecular Immunology*, 48: 2027–2037.
- Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., Flajnik, M.F. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 374, 168-73.
- Griffiths, K., Dolezal, O., Parisi, K., Angerosa, J., Dogovski, C., Barraclough, M., Sanalla, A., Casey, J., González, I., Perugini, M., Nuttall, S., Foley, M. 2013. Shark Variable New Antigen Receptor (VNAR) Single Domain Antibody Fragments: Stability and Diagnostic Applications. *Antibodies*, 2, 66-81.
- Guangqi, E., Cao, Y., Bhattacharya S., Dutta, S., Wang, E., Mukhopadhyay, D. 2011. Endogenous Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Maintains Endothelial Cell Homeostasis by Regulating VEGF Receptor-2 Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 287:5, 3029–3041.
- Hagemeier, C. 1994. Site-Directed Mutagenesis Using a Uracil-Containing Phagemid Template. *Methods in Molecular Biology*, 31: 67-77.
- Hanagata, H., Mizukami, M., Miyauchi, A. 2014. Efficient Expression of Antibody Fragments with the Brevibacillus Expression System. *Antibodies*, 242-252.
- Hartmann, C., Müller, N., Blaukat, A., Koch., J., Benhar, I., Wels, W.S. 2010. Peptide mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-EGFR immune response. *Oncogene*, 29, 4517–4527.
- Häsler, J., Flajnik, M.F., Williams, G., Walsh, F.S., Rutkowski, J.L. 2016. VNAR single-domain antibodies specific for BAFF inhibit B cell development by molecular mimicry. *Molecular Immunology*, 75, 28-37.
- Heckman, K.L., Pease, L.R. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature protocols*, 2(4), 924-932.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Holliger, P., Hudson, P.J. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23, 1126-1136.
- Huang, R., Fang, P., Kay, B.K. 2012. Improvements to the Kunkel mutagenesis protocol for constructing primary and secondary phage-display libraries. *Methods*, 58(1), 10-17.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 33–38.
- Imakiire, T., Kuroki, M., Shibaguchi, H., Abe, H., Yamauchi, Y., Ueno, A., Hirose, Y., Yamada, H., Yamashita, Y., Shirakusa, T., Ishida, I., Kuroki, M. 2004. Generation, Immunologic Characterization And

- Antitumor Effects Of Human Monoclonal Antibodies For Carcinoembryonic Antigen. *The International Journal of Cancer*, 108, 564–570.
- Jaki, M.P., Zaletel, B.P. 2018. Outcome of 5-Year Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration With Intravitreal Anti-VEGF Using “Treat and Extend” Regimen. *Frontier in Medicine*, 5:125.
- Jaye, D.L., Geigerman, C.M., Fuller, R.E., Akyildiz, A., Parkos, C.A. 2004. Direct fluorochrome labeling of phage display library clones for studying binding specificities: applications in flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of Immunological Methods*, 295, 119-127.
- Kaplon, H., Reichert, J.M. 2018 Antibodies to watch in 2018. *mAbs*, 10:2, 183-203
- Könning, D., Zielonka, S., Grzeschik, J., Empting, M., Valldorf, B., Krah, S., Schröter, C., Sellmann, C., Hock, B., Kolmar, H. 2017. Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology*, 45, 10-16.
- Kovalenko, O.V, Olland, A., Piché-Nicholas, N., Godbole, A., King, D., Svenson, K., Calabro, V., Müller, M.R., Barelle, C. J., Somers, W., Gill, D.S., Mosyak, L., Tchistiakova, L. 2013. Atypical Antigen Recognition Mode of a Shark Immunoglobulin New Antigen Receptor (IgNAR) Variable Domain Characterized by Humanization and Structural Analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 17408-17419.
- 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*, 14, 1527-1539.
- Kovaleva, M., Johnson, K., Steven, J., Barelle, C.J., Porter, A. 2017. Therapeutic Potential of Shark Anti-ICOSL VNAR Domains is Exemplified in a Murine Model of Autoimmune Non-Infectious Uveitis. *Frontier in Immunology*, 8, 1121.
- Korff, T. 2004. Three-dimensional in vitro angiogenesis assays. *Methods in endothelial cell biology*. 1st Edition; Springer Verlag Berlin Heidelberg, 115–24.
- Korff, T., Augustin, H.G. 1999. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *Journal of Cell Science*, 112, 3249-3258.
- Korff, T., Kimmina, S., Martiny-Baron, G., Augustin, H.G. 2001. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *The FASEB Journal*, 15, 447-457.
- Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 88-92.
- Matz, H., Dooley, H. 2019 Shark IgNAR-derived binding domains as potential diagnostic and therapeutic agents. *Developmental & Comparative Immunology*, 90, 100–107.
- Morera, Y., Bequet-Romero, M., Ayala, M., Lamdan, H., Agger, E.M., Andersen, P., Gavilondo, J.V. (2008). Anti-tumoral effect of active immunotherapy in C57BL/6 mice using a recombinant human VEGF protein as antigen and three chemically unrelated adjuvants. *Angiogenesis*, 11:381–393.

- Moutel, S., Bery, N., Bernard, V., Keller, L., Lemesre, E., De Marco, A., Ligat, L., Rain, J.C., Favre, G., Olichon, A., Perez, F. 2016. NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *Elife*, 5, 1-31.
- Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., de Vos, A.M. 1997. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 7192-7197.
- Müller, M.R., Saunders, K., Grace, C., Jin, M., Piche-Nicholas, N., Steven, J., O'Dwyer, R., Wu, L., Khetemenee, L., Vugmeyster, Y., Hickling, T.P., Tchistiakova, L., Olland, S., Gill, D., Jensen, A., Barelle, C.J. 2012. Improving the pharmacokinetic properties of biologics by fusion to an anti- HSA shark VNAR domain. *MAbs*, 4:673.
- Nguyen, D., Luo, J., Zhang, K., Zhang, M. 2013. Current therapeutic approaches in neovascular age-related macular degeneration. *Discovery Medicine*, 15, 343–348.
- Liu, J.L., Anderson, G.P., Delehanty, J.B., Baumann, R., Hayhurst, A., Goldman, E.R. 2007. Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library. *Molecular Immunology*, 44: 1775–1783.
- Liu, J.L., Anderson, G.P., Goldman, E.R. 2007b. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library. *BMC Biotechnology*, 7:78.
- Liu, J.L., Zabetakis, D., Brown, J.C., Anderson, G.P., Goldman, E.R. 2014. Thermal stability and refolding capability of shark derived single domain antibodies. *Molecular Immunology*, 59, 194-199.
- London, N., Raveh, B., Movshovitz-Attias, D., Schueler-Furman, O. 2010. Can self-inhibitory peptides be derived from the interfaces of globular protein-protein interactions?. *Proteins*, 78, 3140-49.
- Lyskov, S., Chou, F.C., Conchúir, S.Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B.D., Renfrew, P.D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J.J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J.J., Das, R. 2013. Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE). *PLoS One*, 8, 1-11.
- Millán-Gómez, D., Dueñas, S., Muñoz, P.L.A., Camacho-Vilegas, T., Elosua, C., Cabanillas-Bernal, O., Escalante, T., Abia, D., Drescher, F., Fournier, P.G.J., Ramos, M.A., Mares, R.E., Paniagua-Solis, J., Mata-Gonzalez, T., Gonzalez-Canudas, J., Hoffman, R.M., Licea-Navarro, A., Sánchez-Campos, N. 2018. In silico-designed mutations increase variable new-antigen receptor single-domain antibodies for VEGF 165 neutralization. *Oncotarget*, 9, 28016–28029.
- Muller, Y.A., Chen, Y., Christinger, H.W., Li, B., Cunningham, B.C., Lowman, H.B., de Vos, A.M. 1998. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure*, 6(9), 1153-1167.
- Nelson, B., Sidhu, S. S. 2012. Synthetic Antibody Libraries. *Therapeutic Proteins: Methods in Molecular Biology*, 899, 27-41.
- Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Nathanielsz, A., Ally, N., Pike, R.N., Hudson, P.J., Kortt, A.A., Irving, R.A. 2002. A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS*, 516, 80–86.

- Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Hattarki, M., Carmichael, J.A., Irving, R.A., Hudson, P.J. 2003. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *European Journal of Biochemistry*, 270, 3543-3554.
- Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Hattarki, M., De Gori, R., Irving, R.A., Hudson, P.J. 2001 Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Molecular Immunology*; 38, 313–326.
- McCafferty, J., Griffiths A.D., Winter, G., Chiswell, D.J. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552-554.
- Miersch, S., Sidhu, S.S. 2012. Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations. *Methods*, 57, 486-498.
- Pavoni, E., Flego, M., Dupuis, M.L., Barca, S., Petronzelli, F., Anastasi, A.M., D'Alessio, V., Pelliccia, A., Vaccaro, P., Monteriù, G., Ascione, A., De Santis, R., Felici, F., Cianfriglia, M., Minenkova, O. 2006. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC cancer*, 6, 41.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26, 1781–1802.
- Rajan, S., Sidhu, S.S. 2012. Simplified synthetic antibody libraries. *Methods in Enzymology*, 502, 3-23.
- Rouet, R., Dudgeon, K., Christ, D. 2012. Generation of Human Single Domain Antibody Repertoires by Kunkel Mutagenesis. *Methods in Molecular Biology*, 907, 195-209.
- Roux, K.H., Greenberg, A.S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., Mckinney, E.C., Flajnik, M.F. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Immunology, Evolution*, 95, 11804-11809.
- Saerens, D., Ghassabeh, G.H., Muyldermans, S. 2008. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 600-608.
- Sánchez, R.J., Morera, D.Y., Musacchio, L.A., Bequet-Romero, M., Muñoz, P.Y., Pérez, S.L., Hernández-Bernal, F., Mendoza, F.O., Selman-Housein, K.H., Gavidondo, C.J.V., Ayala, A.M. 2016. Indirect and competitive enzyme-linked immunosorbent assays for monitoring the humoral response against human VEGF. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 37:6, 636-658.
- Santos, M.L.d., Quintilio, W., Manieri, T.M., Tsuruta, L.R., Moro, A.M. 2018. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, e01007.
- Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S., Schueler-Furman, O. 2016. Peptidic server: derive peptide inhibitors from protein–protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 44, 536-541.
- Shao, C.Y., Secombes, C.J., Porter, A.J. 2007. Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library. *Molecular Immunology*, 44, 656-665.

- Singaravelan, B., Roshini, B.R., Munavar, M.H. 2010. Evidence that the supE44 mutation of Escherichia coli is an amber suppressor allele of glnX and that it also suppresses ochre and opal nonsense mutations. *Journal of Bacteriology*, 192, 6039-6044.
- Smith, G.P., Petrenko V.A. 1997. *Phage Display. Chemical Reviews*. 97(2), 391-410.
- Staton, C.A., Stribbling, S.M., Tazzyman, S., Hughes, R., Brown, N.J., Lewis, C.E. 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*, 85, 233-248.
- Streltsov, V., Varghese, J., Carmichael, J., Irving, R., Hudson, P., Nutall, S. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from cell-surface receptor. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12444-12449.
- Thomas, V.A., Balthasar, J.P. 2016. Sorafenib Decreases Tumor Exposure to an Anti-carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *The AAPS Journal*, 18:4, 923-932.
- Ubah, O.C., Steven, J., Kovaleva, M., Ferguson, L., Barelle, C., Porter, A.J.R., Barelle, C.J. 2017. Novel, anti-hTNF- α variable new antigen receptor formats with enhanced neutralizing potency and multifunctionality, generated for therapeutic development. *Frontiers in Immunology*, 8, 1780.
- Wang, X., Zhang, B. 2013. customProDB: an R package to generate customized protein databases from RNA-Seq data for proteomics search. *Bioinformatics*, 29, 3235-3237.
- Wegener, W.A., Petrelli, N., Serafini, A., Goldenberg, D.M. 2000. Safety and Efficacy of Arcitumomab Imaging in Colorectal Cancer After Repeated Administration. *The journal of nuclear medicine*, 41:6, 1016-1020.
- Yan, J., Li, G., Hu, Y., Ou, W., Wan, Y. 2014. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *Journal of Translational Medicine*, 12, 1-12.
- Yu, L., Liang, X.H., Ferrara, N. 2011. Comparing protein VEGF inhibitors: *In vitro* biological studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408, 276–281.
- Zielonka, S., Weber, N., Becker, S., Doerner, A., Christmann, A., Christmann, C., Uth, C., Fritz, J., Schäfer, E., Steinmann, B., Empting, M., Ockelmann, P., Lierz, M., Kolmar, H. 2014. Shark Attack : High affinity binding proteins derived from shark vNAR domains by stepwise *in vitro* affinity maturation. *Journal of Biotechnology*, 191, 236–245.
- Zoller, M.J., Smith, M. 1987. Oligonucleotide-Directed Mutagenesis: A Simple Method using Two Oligonucleotide Primers and a Single-Stranded ADN Template. *Methods in enzymology*, 154: 329-350.