

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



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

**Obtención y caracterización de anticuerpos tipo vNAR
neutralizantes del receptor soluble de la citocina IL-6 y la
citocina IL-1 β humanas**

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

Presenta:

Daniela Alejandra Walter Sánchez

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Daniela Alejandra Walter Sánchez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dra. Olivia Cabanillas Bernal

Dra. Nadia Lizeth Caram Salas



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Denisse Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Daniela Alejandra Walter Sánchez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Obtención y caracterización de anticuerpos tipo vNAR neutralizantes del receptor soluble de la citocina IL-6 y la citocina IL-1 β humanas

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

El síndrome de liberación de citocinas (CRS) es una patología severa derivada de una respuesta inflamatoria sistémica exacerbada, y es inducido por medicamentos, inmunoterapias e infecciones virales graves. La interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 1 β (IL-1 β) son citocinas proinflamatorias asociadas al desarrollo del CRS, por lo que son consideradas como blanco terapéutico para tratamientos contra la inflamación. En este proyecto de tesis, se propuso el uso de fragmentos de anticuerpos tipo vNAR por su tamaño reducido, gran afinidad por su antígeno y su capacidad de penetración en los tejidos lo que los hacen una plataforma biológica ideal para contribuir con el desarrollo de tratamientos para la neutralización de moléculas como las citocinas mencionadas. Se obtuvo el vNAR W1 β 6 en un estado desnaturalizado, pero del cual se pudo obtener una fracción renaturalizada mediante el método de *On column refolding* y presentó capacidad de reconocimiento por la citocina IL-1 β mediante ELISA. Para el receptor soluble de la IL-6 se obtuvieron siete vNARs que reconocen al complejo del receptor de la IL6 con su citocina (IL6R/IL6) mediante ELISA. De los anteriores se eligieron los vNARs candidatos IL6R-8 e IL6R-16 para determinar su capacidad de reconocimiento a diferentes concentraciones del antígeno, siendo IL6R-8 el que presentó una mejor capacidad de reconocimiento a la cantidad más baja de antígeno (7.8 ng). En el ensayo de neutralización del complejo IL6R/IL6, el vNAR V13 no detectó los niveles de producción de VEGF inducidos por el complejo en la línea celular epitelial C33A, al encontrarse por debajo de su límite de detección. Se obtuvieron tres anticuerpos con potencial de neutralización para las dos citocinas de interés en este trabajo. Por lo tanto, es necesario evaluar la capacidad neutralizante de los vNARs W1 β 6, IL6R-8 e IL6R-16 realizando los ensayos *in vitro* mediante la inmunodetección de la proteína STAT3 fosforilada y la detección de VEGF con un anticuerpo comercial anti-VEGF.

Palabras clave: interleucina-6, interleucina-1 β , inflamación, dominios variables del nuevo receptor de antígeno (vNAR), inmunoterapéutico.

Abstract of the thesis presented by **Daniela Alejandra Walter Sánchez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Obtention and characterization of vNAR-type neutralizing antibodies of the soluble human receptor of IL6 and IL-1B cytokines

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

Cytokine release syndrome (CRS) is a severe pathology derived from an exacerbated systemic inflammatory response, and it is induced by drugs, immunotherapies and serious viral infections. Interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 β (IL-1 β) are pro-inflammatory cytokines associated with the development of CRS, which is why they have been considered as therapeutic targets for treatments against inflammation. In this thesis project, the use of vNAR type antibodies was proposed due to their reduced size, their great affinity and their ability to penetrate deep tissue, makes them a great biological platform to develop treatments for the neutralization of molecules such as cytokines. One vNAR type antibody W1 β 6 was obtained in a denaturated state, a fraction of this antibody was renaturated by the *On column refolding* strategy and it showed recognition of IL-1 β by ELISA. For the second antigen; the soluble receptor of IL-6 (IL6R/IL6), seven vNAR type antibodies were obtained that showed recognition of IL6R/IL6 by ELISA. Two vNAR candidates were chosen to determine their ability to recognize the IL6R/IL6 complex at different concentrations. These were the vNAR expressed by the clone 8 (IL6R-8) and the clone 16 (IL6R-16). The vNAR IL6R-8 showed the best recognition capacity at the lowest quantity of antigen tested (7.8 ng). On the other hand, for the *in vitro* neutralization assay of IL6R/IL6 complex, the V13 vNAR was not able to detect the levels of VEGF produced by the C33A cells due to its limited range of detection. Three vNARs with neutralizing potential were obtained in this work, thus, it is important to determine their *in vitro* neutralizing potency by the immunodetection of the STAT3 phosphorylated protein and VEGF detection using a commercial antibody anti-VEGF.

Keywords: interleukin-6, interleukin-1 β , inflammation, new antigen receptor variable domains (vNAR), immunotherapeutic.

Dedicatoria

A mis padres Reinhold y Rosa porque son una gran fuente de inspiración y admiración para mí, por enseñarme a cumplir mis metas, por el apoyo, cariño y confianza aún en la distancia, fueron mis pilares para obtener este logro. Los quiero mucho.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado, bajo el número de becario 1057691.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por la oportunidad de permitirme ser parte del Posgrado en Ciencias de la Vida.

A mi director de tesis, el Dr. Alexei F. Licea Navarro por aceptarme como su estudiante, por la confianza de ser parte de su grupo de trabajo, el apoyo, por la paciencia, por el apoyo económico y por sus enseñanzas que contribuyeron en mi formación.

A los miembros de mi comité:

A la Dra. Olivia Cabanillas Bernal por el apoyo en el laboratorio y con los contratiempos que surgieron durante el proyecto, por la resolución de las dudas y los consejos y observaciones que me permitieron enriquecer este proyecto.

A la Dra. Nadia por el apoyo durante los contratiempos que surgieron durante el proyecto, por estar al pendiente de los avances del proyecto y por su retroalimentación en cuestiones de redacción de esta tesis.

Al Dr. Carlos Brizuela, por sus comentarios y por realizar los cuestionamientos pertinentes durante el proyecto que permitieron mejorar el mismo desde varios aspectos.

A los miembros del departamento de Innovación Biomédica.

Al Dr. Jahaziel Gasperín, por todo el apoyo brindado en el laboratorio, por la resolución de dudas, por enseñarme a ser más crítica y objetiva al momento de diseñar los experimentos y tomar decisiones respecto a los mismos, así como los consejos que permitieron el buen desarrollo de mi proyecto.

A la M.C Monserrat Renteria, por la capacitación inicial en el laboratorio, por su acompañamiento y apoyo tanto técnico como moral en los largos experimentos, por la confianza brindada y los buenos consejos.

A la Dra. Karla Cervantes, por los consejos en el laboratorio y el apoyo en los experimentos de cultivo celular.

A Epifanio, por siempre recibirme con una gran actitud, eso hacía muy ameno llegar al laboratorio y por recordarme que debía comer cuando pasaba largos periodos en el laboratorio.

A la pequeña familia que formé en Ensenada:

A Adolfo, mi primer amigo en línea en la maestría, por el apoyo durante las clases y por tomar la batuta de preguntar lo que yo no era capaz durante las mismas, por el apoyo y las enseñanzas durante el proceso experimental, porque producir vNARs no hubiera sido lo mismo sin ti, por escucharme y comprenderme en todos los momentos, por enseñarme a ser un poquito más extrovertida y por los grandes y buenos momentos vividos en Ensenada.

A Octavio, mi racoon, por tu valiosa amistad, por todas las experiencias y viajes juntos, por siempre escucharme y apoyarme en todo, por acompañarme en los momentos más difíciles, por la compañía en los largos periodos en el laboratorio, por el apoyo en cultivo celular, por las risas, las lágrimas y las caminatas en la playa, te convertiste en un pilar para mí en Ensenada, más que un amigo un hermano y por eso te estaré eternamente agradecida.

A Iván, mi viroamigui, por todas las pláticas profundas, por las caminatas por Ensenada, por acompañarme siempre a ver el atardecer, por todas las playlists que armamos, por aguantarme en mis momentos más otakus, por compartir la pasión por la virología, por siempre haber estado en los buenos y los malos momentos, por las risas, las lágrimas y el apoyo incondicional que siempre me brindaste.

A la Dra. Angélica Álvarez, por haber sido un gran apoyo durante mi estancia en Ensenada, por hacerme segunda en los desayunos de señoras, por escucharme cuando más lo necesité, por creer en mi cuando ni yo misma lo hacía, por brindarme la computadora en la que pude escribir esta tesis y por tu amistad.

A David, por ser de mis amigos más cercanos en Ensenada, por haberme permitido convertirte en cat person gracias a Senshi, por siempre hacerme segunda en todos los planes que proponía (en especial los que involucraban pollito rostizado) por todos los viajes a la playa y los buenos momentos en Ensenada, por las pijamadas en el laboratorio durante los experimentos largos, por tu confianza y por tu amistad sincera.

A Daniela Parra, por el apoyo preparando medios y soluciones en el laboratorio, por permitirme enseñarte lo mucho o poco que sé de vNARs porque gracias a eso pude reforzar mis conocimientos en el tema, por los dulces, chocolates, el atole, por escucharme y entenderme.

Al M.C Isaí, por los desayunos de señoras, por siempre echarme porras, por siempre hacerme segunda en todo lo que implicara gatitos, por escucharme y aconsejarme, por tu amistad y por los grandes momentos dentro y fuera del laboratorio.

Al M. C Geovanni, por contagiarme de tu buena energía y siempre hacerme reír, por los consejos, las porras cada vez que nos encontrábamos en el laboratorio, por tu amistad tan sincera y los grandes momentos.

A Luis, por el apoyo cuando llegué a Baja California, por haber ido por mí hasta Tijuana, por tu hospitalidad cuando llegué a Ensenada, por enseñarme la ciudad, los consejos, los desayunos, los viajes a la playa, por siempre decirme las cosas directamente y hacerme entrar en razón cuando era necesario y por tu gran amistad.

A Karla, por ser mi apoyo en la distancia, por escucharme respecto a todas las dificultades que tuve durante la maestría, por echarme porras, por haberme visitado en Ensenada y por creer en mí.

A Ulises y Ana Karen, mis roomies en Ensenada, por el apoyo brindado durante una nueva etapa que fue vivir solos por primera vez, por la confianza y los grandes momentos que vivimos juntos en la casa Olivos con Maow, definitivamente esta experiencia no hubiese sido la misma sin ustedes.

A mi abuelita Ofelia y mi tía Inge, porque aún en la distancia siempre estuvieron al pendiente de mí, siempre creyeron en mí y me escucharon a lo largo de esta experiencia.

A mis hermanos, Erwin, Gabriela y Sergio, por siempre creer en mí y apoyarme a la distancia.

A la Sociedad del Posgrado en Ciencias de la Vida, porque me permitieron extender mi círculo de amigos, conocer personas maravillosas y ser parte de actividades que marcaron mi tiempo en la maestría.

A todos mis compañeros de la generación 2020, quienes a pesar de conocernos inicialmente de forma virtual hicieron que la maestría fuera una gran experiencia.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	xii
Lista de tablas.....	xv
<i>Capítulo 1. Introducción.....</i>	<i>1</i>
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Interleucina 6 (IL-6)	2
1.1.2 Interleucina 1 β (IL-1 β).....	4
1.1.3 Patologías asociadas a la IL-6 e IL-1 β	6
1.1.4 Tratamientos anti IL-6 y anti IL-1 β	8
1.1.5 Inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígeno (IgNAR).....	10
1.2 Justificación.....	11
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12
<i>Capítulo 2. Metodología</i>	<i>13</i>
2.1 Preparación de células electrocompetentes.....	13
2.1.1 <i>E. coli</i> ER2738	13
2.1.2 <i>E. coli</i> TG1.....	15
2.2 Preparación fago ayudador M13K07	15

2.3	Bioselección a partir de bibliotecas sintéticas de fagos que reconozcan la IL-1 β y el IL6R/IL6	16
2.3.1	Reamplificación de las bibliotecas VS0, VS1 y VS2.....	17
2.3.2	Rondas de bioselección de fagos que reconocen IL-1 β o IL6R/IL6 (Biopanning).....	18
2.3.3	Búsqueda de clonas funcionales por PCR	19
2.3.4	Secuenciación.....	21
2.3.5	Extracción y purificación del plásmido por lisis alcalina	21
2.4	Expresión y evaluación del vNAR recombinante.....	22
2.4.1	Preparación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	22
2.4.2	Cinética de expresión del vNAR recombinante a pequeña escala	23
2.4.3	Extracción citoplásmica del vNAR recombinante	24
2.4.4	Extracción periplásmica de la proteína recombinante	24
2.4.5	Detección del vNAR recombinante mediante ELISA de expresión	25
2.4.6	Electroforesis desnaturizante en tricina (Tricina-SDS-PAGE)	25
2.4.7	Tinción Coomassie.....	26
2.4.8	Inmunodetección del vNAR recombinante (Western Blot)	26
2.5	Renaturalización del vNAR W1 β 6 en cuerpos de inclusión	26
2.5.1	Obtención y clarificación de cuerpos de inclusión.....	26
2.5.2	Purificación desnaturizante por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).....	27
2.5.3	Concentración de proteínas por precipitación con ácido tricloroacético (TCA)	28
2.5.4	Renaturalización <i>in situ</i> : “ <i>On column refolding</i> ”	28
2.5.5	Diálisis.....	30
2.5.6	ELISA de reconocimiento	30
2.6	Segunda búsqueda de clonas que reconozcan a la IL-1 β	30
2.7	Expresión a gran escala del vNAR recombinante.....	31
2.8	Purificación vNAR recombinante por cromatografía de afinidad a metales (IMAC)	32
2.9	Título de reconocimiento del vNAR a diferentes concentraciones del antígeno IL6R/IL6 .	33

2.10	Ensayo de neutralización <i>in vitro</i> del complejo IL6/IL6R en células C33A	33
Capítulo 3.	Resultados	35
3.1	Preparación de células electrocompetentes.....	35
3.2	Preparación fago ayudador M13K07	36
3.3	Bioselección a partir de bibliotecas sintéticas de fagos que reconozcan la IL-1 β y el IL6R/IL6	36
3.3.1	Reamplificación de bibliotecas VS0, VS1 y VS2.....	36
3.3.2	Rondas de bioselección de fagos fagos que reconocen IL-1 β o IL6R/IL6 (Biopanning)	37
3.3.3	Búsqueda de clonas funcionales por PCR	38
3.3.4	Secuenciación.....	42
3.3.5	Extracción y purificación de plásmido por lisis alcalina	43
3.4	Expresión y evaluación del vNAR recombinante.....	44
3.4.1	Preparación de células quimiocompetentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	44
3.4.2	Cinética de expresión y extracción del vNAR recombinante	45
3.4.3	ELISA de reconocimiento	47
3.4.3.1	Interleucina 1 β	47
3.4.3.2	Receptor soluble de la interleucina IL-6.....	48
3.5	Renaturalización <i>in situ</i> : “On column refolding”	49
3.5.1	Obtención y clarificación de cuerpos de inclusión.....	49
3.5.2	Purificación desnaturalizante.....	50
3.5.3	Renaturalización del vNAR W1 β 6	52
3.5.4	ELISA de reconocimiento del vNAR renaturalizado	56
3.6	Segunda búsqueda de clonas que reconozcan a la IL-1 β	57
3.6.1	Extracción y purificación de plásmido por lisis alcalina de las clonas 200, 202, 209 y 225	60
3.6.2	Expresión a pequeña escala y extracción periplásmica de las proteínas expresadas por las clonas 200, 202, 209 y 225	60

3.6.3	ELISA de reconocimiento por las clonas 200, 202 y 209	63
3.7	Expresión a gran escala del vNAR recombinante	64
3.8	Purificación por cromatografía de afinidad a metales IMAC	64
3.9	Título de reconocimiento del vNAR a diferentes concentraciones del antígeno IL6R/IL6 .	70
3.10	Ensayo de neutralización del complejo IL6R/IL6.....	71
Capítulo 4. Discusión		72
4.1.1	Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> ER2738 y células quimiocompetentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	72
4.1.2	Selección de vNARs candidatos contra el antígeno de interés	73
4.1.2.1	Interleucina 1 β	73
4.1.2.2	Receptor soluble de la interleucina 6.....	78
Capítulo 5. Conclusiones.....		81
5.1	Perspectivas	82
Literatura citada		83
Anexos.....		90

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Vías de señalización de IL-6.....	4
Figura 2. Vía de señalización de IL-1 β	5
Figura 3. Diagrama del protocolo de renaturalización <i>in situ</i> : On column refolding.....	29
Figura 4. Diseño experimental de la producción de VEGF en células C33A por estimulación del complejo IL6R/IL6	34
Figura 5. Títulos de salida de fago en cada ronda de bioselección anti IL1 β	37
Figura 6. Títulos de salida de fago en cada ronda de bioselección anti IL6/IL6R.....	37
Figura 7. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la ronda 3 de bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%.	39
Figura 8. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la ronda 4 de bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%.	39
Figura 9. Análisis de productos de PCR STOP de las colonias aisladas de la ronda 3 y 4 de la bioselección anti IL6/IL6R, en gel de agarosa al 2%.	40
Figura 10. Análisis de productos de PCR de las colonias presentan el fragmento vNAR de interés de la bioselección anti IL6/IL6R, en gel de agarosa al 2%.	41
Figura 11. Alineamiento del CDR3 de las secuencias que presentaron un CDR3 distinto a las bibliotecas originales.....	42
Figura 12. Alineamiento del CDR3 de las secuencias que presentan un CDR3 distinto a las bibliotecas originales.....	43
Figura 13. Análisis de la presencia del plásmido de la secuencia 6-IL1B por electroforesis de un gel de agarosa al 1.2%..	44
Figura 14. Análisis de la presencia del plásmido de las secuencias funcionales anti IL6R/IL6 por electroforesis de un gel de agarosa al 1.2%..	44
Figura 15. Ensayo de ELISA de expresión para evaluar la presencia del vNAR W1 β 6 en las diferentes condiciones estudiadas en la cinética de expresión.....	46
Figura 16. Expresión de vNARs candidatos anti IL6R/IL6. Detección de la presencia de vNAR mediante ELISA bajo la expresión en las condiciones estándares del grupo de trabajo.	46
Figura 17. Ensayo de ELISA de reconocimiento del vNAR W1B6 contra su blanco molecular la intelreucina 1 β	47

Figura 18. ELISA de reconocimiento de los vNAR candidatos contra su blanco molecular el complejo del receptor soluble de la citocina 6 (IL6R/IL6)..	48
Figura 19. Análisis de la expresión vs el reconocimiento de los vNARs candidatos que reconocen el blanco molecular IL6R/IL6.	49
Figura 20. Análisis de la presencia del vNAR W1β6 en extracción citoplásmica, periplásmica y en cuerpos de inclusión clarificados..	50
Figura 21. Cromatograma de la purificación desnaturizante de W1B6 con DNTI500.	51
Figura 22. ELISA de expresión de las fracciones obtenidas a partir de la purificación desnaturizante por FPLC.	51
Figura 23. Análisis de la presencia del vNAR W1β6 en las fracciones de la purificación desnaturizante	52
Figura 24. Cromatograma de la renaturalización de la proteína W1β6 con hidrocloreuro de guanidida 6 M como agente desnaturizante	53
Figura 25. Cromatograma de la renaturalización de la proteína W1β6 con urea 8M como agente desnaturizante.	54
Figura 26. ELISA de expresión de las fracciones obtenidas a partir de la renaturalización de la proteína W1β6.	55
Figura 27. Análisis de la presencia del vNAR W1β6 en las fracciones de la renaturalización	56
Figura 28. Ensayo de ELISA de reconocimiento del vNAR W1β6 renaturalizado contra su blanco molecular la intelreucina 1β.	57
Figura 29. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la segunda búsqueda de la ronda 3 de bioselección anti IL-1β, en gel de agarosa al 2%.	58
Figura 30. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la segunda búsqueda de la ronda 4 de bioselección anti IL-1β, en gel de agarosa al 2%.	58
Figura 31. Detección del fragmento vNAR en las clonas que no pertenecen a las bibliotecas originales de la segunda búsqueda de la bioselección anti IL-1β, en gel de agarosa al 2%.	59
Figura 32. Alineamiento del CDR3 de las secuencias de la segunda búsqueda que presentaron un CDR3 distinto a las bibliotecas originales	59
Figura 33. Análisis de la presencia del plásmido de las secuencias 200, 202, 209 y 225 por electroforesis de un gel de agarosa al 1.2%.	60
Figura 34. ELISA de expresión de los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica de las clonas 200, 202, 209 y 225.	61
Figura 35. Análisis de la presencia del vNAR de las clonas 200, 202, 209 y 225 en los sobrenadantes de la extracción periplásmica por electroforesis desnaturizante de tricina.	62

Figura 36. ELISA de expresión de los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica de la expresión 500 mL de cultivo de las clonas 200, 202 y 209.....	63
Figura 37. Ensayo de ELISA de reconocimiento del vNAR expresado por las clonas 200, 202 y 209 contra su blanco molecular la intelreucina 1 β	63
Figura 38. Gradiente de purificación clona 39	64
Figura 39. ELISA de expresión para detección del vNAR de la clona 39 en el gradiente de purificación.	65
Figura 40. Análisis de las fracciones obtenidas del gradiente de purificación del vNAR clona 39.	66
Figura 41. Programa de purificación del vNAR IL6R-8.	66
Figura 42. Análisis de las fracciones obtenidas de la purificación del vNAR IL6R-8.....	67
Figura 43. Análisis de las fracciones obtenidas de la repurificación de las fracciones 11 y 12 de la purificación del vNAR IL6R-8.....	68
Figura 44. Programa de purificación del vNAR expresado por la clona 16.....	69
Figura 45. Análisis de las fracciones obtenidas de la purificación del vNAR expresado por la clona 16.	69
Figura 46. ELISA de reconocimiento del antígeno IL6R/IL6 a diferentes concentraciones por parte de los vNARs expresados por las clonas 8 y 16.....	70
Figura 47. Ensayo de neutralización in vitro del complejo de la IL6 con su receptor soluble con base en la producción de VEGF.....	71
Figura 48. ELISA de reconocimiento IL6R/IL6 250 ng.....	90
Figura 49. Ensayo de detección de VEGF por el vNAR V13 en células HeLa	91

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Reactivos y volumen utilizados para una reacción de PCR de 20 μ L.....	20
Tabla 2. Condiciones de corrida de PCR de colonia para PCR STOP y detección del fragmento vNAR	21
Tabla 3. Títulos de células electrocompetentes para el proceso de bioselección.....	35
Tabla 4. Pruebas de contaminación células electrocompetentes.	35
Tabla 5. Título de competencia del fago ayudador M13K07.	36
Tabla 6. Título de reamplificación de bibliotecas VS0, VS1 y VS2 en la bioselección de IL1 β	36
Tabla 7. Título de reamplificación de bibliotecas VS0, VS1 y VS2 en la bioselección de IL6R/IL6	37
Tabla 8. Título de competencia de las células quimiocompetentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	44
Tabla 9. Pruebas de contaminación células quimiocompetentes.....	45
Tabla 10. Número de colonias obtenidas de la infección de <i>E.coli</i> ER2738 con los fagos de la bioselección anti IL1 β	57
Tabla 13. Cuantificación de proteína total de las clonas 200, 202, 209 y 225 por Nanodrop.	61
Tabla 14. Cuantificación por Nanodrop de la concentración de proteína total en extractos periplásmicos.	64

Capítulo 1. Introducción

El Síndrome de Liberación de Citocinas (CRS, por sus siglas en inglés), es una respuesta inflamatoria sistémica severa, desencadenada por inmunoterapias, trasplantes de células madre e infecciones virales graves. Se identificó por primera vez en los años 90s, tras un ensayo con el anticuerpo murononab-CD3 (Chatenoud et al., 1989). El CRS ha ganado importancia por su aparición en infecciones virales graves por el virus de la influenza y del SARS-CoV-2. Además, se asocia con daño pulmonar severo, falla multiorgánica y un pronóstico desfavorable (Chen et al., 2020). Aunque la fisiopatología del CRS no se ha elucidado completamente, se han identificado varias citocinas centrales que se encuentran elevadas en pacientes con CRS. Como son la interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) y el interferón γ (IFN- γ) (Shimizu, 2019).

Tanto IL-6 e IL-1 β tienen un papel clave en el desarrollo y severidad del proceso inflamatorio sistémico por infección viral grave. Estas citocinas, se encuentran relacionadas con patologías como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y artritis idiopática juvenil de aparición sistémica (Sushak et al., 2020). Por lo anterior, ambas citocinas han sido ampliamente investigadas como blanco terapéutico para su neutralización y la inhibición de las vías que activan (Rose-John, 2020).

IL-6 activa dos vías importantes de transducción de su señal: *cis* (clásica) y *trans*. La vía *cis* se activa por la unión de IL-6 a su receptor transmembranal IL-6R, acoplado a la glucoproteína de superficie celular gp130 (Zhang et al., 2020). La vía *cis*, se asocia a procesos de proliferación celular, inhibición de la apoptosis de células epiteliales, reacciones de la fase aguda del hígado y mecanismos de defensa contra infecciones. Por otro lado, la vía *trans*, se activa por la unión de IL-6 a su receptor soluble (SIL6R) y se une a gp130 en la membrana celular (Zhang et al., 2020). La vía *trans*, se asocia con procesos proinflamatorios, como el reclutamiento de células mononucleares, estimulación de células endoteliales y del músculo liso, inhibición de la apoptosis de las células T y la diferenciación de los linfocitos T reguladores (Rose-John, 2020).

En cambio, la IL-1 β es inducida por infecciones virales y sus funciones se encuentran mediadas por la unión a su receptor del tipo 1 (IL-1R) y el reclutamiento de un receptor accesorio IL-1RAcP (Gabay et al., 2010). Su vía de señalización se asocia con actividad quimiotáctica de los granulocitos, incremento de la permeabilidad del endotelio, activación de células T, neutrófilos y células B (Nakahara et al., 2003).

Para el tratamiento del CRS inducido por infecciones virales, existen anticuerpos monoclonales (mAb) como Tocilizumab (bloquea la vía *cis* y *trans* de IL-6), Canakinumab (neutraliza a la IL-1 β) (Nakahara et al., 2003).). También, existen péptidos y péptidos fusión, como el Anakinra (contra IL-1 β) y Olamkicept (que bloquea la vía *trans* de IL-6), respectivamente, y medicamentos convencionales como la dexametasona; un corticosteroide (Jostock et al., 2001; Lim et al., 2020). Sin embargo, el uso de Tocilizumab y dexametasona, presentan desventajas por su funcionamiento de amplio espectro en la inhibición de respuestas antivíricas y antibacterianas (Lim et al., 2020; Panoskaltis, 2021).

Los tratamientos disponibles para el CRS por infección viral grave, presentan limitantes como la inhibición de mecanismos inmunológicos, precios elevados, producción complicada, efectividad reducida por su gran tamaño (mAb) y efectos adversos (Sommerfeld y Strube, 2005; Chames et al., 2009). También, los tratamientos específicos para inhibir la vía *trans* de IL-6 son escasos. Por lo anterior, se propone utilizar los dominios variables del nuevo receptor de antígeno (vNAR, por sus siglas en inglés) para poder inhibir el receptor soluble de IL-6 (SIL6R) y así la vía *trans*, y en el caso de IL-1 β ampliar la cantidad de tratamientos disponibles para contar con un potencial tratamiento enfocado a neutralizar los efectos proinflamatorios de estas citocinas para su uso en el tratamiento del CRS ocasionado por infecciones virales graves. Con este trabajo se espera contribuir con más alternativas de terapias que permitan inhibir las vías proinflamatorias de las citocinas IL-6 e IL-1 β en enfermedades inflamatorias sistémicas severas.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Interleucina 6 (IL-6)

La interleucina 6 fue descubierta a mediados de los años 80s, por su importancia para la estimulación de las células B y regulación de la expresión del fibrinógeno en los hepatocitos, también se identificó como un factor que liberan los fibroblastos por estimulación viral (Rothaugh et al., 2016). Esta interleucina, no solamente tiene funciones específicas en el sistema inmunológico, sino que se encarga de regular procesos como la hematopoyesis, metabolismo, desarrollo de órganos y participa en procesos fisiopatológicos en una gran variedad de enfermedades (Su et al., 2017).

Esta citocina es secretada mayormente por células del sistema inmunológico, como son las células T, Células B, macrófagos, monocitos y microglía, también por células no inmunológicas como células

musculares, adipocitos, fibroblastos, células endoteliales y neuronas (Rothaug et al., 2016). Es una citocina con un rol central en la inflamación aguda, tiene la capacidad de mediar y llevar a cabo varias funciones. Es activada por la interleucina 1β y $TNF\alpha$, por los receptores tipo Toll (TLR), prostaglandinas y otras citocinas. Tiene un papel importante en la defensa inmunológica porque estimula varias poblaciones celulares del sistema inmunológico (Scheller et al., 2014; Hunter y Jones, 2015).

La IL-6 tiene varias funciones en la activación de los linfocitos B, para la producción de anticuerpos; interacción con las células T, para la activación de los linfocitos T citotóxicos; en el hígado, para la producción de proteína reactiva; y en las células madre hematopoyéticas, para su crecimiento y diferenciación. Entre las células blanco de esta citocina encontramos a las células B, células T, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Zhang et al., 2020). La IL-6 también estimula la inflamación por medio del complemento ya que activa en ciertos órganos las proteínas C3 y el receptor C5 (Tanaka et al., 2016).

La IL-6 cuenta con dos vías de señalización, la vía *cis* o clásica y la vía *trans* (Figura 1). Su tipo de señalización depende del tipo de receptor al que se une esta citocina (Rose-John et al., 2017). En el caso de la señalización por medio de la vía clásica, se necesita de la presencia de un receptor transmembranal (IL6R), el cual es expresado únicamente por ciertos tipos de células como son los hepatocitos, leucocitos, macrófagos, neutrófilos, podocitos y células T CD4+, por lo que pueden ser estimuladas y responder directamente a esta citocina (Rose-John et al., 2017; Su et al., 2017). La IL-6 se une a la cadena α del receptor, pero es la cadena β (o gp130) del mismo la que se encarga de activar las vías de señalización (Su et al., 2017). Dentro de estas encontramos la vía de JAK-STAT principalmente por medio de STAT1 y STAT3 y la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) dependiente de RAS (Rothaug et al., 2016; Su et al., 2017). Esta vía de señalización clásica se encuentra asociada a procesos como la producción de proteínas de la fase aguda en el hígado, defensa contra infecciones, metabolismo y regeneración de tejidos (Rose-John et al., 2017).

Por otro lado, la vía de señalización *trans* de esta citocina, se encuentra relacionada con los procesos inflamatorios locales y sistémicos. Para la activación de esta vía es necesario contar con el receptor soluble de la IL-6 (SIL6R) (Rose-John et al. 2017). La presencia de este receptor soluble, le permite a IL-6 poder estimular células que no necesariamente expresan su receptor transmembranal, ya que la mayoría de las células en el cuerpo humano expresan el receptor gp130, el cual es activado por la unión del complejo IL-6 con SIL6R (Su et al., 2016; Johnson et al., 2018). El SIL6R se puede producir por empalme alternativo o por acción de las proteínas ADAM10, que se encargan de la proteólisis lenta del IL6R y por ADAM17, que se encarga de la hidrólisis rápida de IL6R, bajo la estimulación de diferentes factores, como pueden ser los

patrones moleculares asociados a patógenos (MAPS) durante una infección viral (Rothaugh et al., 2016; Su et al., 2017).

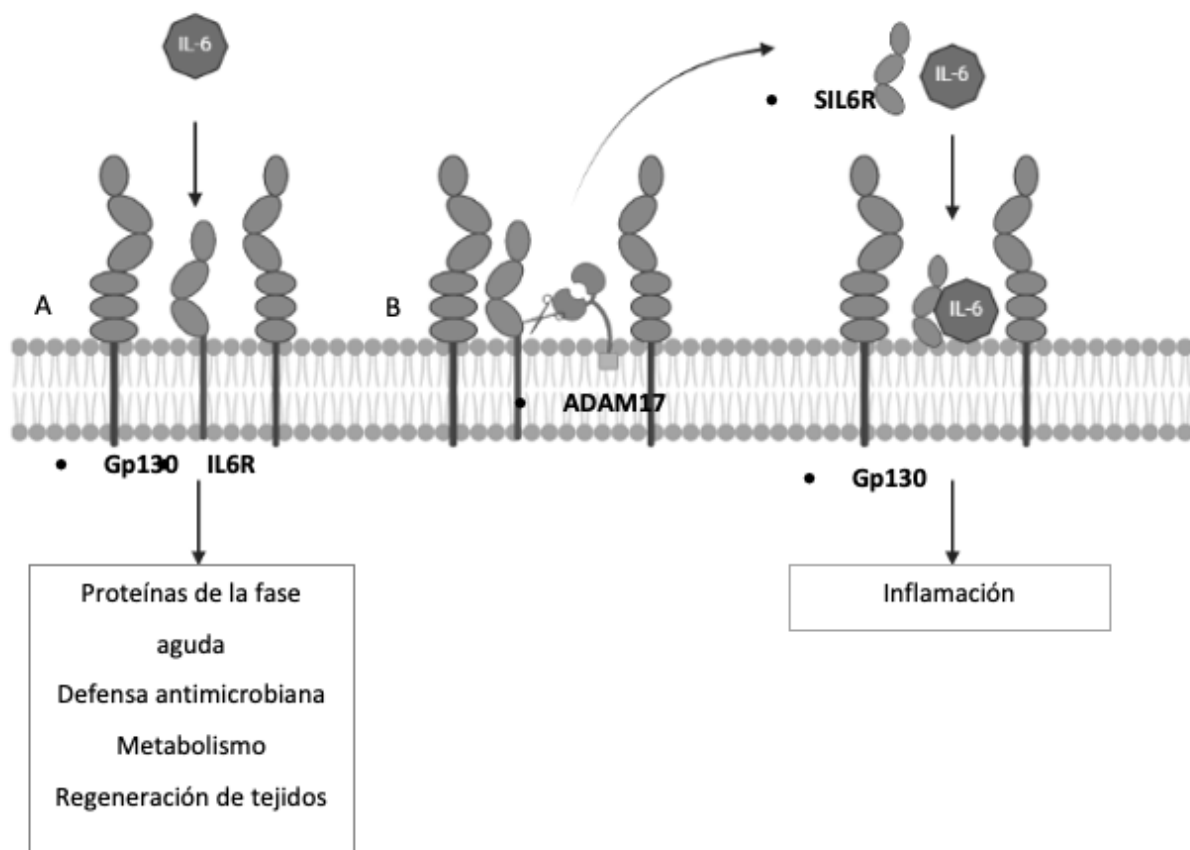


Figura 1. Vías de señalización de IL-6. A) Vía de señalización clásica, que necesita de un receptor transmembranal. B) Vía de señalización *trans*, que depende de la presencia de un receptor IL6R soluble. Modificado de: Rose-John et al., 2017

1.1.2 Interleucina 1 β (IL-1 β)

Pertenece a la familia de las citocinas del tipo 1, es una citocina importante por su rol en procesos inflamatorios, de defensa del hospedero en conjunto con IL-1 α y en la patogénesis de varias enfermedades como IL-6 (Libby, 2017). Es producida por monocitos y macrófagos en una forma inactiva que debe ser activada por acción del inflammasoma, en especial por la caspasa 1 (De Luca et al., 2018). Dentro de las actividades que realiza esta citocina encontramos, que promueve fiebre, la vasodilatación, participa en la hematopoyesis y angiogénesis, activa linfocitos, neutrófilos, células B y eleva la producción de proteínas reactivas en conjunto con IL-6 (Afonina, 2018). Es liberada al espacio extracelular para ejercer sus acciones mediadoras en los diversos procesos de los que forma parte (Libby, 2017)

La IL-1 β , tiene mecanismos de acción proinflamatorios similares a los del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la inflamación aguda causada por esta citocina se debe al reclutamiento de células a la zona del tejido dañado, o al iniciar los sistemas de reparación, igualmente es capaz de activar la producción de IL-6 (Sushak et al., 2020). En el cerebro tiene efecto en procesos psicológicos y endócrinos inducidos por activación inmune (Qui et al., 2015).

Dentro de las funciones asociadas con esta citocina encontramos, efectos proinflamatorios, actividad quimiotáctica sobre granulocitos, como pirógeno endógeno, eleva las proteínas reactivas en conjunto con IL-6, estimulación hormonal de la hipófisis, expresión génica, activación de células T, neutrófilos y células B para la producción de anticuerpos. Finalmente, también se encuentra asociada en la diferenciación de los Th17 (Nakahara et al., 2003).

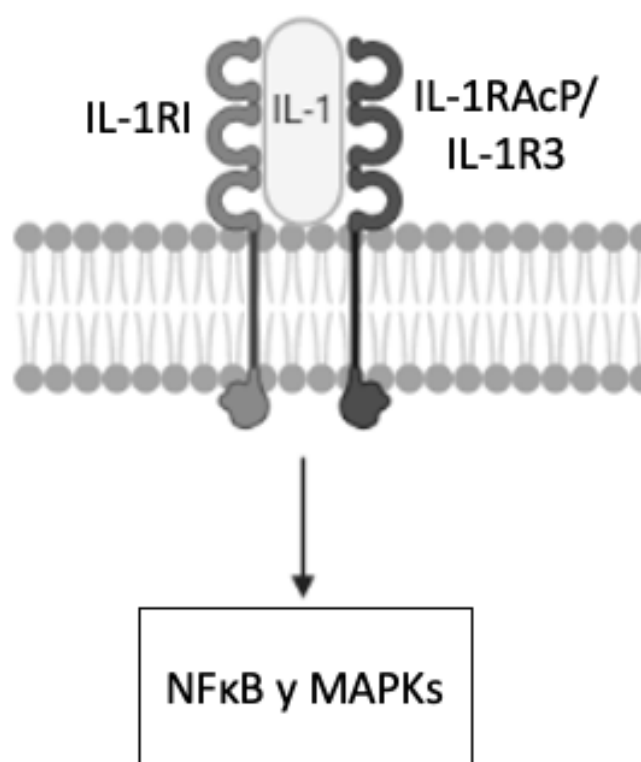


Figura 2. Vía de señalización de IL-1 β . Modificado de Bent et al., 2018

La IL-1 β ejerce sus actividades por medio del receptor para la IL-1 del tipo 1, que es expresado por células T, leucocitos polimorfonucleares, células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B y células epiteliales

(Bent et al., 2020). Al unirse con su receptor debe reclutar una proteína accesoria conocida como IL-1rAcP o IL-1R3, para formar la dimerización del receptor y poder activar sus cascadas de señalización (Liby, 2017; De Luca et al., 2018). Posteriormente dos dominios del receptor TIR (IL-1R1 e IL-1R3) reclutan otro dominio de la proteína adaptadora MyD88, las cinasas asociadas al receptor IL-1R y el receptor TNF asociado al factor 6, todo esto para activar la señalización vía NFκB, las cinasas c-Jun N-terminal, las cinasas reguladas por señales extracelulares y la vía de las MAPKs (Bent et al., 2020).

1.1.3 Patologías asociadas a la IL-6 e IL-1β

La IL-6 e IL-1β se encuentran asociadas a una gran cantidad de patologías, las cuales convergen en un punto, los procesos inflamatorios. Dentro de las patologías que más resaltan, en el caso de la IL-6, el cáncer, ya que promueve el proceso de angiogénesis, como lo hace el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), esta estimulación resulta en la formación de tumores, lo cual se observó en el estudio realizado por Gopinathan et al. (2015) en un modelo *in vivo* y *ex vivo* de aorta. Además de la vascularización promovida por la IL-6, el eje de señalización IL-6/JAK/STAT3 se encuentra relacionado con la aparición y proliferación de tumores sólidos, como lo describe Johnson et al. (2018), esto debido a que niveles elevados de IL-6 se relacionan con un aumento en el tamaño del tumor, promueve la hiperfosforilación de STAT3 y genera un bucle de retroalimentación positivo en la producción de IL-6, por lo general una fosforilación aumentada de STAT3 se encuentra relacionada con una prognosis desfavorable para el paciente (Johnson et al., 2018).

Asimismo, niveles elevados de IL-6 se han detectado en la saliva de pacientes con enfermedad de Huntington, ya que promueve la inflamación en el cerebro, en un estudio realizado por Corey-Bloom et al. (2020), proponen a esta citocina como un biomarcador en inmunoensayos basados en saliva, para poder detectar de manera temprana esta enfermedad.

La IL-6 tiene un rol importante en procesos asociados con el hígado tanto en reparación de tejidos, como en el desarrollo de patologías como la fibrosis hepática, carcinoma hepatocelular (HCC) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NASH), ya que en el estudio realizado por Hadinia et al. (2019), se encontró relación entre la presencia de esta citocina y su capacidad de inducir un proceso inflamatorio en el hígado, así como promover la apoptosis de los hepatocitos, lo que resulta en una fibrosis y por lo tanto daño hepático, a comparación de la enfermedad hepática grasa no alcohólica, la cual no tiene ninguna asociación con IL-6 y procesos inflamatorios (Hadinia et al., 2019).

En el estudio realizado por Liet al. (2019), se determinó el rol en la patogénesis y como biomarcadores de la IL-6 en conjunto con la interleucina-10 (IL-10) y el interferón- γ (IFN γ), en la enfermedad de Kawasaki, el papel de esta citocina es principalmente el de promover inflamación crónica, lo que genera una falla y daño multiorgánico, ya que las citocinas trabajan a nivel celular, la IL-6 se encuentra elevada en esta enfermedad especialmente en células del sistema inmunológico.

La IL-6 tiene una participación en la aparición del síndrome TAFRO, el cual es una variante de la enfermedad de Castleman, en el estudio realizado por Fujiwara et al. (2016) se caracteriza este síndrome por niveles muy elevados de esta citocina.

Adicionalmente la IL-6 ha ganado atención en el contexto de la pandemia producida por el virus del SARS-CoV-2, ya que niveles muy elevados de esta citocina se encuentran directamente relacionados con la aparición del síndrome de liberación de citocinas, derivado de una respuesta inmunológica exacerbada que resulta en un proceso de inflamación severo y que puede generar daño en el tejido y falla multiorgánica (Conti et al., 2020; Liu et al., 2020). Inclusive la Organización Mundial de la Salud realizó un llamado para desarrollar y ampliar la accesibilidad de tratamientos que bloqueen la IL-6 como potencial tratamiento para casos de COVID-19 severo (WHO, 2021).

En el caso de la IL-1 β , al ser una de las principales citocinas inflamatorias, al igual que IL-6, se encuentra ampliamente involucrada y relacionada con una gran cantidad de patologías. En el trabajo de Cantin (2019), asocian a esta citocina con la fibrosis quística, cuya inflamación es inducida por la presencia de lipopolisacárido bacteriano que promueve la formación del inflammasoma y conduce a la activación de la IL-1 β , la inflamación crónica asociada a la fibrosis quística conlleva a la destrucción de los bronquios por cambios guiados por la IL-1 β en neutrófilos (Cantin, 2019). Asimismo, esta citocina se encuentra asociada a patologías cardíacas como es la aterosclerosis, por inflamación en las células del endotelio, activando el inflammasoma y produciendo mediadores trombogénicos (Libby., 2017). En el trabajo de Ebadi et al. (2020), asociaron la expresión genética de esta citocina con la enfermedad coronaria, por medio de la activación de la vía NF κ B, que induce a la expresión de IL-6, IL-1 β y TNF α . De igual forma, los patrones de expresión elevados o disminuidos de esta citocina, se han relacionado con la presencia de polimorfismos en el gen que la codifica tanto en variantes heterocigotas y homocigotas, con la aparición de síndromes como la trombocitopenia inmunitaria, este tipo de síndrome se encuentra relacionado con la presencia de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína de la membrana de las plaquetas, promoviendo su destrucción y generando un déficit de plaquetas (Yadav et al., 2017).

Esta citocina es un buen biomarcador para detectar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, ya que en el estudio realizado por Hammad et al. (2015), encontraron que niveles elevados de IL-1 β se asociaban con una forma más severa de dicha enfermedad y con un daño elevado en el tejido pulmonar, derivado de un proceso inflamatorio sistémico en el que esta citocina se encuentra involucrada.

Por otra parte, esta citocina se ha asociado a patologías neurológicas, en conjunto con la citocina IL-6, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer, ya que en el estudio realizado por Darsun et al. (2015), se encontró una fuerte correlación de la presencia de estas citocinas en enfermedades neurológicas, también destacan en sus hallazgos que existen moléculas naturales que permiten regular la sobreproducción de estas citocinas proinflamatorias como son la α M2, que tiene la capacidad de unirse y regular la IL-6, IL-1 β y TNF α en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Darsun et al., 2015).

Aparte del Alzheimer, la IL-1 β se encuentra relacionada con la hipertensión del núcleo hipotalámico paraventricular, de acuerdo a lo publicado por Qui et al. (2015), esto derivado de una dieta alta en sodio, lo cual aumenta los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α , generando un desbalance entre IL-1 β y IL-10, por lo que proponen el bloqueo de la citocina IL-1 β para reducir la hipertensión en el núcleo hipotalámico paraventricular y la hipertensión cardíaca asociada con estrés oxidativo y daño cardíaco (Qui et al., 2015).

La IL-1 β , al igual que IL-6, se encuentra relacionada en el proceso inflamatorio promovido por la infección del virus SARS-CoV-2, ya que la detección del virus por medio de los receptores tipo toll 2,3 y 4 (TLR, por sus siglas en inglés) induce la producción de esta citocina en su forma inactiva, paralelamente la formación del inflamasoma permite la activación de la IL-1 β , la cual regula la inflamación, la aparición de fiebre durante la infección y el desarrollo de fibrosis en los pulmones (Conti et al., 2020). Por lo que, los tratamientos para controlar la inflamación sistémica provocada por este patógeno se han enfocado a no solamente inhibir la IL-6, sino también a la IL-1 β que juega una función importante.

1.1.4 Tratamientos anti IL-6 y anti IL-1 β

Se encuentran aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) medicamentos dirigidos contra el receptor de IL-6 e IL-1 β y neutralizantes de la IL-6 e IL-1 β .

Kevzara (sarilumab) producido por Sanofi Synthelab, es un anticuerpo monoclonal humanizado como antagonista del receptor de la IL-6. Aprobado en 2017 para su uso combinado con metotrexato como tratamiento de artritis reumatoide moderada y severa cuando se han tenido una respuesta inadecuada o intolerancia hacia el tratamiento con Drogas Modificadoras de la Artritis Reumatoide (DMARDs).

Actemra (tocilizumab) producido por Genentech, es un anticuerpo monoclonal humanizado como antagonista del receptor de la IL-6. Aprobado en 2010 para el tratamiento de artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil poliarticular.

Sylvant (siltuximab) producido por Janseen Biotech, es un anticuerpo monoclonal humanizado neutralizante de la IL-6. Aprobado en 2014 para el tratamiento de la enfermedad de Castleman multicéntrica.

Kineret (anakinra) producido por Biovitrum AB, es un antagonista del receptor de la IL-1 β , es un péptido recombinante no glucosilado. Aprobado en 2009 para el tratamiento de los síndromes periódicos asociados a la criopirina, síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, síndrome de hiperinmunoglobulina D, fiebre mediterránea familiar y artritis idiopática juvenil sistémica.

Ilaris (canakinumab) producido por Novartis Pharms, es anticuerpo monoclonal humanizado antagonista de la IL-1 β . Aprobado en 2011 para el tratamiento de artritis reumatoide, síndromes periódicos asociados a la criopirina, el síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío y el síndrome de Muckle-Wells.

Existen también otros tratamientos aún en fase de desarrollo o en ensayos clínicos para neutralizar el complejo del receptor soluble de la IL-6. El primero es un péptido de fusión del receptor gp130 soluble, unido a la fracción cristalizable de un anticuerpo humano (IgG) denominado Olamkicept y desarrollado por Rose-John (2017), este péptido se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I para ser utilizado en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (Schreiber et al., 2021). El segundo es un anticuerpo monoclonal desarrollado por Chou et al. (2022) y dirigido hacia el epítipo conformacional generado entre la IL-6 y su receptor soluble, el cual interactúa directamente con el receptor transmembranal gp130 para activar la vía de señalización *trans* de esta citocina. Este último anticuerpo aún no se encuentra en ensayos clínicos y como Olamkicept no han sido aprobados para ser utilizados como tratamientos en humanos.

1.1.5 Inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígeno (IgNAR)

Las inmunoglobulinas de nuevo receptor de antígeno (IgNAR, por sus siglas en inglés), fueron identificadas en 1995 por Fläjnik et al., en el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*) (Greenberg et al., 1995). Las cadenas pesadas de los IgNAR se conforman por cinco dominios constantes (cNAR, por sus siglas en inglés) y un dominio variable (vNAR, por sus siglas en inglés). Los vNAR pueden ser separados de las IgNAR sin perder su capacidad de reconocimiento (Gasperín-Bulbarela, 2021) y se obtienen a partir de la inmunización del tiburón o por bibliotecas sintéticas, la ingeniería de anticuerpos ha permitido obtener en menor tiempo vNARs con mayor afinidad por su antígeno, estas características los perfilan como plataformas biológicas eficientes (Zielonka et al., 2014).

Los vNAR se conforman por dos regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), CDR1 y CDR3, que están conectadas por dos regiones hipervariables (HV), HV2 y HV4, que en algunas ocasiones pueden interactuar con el antígeno aparte de los CDRs (Gasperín, 2021). El carecer de la región variable ligera los hace más pequeños, con un tamaño aproximado de 12 KDa, esto los diferencia de los anticuerpos monoclonales convencionales, y esto permite que tengan una penetración más profunda en los tejidos. Los vNARs se forman solo de cadenas pesadas y compensan la falta de los CDRs de la cadena ligera por medio de un fragmento largo sobresaliente del CDR3, siendo capaces de alcanzar epítomos crípticos o de difícil acceso (Nuttall et al., 2004; Stanfield et al., 2004).

En los IgNAR, el proceso convencional de diversificación combinatoria ocurre de manera no convencional en la región CDR3. En esta región, la diversificación se genera por una hipermutación somática que es dirigida por los antígenos, especialmente en un codón conformado por AGC/T definido como “punto caliente” donde se generan una gran cantidad de mutaciones. Las mutaciones en estas posiciones tienen relación con el aumento de la afinidad por parte del CDR3 a su antígeno (Dooley et al., 2003). Los vNAR se clasifican en cinco tipos por el número y posición de cisteínas no canónicas presentes en el dominio, patrón de enlaces disulfuro y el tiempo de aparición durante el desarrollo del tiburón (Cabanillas-Bernal et al., 2019).

Los vNAR han demostrado ser moléculas eficientes en el diagnóstico de enfermedades virales, detección de toxinas y en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, cáncer y enfermedades infecciosas (Cheong, et al., 2020). Además, gracias al uso de técnicas de ingeniería de anticuerpos, se pueden obtener fácil y rápidamente, tienen una mayor penetración en los tejidos, lo que les confiere una mayor efectividad contra su blanco y un perfil farmacocinético ideal por su tiempo corto

de permanencia en la sangre (Zielonka et al., 2015). Por lo tanto, los vNAR representan herramientas biológicas ideales para ser utilizados en el tratamiento de síndromes de inflamación sistémicos causados por infecciones virales graves, como es el CRS.

1.2 Justificación

El síndrome de liberación de citocinas inducido por infección viral severa es una patología grave asociada con desenlaces mortales. Las terapias disponibles actualmente para este síndrome son escasas, con efectividad limitada e interfieren en la respuesta inmunológica, resultando contraproducente para la salud del paciente. La IL-6 y la IL-1 β son blancos para el tratamiento de procesos inflamatorios y en el CRS ambas contribuyen a su iniciación, siendo IL-6 la responsable de la propagación del síndrome. Sin embargo, en el caso de IL-6 los tratamientos no se han enfocado a bloquear la vía proinflamatoria de esta citocina para evitar interferir con las respuestas inmunológicas. En el caso de IL-1 β , el uso de mAbs tiene desventajas por su gran tamaño, baja capacidad de unión y modulación de sus dianas intracelulares. Los vNAR representan una alternativa eficaz como inhibidores del SIL6R e IL-1 β , ya que por su tamaño reducido permiten una mayor penetración en los tejidos. También, su alta afinidad y especificidad por el antígeno y sus propiedades biofísicas, como resistencia a altas temperaturas (95°C) les confieren ventajas para su uso como fármacos, ya que no necesitarán de refrigeración para su transporte, todo lo anterior los hace ideales para su uso como moléculas neutralizantes de citocinas. Es por ello, que este trabajo tiene como finalidad aislar y caracterizar anticuerpos tipo vNAR, a partir de bibliotecas sintéticas, para neutralizar *in vitro* al receptor SIL6R y para neutralizar IL-1 β . Con la obtención de estos vNAR, se contribuirá ampliando la cantidad de terapias disponibles, ya que podrán representar una alternativa terapéutica, con gran potencial para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas, y otras patologías asociadas a la inflamación sistémica severa generada por patógenos.

1.3 Hipótesis

Los anticuerpos tipo vNAR obtenidos de una biblioteca sintética tendrán capacidad neutralizante contra el SIL6R y de la IL-1 β .

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Contribuir con el desarrollo de tratamientos potenciales, enfocados en la inhibición de las vías proinflamatorias inducidas por la IL-6 e IL-1 β .

1.4.2 Objetivos específicos

Identificar vNARs con capacidad de reconocimiento contra el SIL6R e IL-1 β .

Determinar la capacidad de inhibición de la respuesta proinflamatoria que promueve la interleucina 6.

Determinar la capacidad de inhibición de la respuesta proinflamatoria que promueve la interleucina 1 β .

Capítulo 2. Metodología

2.1 Preparación de células electrocompetentes

2.1.1 *E. coli* ER2738

Para la preparación de las células de *Escherichia coli* (*E. coli*) ER2738, se siguió la metodología establecida por Barbas et al. (2001) con ligeras modificaciones. Se partió de estriar en una placa de agar Luria-Bertani (LB) (Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Agar 0.15%, pH 7.0) con tetraciclina (12 µg/mL), una asada de un inóculo de las células de *E. coli* ER2738 preparadas en abril del 2021 y se incubó toda la noche (12-18 h) a 37 °C. Para aislar las células macho que expresen el factor F' y que puedan ser infectadas por los bacteriófagos en el ensayo de despliegue de fagos. Al día siguiente se preparó el preinóculo, se inocularon 10 mL de medio Super Broth (SB) (Peptona de caseína 3.2%, extracto de levadura 2%, NaCl 0.5%, pH 7.0) precalentado a 37 °C en un tubo Corning de 50 mL, se incubó toda la noche a 37 °C, con una agitación de 5 g en el agitador RAMbio® (Applikon Biotechnology). Posteriormente, en un matraz estéril de un litro con 300 mL de medio SB, se añadieron 5 mL del preinóculo, 10 mL de glucosa (20% w/v) y 3 mL de cloruro de magnesio (MgCl₂ 1 M). Se incubó con una agitación de 5 g a 37 °C por dos horas y se midió la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) en el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIORAD), se utilizó como blanco una celda con 1 mL de medio SB, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6. Se dividió el cultivo en 6 tubos Corning de 50 mL y se colocaron en hielo por 10 minutos, se centrifugaron a 3000 g por 20 minutos a 4 °C en la centrifuga HERAEUS MULTIFUGE 1 S-R (Marshall Scientific). Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 40 mL de glicerol frío al 10%, se combinaron 3 sedimentos en 3 tubos Corning de 50 mL y se centrifugaron a las mismas condiciones. Se repitió el paso anterior hasta obtener un sedimento casi de color blanco. Una vez obtenido el sedimento blanco se combinaron los 3 sedimentos resuspendidos en un solo tubo y se centrifugó nuevamente a 2500 g por 15 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante obtenido y se resuspendió el sedimento en 1.5 mL de glicerol al 10% (v/v). Se prepararon alícuotas en volúmenes de 7, 25 y 50 µL. y se realizaron las pruebas de competencia y contaminación correspondientes.

Se realizaron las pruebas de competencia siguiendo el protocolo de Barbas et al. (2001). Para la prueba de competencia, se transformaron las células de *E. coli* ER2738 con el plásmido Pet22b (Novagen). Se colocaron las celdas de electroporación, el plásmido Pet22b y las alícuotas de las células

electrocompetentes por 10 minutos en hielo. Se procedió a añadir 1 μL del plásmido Pet22b, con una concentración de 10 $\text{pg}/\mu\text{L}$, a una alícuota de 50 μL de *E. coli* ER2738, se incubó por 1 minuto y se transfirió a una celda de electroporación E- coli Pulser[®] (BIORAD) con una separación de 2 mm, sin generar burbujas y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo se realizó la electroporación de las células, utilizando el equipo MicropulserTM (BIORAD) a 2.5 kV, 25 μF y 200 Ω , lo que corresponde al programa EC2. Como control positivo, se transformó una alícuota de 50 μL de *E. coli* ER2738 con 1 μL de agua destilada. Se enjuagaron las celdas con 3 mL de medio SOC (Peptona de caseína 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.058%, KCl 0.018 %, 1 M MgCl_2 1 %, 1 M MgSO_4 1%, 2 M glucosa 1 %) y se colocaron los 3 mL en tubos Corning estériles de 15 mL, se incubaron a 5 g por 1 hora 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se sembraron 50 μL del medio incubado en una placa de LB + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se diluyó al añadir 7 mL de medio SB al tubo que contenía los 3 mL de medio SOC y partiendo de esta dilución se sembraron 10 y 100 μL de volumen en placas de LB + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), del control positivo se sembraron 50 μL transformados en una placa de LB y se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se realizó el conteo de células y el cálculo de la competencia utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Competencia} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{\text{Volumen plaqueado } (\mu\text{L})} \times \frac{3 \times 10^3}{1000 \text{ pg}} \times \frac{1 \times 10^6}{1 \mu\text{g}} \quad (1)$$

Una vez realizada la dilución con 7 mL de medio SB,

$$\text{Competencia} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{\text{Volumen plaqueado } (\mu\text{L})} \times \frac{1 \times 10^4}{1000 \text{ pg}} \times \frac{1 \times 10^6}{1 \mu\text{g}} \quad (2)$$

Se realizó la prueba de contaminación con el fagémido pComB3x, para lo cual se sembraron 25 μL de *E. coli* ER2738 en una placa de agar LB+ carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); la prueba de contaminación con fago ayudador, en la cuál se sembraron 25 μL de *E. coli* ER2738 en una placa de agar LB+ Kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$); y la prueba de contaminación con fago lítico para la cual se añadieron 25 μL de *E. coli* ER2738 a 3 mL de TOP agar LB (Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Agar 0.7%) caliente (40 °C), se mezcló y se vació en una placa de LB, todas las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

2.1.2 *E. coli* TG1

Para la preparación de las células de *E. coli* TG1 se siguió la metodología establecida por Chai et al. (2021) con ligeras modificaciones. Se partió de estriar en una placa de agar LB una asada de una alícuota del stock de células TG1, para obtener colonias aisladas. Se incubó a 37 °C durante toda la noche en la incubadora MaxQ400 (Thermo Scientific). Posteriormente se preparó el preinóculo, se tomó una colonia grande y aislada con un asa microbiológica estéril y se sembró en 10 mL de medio LB precalentado a 37 °C en un tubo Corning de 50 mL, se incubó durante toda la noche a 5 g a 37 °C en el agitador RAMbio® (Applikon Biotechnology). Al día siguiente, se inocularon 460 mL de medio 2 xYT (1.6% (w/v) triptona, 1.0 % (w/v) extracto de levadura, 0.5% NaCl y 1.5% 8 w/v) con 7.8 mL de preinóculo, el volumen total se repartió entre dos matraces de un litro, con 230 mL cada uno, se incubaron a 37 °C, 5 g durante dos horas. Se midió la OD₆₀₀ a las 2 horas de incubación con el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (BIORAD), utilizando como blanco una celda que contenía 1 mL de medio 2xYT. Una vez alcanzada la OD₆₀₀ deseada de 0.45-0.5, se incubaron ambos matraces en hielo durante 30 minutos. Se transfirió el cultivo a 6 tubos Corning de 50 mL y se centrifugaron a 10, 245 g por 10 minutos a 4 °C en la centrifuga HERAEUS MULTIFUGE 1 S-R (Marshall Scientific), posteriormente se desechó el sobrenadante, se añadió el resto del cultivo del segundo matraz a los mismos tubos y se centrifugó con las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 40 mL de solución HEPES (1 mM) fría, se centrifugó a las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante para resuspender el sedimento en 40 mL de glicerol frío al 10 %, se combinaron los 6 tubos en 2 tubos Corning de 50 mL y se centrifugaron a las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron los dos sedimentos en 40 mL de glicerol al 10% y se combinaron en un solo tubo. Se repitió el paso anterior dos veces más. Finalmente, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 750 µL de glicerol al 10 % (v/v). Se prepararon alícuotas en volúmenes de 7, 25 y 50 µL.

Se determinó la competencia de las células de *E. coli* TG1 y se realizaron las pruebas de contaminación como se describió en 2.1.1.

2.2 Preparación fago ayudador M13K07

Se siguió la metodología establecida por Barbas et al. (2001), se inocularon 2 mL de medio SB con 2 µL de *E. coli* ER2738, con un título de competencia de 1.37×10^{-7} , se incubaron a 37 °C con 5 g por una hora. Se prepararon diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} del fago ayudador comercial M13K07 en medio SB partiendo de

una concentración inicial del fago de 10^{-11} . Se añadió 1 μL de cada dilución a 50 μL de *E. coli* ER2738 y se infectaron 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló cada dilución con 3 mL de TOP agar LB caliente, se vertieron en una placa de agar LB por separado y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se inocularon 10 μL de *E. coli* ER2738 en 10 mL de medio SB atemperado en un tubo Corning de 50 mL, se incubó a 5 g a 37 °C, 1 hora. Con ayuda de una punta de 1000 μL se transfirieron 3 placas líticas de la caja Petri con agar LB inoculada con el cultivo infectado de *E. coli* ER2738, se incubó a las mismas condiciones por dos horas. Este cultivo infectado, se transfirió a un matraz de 1 L, con 250 mL de medio SB atemperado a 37 °C, se añadieron 350 μL de kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para obtener una concentración final de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubó toda la noche a 37 °C con una agitación de 5 g. Al día siguiente se transfirió el cultivo a tubos Corning de 50 mL y se centrifugaron a 2500 g por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante a 6 tubos nuevos y se incubaron a baño maría a 70 °C por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 g en la centrifuga HERAEUS MULTIFUGE 1 S-R (Marshall Scientific) por 15 minutos y se realizaron alícuotas de 13 mL en tubos Corning nuevos de 15 mL y se guardaron a 4 °C.

Se determinó el título del fago ayudador, al preparar un cultivo de 2 μL de *E. coli* ER2738 en 2 mL de medio SB que se incubó 1 hora a 37 °C con 5 g de agitación. Paralelamente, se prepararon las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} en medio SB a partir del fago recién preparado. Se colocaron 50 μL del cultivo de *E. coli* ER2738 en tubos de 0.6 mL y se les añadió 1 μL de las diluciones previamente preparadas, se infectaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron esos 50 μL a 3 mL de TOP agar LB (40 °C) y se vertieron sobre una placa de agar LB, se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se determinó el título del fago ayudador contando las placas formadas en las cajas Petri de agar LB. Para determinar el título del fago, se tomó en consideración que 50 placas de la dilución de 10^{-8} corresponden a 5×10^{12} pfu/mL (unidades formadoras de placas por mililitro). El título esperado del fago ayudador se encuentra en un rango entre 10^{12} y 10^{13} .

2.3 Bioselección a partir de bibliotecas sintéticas de fagos que reconozcan la IL-1 β y el IL6R/IL6

Para la obtención del fragmento vNAR se utilizaron las tres bibliotecas sintéticas (VS0, VS1 y VS2) previamente generadas por el laboratorio de Inmunología molecular y biotoxinas del departamento de innovación biomédica de CICESE.

2.3.1 Reamplificación de las bibliotecas VS0, VS1 y VS2

La reamplificación de la biblioteca se realizó por medio del método de despliegue de fagos, se siguió la metodología establecida por Barbas et al. (2001). Se utilizaron las 3 bibliotecas sintéticas del grupo de trabajo y las células de *E. coli* ER2738 electrocompetentes que fueron infectadas con las bibliotecas sintéticas. Se inocularon 50 mL de medio SB en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril y se incubó a 10 g por 3 h a 37 °C en el agitador RAMbio® (Applikon Biotechnology), hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1. Se agregaron 110 µL de la biblioteca VS0, concentración final 1.32x10¹¹; 35 µL de VS1, concentración final 1.40x10¹¹; 5 µL de VS2, concentración final 1.7x10¹¹, se homogenizó manualmente y se incubó a temperatura ambiente por 20 min (en el caso de la bioselección de IL6/IL6R se aumentó el tiempo de infección a 25 minutos, se utilizó un tiempo intermedio respecto a lo reportado en la literatura para asegurar que las partículas de fago infectarán a las *E. coli* ER2738, ya que el protocolo de Barbas et al. (2001) sugiere un tiempo de infección de 15 minutos y Cabanillas-Bernalet et al. (2019) utilizaron 30 minutos para la infección, durante la preparación de bibliotecas sintéticas de anticuerpos). Se añadieron 10 µL del antibiótico carbenicilina (100 mg/mL) con una concentración final de 20 µg/mL, se homogenizó y se preparó la dilución de 10⁻⁴ en medio SB. Para determinar el título de la biblioteca se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL: 990 µL de medio SB y 10 µL del cultivo infectado para obtener la dilución de 10⁻²; se colocaron 990 µL de medio SB y 10 µL de la dilución de 10⁻². Una vez obtenida la dilución se sembró 1 y 10 µL de la dilución 10⁻⁴ en placas de LB + carbenicilina y se incubó toda la noche a 37 °C. Se transfirió el cultivo inicial del matraz de 250 mL a uno de 500 mL y se colocó en el mismo agitador con 10 g a 37 °C por 1 h. Se añadieron 15 µL de carbenicilina (100 mg/mL), para una concentración final de 50 µg/mL, se incubó por 1 h a 10 g a 37 °C. Se infectó el cultivo con 8 mL del fago ayudador M13K07 (6x10¹¹) se añadieron 75 µL de carbenicilina (100 mg/mL) con una concentración final de 20 µg/mL y 143 mL de medio SB para obtener un volumen final de ≈200 mL (en el caso de la bioselección contra IL6R/IL6 se añadieron 9 mL del fago M13K07, 142 mL de medio SB y el volumen de carbenicilina se mantuvo igual). Se incubó a 10 g a 37 °C durante 1.5-2 h. Se añadieron 280 µL de kanamicina (50 mg/mL) con una concentración final de 70 µg/mL y se incubó a 12 g con 37 °C durante toda la noche. El antígeno de interés (IL-1B o IL6R-IL6) se inmovilizó en dos pozos de la placa de ELISA, se añadieron 50 µL por pozo del antígeno para tener una concentración final de 250 ng por pozo y se incubó a 4 °C toda la noche.

Al día siguiente, en un tubo estéril de 15 mL, se inocularon 5 mL de medio SB con 5 µL de *E. coli* ER2738 (durante la bioselección contra IL-6R/IL-6 se inocularon 6 mL de medio SB con 6 µL de *E. coli* ER2738), se incubaron a 10 g a 37 °C durante 3 h hasta alcanzar una OD₆₀₀=1. El cultivo de 250 mL preparado para la reamplificación de las bibliotecas del día anterior, se dividió en 5 tubos Corning de 50 mL estériles con 40

mL cada uno y se centrifugaron a 10 000 rpm a 4 °C por 15 min en la centrifuga HERAEUS MULTIFUGE 1 S-R (Marshall Scientific). Se realizó la precipitación de los fagos, al transferir el sobrenadante a tubos nuevos estériles y se añadieron 8.7 mL de PEG800 20% + NaCl 2.5 M hasta alcanzar una concentración de 4% de PEG8000. Se mezcló en el vórtex y se incubó en hielo 30 min. La solución obtenida de fagos sedimentados, se centrifugó a 10 000 g a 4 °C por 15 min. Se desechó el sobrenadante y se drenaron los tubos sobre papel desecante durante 10 min. Los sedimentos recuperados, se lavaron 10 veces con 2 mL de BSA al 1% por cada lado del sedimento. Se recuperaron los 2 mL y se transfirieron al siguiente tubo para realizar los demás lavados. Al terminar los lavados se recuperaron los 2 mL y se colocaron en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL (1 mL cada uno) y se centrifugaron 5 minutos a 14 000 rpm a 4 °C en la microcentrifuga Centrifuge 5417R (Eppendorf). El sobrenadante se filtró a través de un acrodisco de 0.2 µm (ThermoScientific-Nalgene) y se recuperó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL estéril, en este punto se tenían las bibliotecas reamplificadas y listas para utilizarse en las rondas de bioselección.

2.3.2 Rondas de bioselección de fagos que reconocen IL-1β o IL6R/IL6 (Biopanning)

De acuerdo con la metodología establecida por Barbas et al. (2001), se realizaron 4 rondas de bioselección para obtener los fagos que reconozcan a la IL-1β o IL6R/IL6. Se descartó el exceso de antígeno no fijado el día anterior de los dos pozos, se añadieron 150 µL de solución de bloqueo (PBS-BSA 3%) a cada pozo y se incubó 1 hora a 37 °C. Se descartó la solución de bloqueo y se añadieron 50 µL de los fagos obtenidos de la reamplificación de las bibliotecas y se incubaron a 37 °C por 1 hora. Se colocó un cultivo de 5 µL de *E. coli* ER2738 electrocompetentes en 5 mL de medio SB y se incubó a 37 °C a 10 g hasta alcanzar una OD₆₀₀=1 (en la bioselección contra IL6R/IL6, se inocularon 6 mL de medio SB con 6 µL de *E. coli* ER2738). Se descartó la solución del fago de la placa y se añadieron 150 µL de solución de lavado (PBS-Tween20 0.5%) a cada pozo, se realizaron lavados al pipetear de arriba hacia abajo 5 veces, se descartó la solución de lavado y se repitió este paso 5 veces en la primera ronda, en cada ronda se aumentó el número de lavados; 10 en la segunda, 15 en la tercera y 20 en la cuarta. Una vez terminados los lavados se agregó 50 µL de tripsina (10 mg/mL en TBS, preparada al momento) a cada pozo, se tapó la placa y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Se recuperaron los 100 µL de fago al pipetear ambos pozos arriba y abajo 10 veces y se utilizaron para infectar los 2 mL del cultivo de *E. coli* ER2738 (OD₆₀₀=1). Se incubó el cultivo infectado a temperatura ambiente por 20 minutos (25 minutos de infección en la bioselección contra IL6R/IL6) y se añadieron 6 mL de medio SB y 1.6 µL de carbenicilina (100 mg/mL).

Se determinó el título de salida de fagos, al diluir 2 μL del cultivo infectado en 200 μL de medio SB, se sembraron 10 μL y 100 μL de la dilución en placas de Agar LB + carbenicilina (100 mg/ μL) y se incubaron a 37 °C toda la noche. El cultivo infectado de 8 mL restante se incubó a 37 °C, 10 g por 1 hora.

Para el título de entrada de fagos se prepararon diluciones de 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} y 10^{-12} de los fagos obtenidos en la reamplificación (obtenidos de la ronda previa de bioselección) en medio SB. Se infectaron 50 μL de *E. coli* ER2738 con las diluciones 10^{-9} y 10^{-12} y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente (25 minutos de infección en la bioselección contra IL6R/IL6). Se sembraron los 50 μL de cultivo infectado en placas de Agar LB + carbenicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37 °C toda la noche.

Una vez transcurrida la hora de incubación del cultivo infectado de *E. coli* ER2738, se añadieron 2.4 μL de carbenicilina (100 mg/mL) y se incubaron a 37 °C, 10 g por 1 hora. Posteriormente, se añadieron 8 mL del fago ayudador M13K07 (10^{-11}), se transfirió el cultivo a un matraz de 500 mL y se añadieron 84 mL de medio SB y 46 μL de carbenicilina (100 mg/mL), se incubó a 37 °C, 10 g toda la noche (durante la bioselección contra IL6R/IL6, se añadieron 9 mL de fago ayudador M13K07, 83 mL de medio SB y el volumen de carbenicilina se mantuvo igual). Se inmovilizaron 50 μL de antígeno (5ng/ μL), para tener una concentración de 250 ng, en por pozo y se incubaron a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se recuperaron los fagos de acuerdo a los pasos mencionados anteriormente para la reamplificación y las rondas de bioselección siguientes, se aumentó la cantidad de lavados, se añadieron 4 mL de fago ayudador M13K07 y 88 mL de medio SB (en la bioselección contra IL6R/IL6, se mantuvo el número de lavados, sin embargo, durante las últimas dos rondas de bioselección se añadieron 5 mL de fago ayudador M13K07 y 87 mL de medio SB). Los títulos de salida en la última ronda de bioselección contra IL6R/IL6 se realizaron por duplicado.

2.3.3 Búsqueda de clonas funcionales por PCR

Se seleccionaron y analizaron las colonias obtenidas a partir de los títulos de salida de las rondas 3 y 4 de los procesos de bioselección. Para lo anterior, se prepararon las muestras al picar con un palillo estéril la colonia de interés, se estrió en una placa nueva y se realizó un lavado del palillo en un tubo con 20 μL de agua bidestilada estéril. Durante la bioselección de IL-1 β se utilizó esta agua de colonia para detectar aquellas colonias que presentaran el fragmento vNAR de interés por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de cada colonia utilizando como oligonucleótido “*forward*” u Ompseq (5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCAG-3') y “*reverse*” o Gback (5'-GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC

ATC-3'), se siguió la fórmula de la tabla 1 para preparar la reacción de PCR, y como muestra de ADN se utilizó el agua donde se lavó el palillo utilizado para sembrar del resembrado de las colonias (Cabanillas-Bernal et al., 2019).

Al momento de realizar la bioselección de IL6R/IL6 se contaba con un nuevo protocolo de PCR para identificar colonias que fueran idénticas a las bibliotecas originales (VS0, VS1 y VS2) utilizadas en el proceso de bioselección (PCR STOP). Por lo que antes de realizar la PCR para detectar la presencia del fragmento vNAR de interés, se realizó esta nueva PCR. Se utilizaron 3 oligonucleótidos “*forward*” diseñados para reconocer los 3 codones de paro que presentan las secuencias de las bibliotecas en su CDR3: StopVS0 (5'-TAT TGC TGA TGA TGA AAG GC-3'); StopVS1 (5'-TAT TGT TGA TAA TAA AAT GC-3') y StopVS2 (5'-TAT TGC TGA TAA TAA AAA GC-3'). Para el oligonucleótido “*reverse*” se utilizó el Gback. Como muestra de ADN se empleó el agua de colonia, se preparó un volumen de reacción total de 20 μ L y se siguió la fórmula de la tabla 1 para preparar el “*master mix*”. Una vez seleccionadas aquellas clonas que no pertenecieran a las bibliotecas, se realizó la PCR para identificar las clonas que presentaban el fragmento vNAR de interés, como se describió para el proceso de bioselección contra IL-1 β . Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con lo descrito en la Tabla 2 en los dos procesos de bioselección.

Tabla 1. Reactivos y volumen utilizados para una reacción de PCR de 20 μ L.

Reactivos	Volumen (μ L)
Mix 5x buffer green	4
MgCl ₂ (25 mM)	2.4
dNTPs (2.5 mM)	1.6
Oligonucleótido Ompseq (10 mM)	0.4
Oligonucleótido Gback (10 mM)	0.4
GoTaq (5 U/ μ L)	0.1
H ₂ O libre de nucleasas	9.1
Muestra (ADN)	2

Los productos de la amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2% durante 30 min a 100 V con la fuente de poder EC 3000 XL (ThermoScientific), se visualizaron con el fotodocumentador E-gel imager (Life Technologies).

Tabla 2. Condiciones de corrida de PCR de colonia para PCR STOP y detección del fragmento vNAR

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	2'	1
95	15''	30
55	15''	
72	45''	
72	5'	1
4	∞	

2.3.4 Secuenciación

Las muestras que mostraron la presencia de un fragmento vNAR con el tamaño esperado, se enviaron a SeqXcel, San Diego para su secuenciación. Posteriormente se analizaron las secuencias utilizando el software CLC Genomics Workbench 22.0 (QIAGEN), se determinó el marco de lectura correcto de las secuencias, y se seleccionaron aquellas que no presentaban codones de término en el CDR3. De las clonas funcionales obtenidas, se determinó el tamaño del vNAR de interés con este mismo software (Cabanillas-Bernal et al.,2019).

2.3.5 Extracción y purificación del plásmido por lisis alcalina

Se extrajo el plásmido de la, o las clonas funcionales de *E. coli* ER2738 de acuerdo con el protocolo de Sambrook (1989). Se preparó un cultivo de 5 mL en medio SB suplementado con 10 µL de carbenicilina (50 mg/mL) para tener una concentración final de 100 µg/mL, se incubó toda la noche a 37 °C con 7 g de

agitación. Al día siguiente, se tomaron 2 mL del cultivo y se transfirieron a un tubo de 2 mL estéril, se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min a 4 °C en la microcentrífuga Centrifuge 5417R (Eppendorf). El sobrenadante se descartó y se resuspendió el sedimento en 100 µL de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, ácido etilendiaminotetraacético 10 mM pH 8.0) y 4.5 µL de RNAasa (4 mg/mL), se agitó vigorosamente en el vortex. Se añadieron 150 µL de solución SDS 1%-NaOH 0.2 N, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Se añadieron 200 µL de acetato de potasio 5 M, pH 4.8, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 14 000 rpm, 15 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se adicionaron 800 µL de etanol al 100% y se agitó vigorosamente en el vortex, se incubó por 30 minutos a -80 °C. Se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 mL de etanol al 75 %. Se centrifugó a 14 000 rpm, 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se mantuvo el tubo invertido hasta que todo el etanol se evaporara. Se resuspendió el sedimento en 100 µL de agua libre de nucleasas. Se determinó la pureza y la concentración del plásmido usando un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific) y la integridad del plásmido por medio de una electroforesis en gel de agarosa a 1.2 %, donde se mezcló 1 µL del plásmido recién obtenido con 1 µL de solución de carga 5X (Promega) y 4 µL de agua libre de nucleasas, se cargaron 3 µL de la mezcla, se corrió por 1 h a 110 V con la cámara EC 3000 XL (ThermoScientific) y se visualizó con el fotodocumentador E-gel imager (Life Technologies).

2.4 Expresión y evaluación del vNAR recombinante

2.4.1 Preparación de células *E. coli* BL21 (DE3)

Se siguió la metodología de Sprotocols (2014), se plaquearon 50 µL del stock de *E. coli* BL21 (DE3) en una placa de agar LB y se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se tomó una colonia aislada y se añadió en un cultivo de 10 mL de medio LB (preinóculo), se dejó incubando toda la noche, con una agitación de 5g a 37 °C. Posteriormente se tomaron 3 mL del preinóculo y se inocularon en 300 mL de medio SB suplementado con 6 mL de glucosa 20 % (w/v); 1.5 mL de cloruro de magnesio (MgCl₂ 3 mM). Se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.3. Una vez alcanzada la OD₆₀₀ deseada, se repartió el cultivo en tubos Corning de 50 mL nuevos y se incubaron 15 minutos en hielo. Al concluir la incubación se centrifugaron a 3000 g por 20 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 mL de cloruro de calcio (CaCl₂ 100 mM), se completó el volumen con 10 mL de CaCl₂ y se juntaron dos tubos en uno para tener un volumen final de 24 mL. Se centrifugaron de nuevo a 3000 g por 10 min a 4 °C.

Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en CaCl_2 como se mencionó previamente y se centrifugó a las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 mL de 85% de CaCl_2 (100 mM) y 15% de glicerol (100 %). Se prepararon alícuotas de 3, 25 y 50. Se transformaron las células por medio de choque térmico para poder determinar su eficiencia. Para esto se colocaron en hielo por 5 min una alícuota de 50 μL de las células *E. coli* BL21 (DE3) recién preparadas y el plásmido Pet22b (1 ng/ μL). Se añadió 1 μL del plásmido a las células, se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y se incubaron por 30 min en hielo. Transcurrida la incubación se colocó el tubo con las células en el ThermoStat Plus (Eppendorf) a 42 °C durante 1 min. Al concluir el tiempo se regresaron las células al hielo por 2 min y se añadieron 950 μL de medio SOC. Se incubó a 37 °C por 2 h a 5 g. Se plaquearon volúmenes de 50, 100 y 200 μL , se incubaron durante 24 h a 37 °C. Se calculó la eficiencia de transformación utilizando la formula 1 ajustando el volumen y se realizaron las mismas pruebas utilizadas para *E. coli* ER2738 y TG1.

2.4.2 Cinética de expresión del vNAR recombinante a pequeña escala

Se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) por medio de choque térmico con 10 ng del plásmido de interés previamente purificado. Se preparó un preinóculo con una colonia de las células transformadas, la cual se sembró en 25 mL de medio SB con 50 μL de carbenicilina concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incubó toda la noche a 37 °C, 7 g en el agitador MaxQ 400 (ThermoScientific).

Se inocularon 988 mL de medio SB, adicionado con 2 mL de carbenicilina (50 mg/mL), con 10 mL del preinóculo preparado el día anterior, se incubó a 37 °C, 7 g hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0.6-0.7$. Una vez alcanzada la OD_{600} esperada, se tomaron 3 muestras de 800 μL y se añadieron a 3 crioviales de 1.5 mL (TPP) con 200 μL de glicerol (100%) estéril, estas alícuotas se guardaron a -80 °C. El medio restante se repartió en matraces de 250 mL con 100 mL del cultivo cada uno y se añadieron diferentes volúmenes de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido 0.5 M (IPTG): 20 μL para la concentración final de 0.1 mM; 100 μL para la concentración final de 0.5 mM; 200 μL para la concentración final de 1 mM y se mantuvo un control al cual no se le añadió IPTG, para inducir la expresión de las proteínas de interés. Se incubaron a dos temperaturas diferentes (30 °C y 37 °C) y se tomaron muestras de 10 mL a las 3, 6, 12 y 24 horas.

Las muestras recolectadas se centrifugaron a 4500 g por 20 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril, los sedimentos y el sobrenadante se guardaron a -20 °C. A partir de los sedimentos se realizó la extracción de la proteína de interés.

Para los vNARs obtenidos durante la bioselección anti IL6R/IL6, se transformaron las células *E. coli* BL21 (DE3), con los plásmidos de las 18 clonas funcionales. Se expresaron las clonas que se pudieron transformar exitosamente y se utilizaron las condiciones generales utilizadas en el grupo de investigación: 37° C, 0.5 mM IPTG, 250 rpm, con la modificación de 24 horas para su expresión. Posteriormente se extrajo la proteína por medio de lisis periplásmica y se seleccionaron los vNARs que tuvieran la mejor expresión, al menos el doble de la expresión obtenida del control negativo (leche al 5%) para probar su reconocimiento por el antígeno (Cabanillas-Bernal et al., 2019).

2.4.3 Extracción citoplásmica del vNAR recombinante

La extracción de la proteína se realizó mediante sonicación, con el sonicador (Q125, 1/8" Probe, QSonica, 110V), previo a la sonicación, se resuspendieron los sedimentos obtenidos de la cosecha de la expresión de la proteína recombinante en 2.5 mL de tampón de lisis NPI40 (2.4 g NaH₂PO₄ H₂O; 14.611g NaCl; 1.362 g C₃H₄N₂, pH 7.4). Se aplicó ultrasonido a cada sedimento con una amplitud del 70 %, encendido 30" y apagado 15", en ciclos de 6 minutos. Posteriormente se centrifugó el lisado celular a velocidad máxima (10 000 rpm), 30 min a 4 °C, se recolectó el sobrenadante en tubos limpios y se repitió la centrifugación a velocidad máxima, 20 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó en tubos nuevos y se almacenaron a -20 °C.

Las extracciones se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia del vNAR de interés como se describió en 2.4.5 y los resultados se analizaron mediante un ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 9.0.

2.4.4 Extracción periplásmica de la proteína recombinante

Se utilizó la relación de 8 mL de solución hipérmica por 166 mL de cultivo cosechado por tubo (Tris-HCl 30 mM; sacarosa 20% pH 8.0) para resuspender los sedimentos cosechados de la expresión de la proteína, se adicionaron 20 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M para una concentración final de 1 mM, se incubaron en posición horizontal sobre hielo con agitación suave (40 rpm) en el agitador orbital BenchWaver (BenchMark) por 10 minutos. Se centrifugó a 8000 g, a 4 °C por 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante hipertónico en un tubo limpio y se guardó a 4 °C, el sedimento resultante se resuspendió en el mismo volumen utilizado de solución hipertónica, es decir 8 mL de solución de sulfato de magnesio

(MgSO₄ 5 mM pH 8), se incubó en posición horizontal sobre hielo con agitación suave (40 rpm) en el agitador orbital BenchWaver (BenchMark), se centrifugó a 8000 g, a 4 °C por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Ambos sobrenadantes se analizaron para detectar la presencia del vNAR por medio de un ELISA de expresión, inmunodetección y tinción de Coomassie.

Las extracciones se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia del vNAR de interés como se describió en 2.4.5 y los resultados se analizaron mediante un ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 9.0.

2.4.5 Detección del vNAR recombinante mediante ELISA de expresión

Por duplicado en una placa de 96 pozos se colocaron 50 µL/pozo del lisado obtenido de la extracción citoplásmica o periplásmica o del vNAR puro, se fijaron por 30 minutos a 37 °C. Se bloquearon los pozos con 200 µL de leche al 5%, por una hora a 37 °C. Se retiró la solución y se realizaron de 3 a 5 lavados con 200 µL de PBS. Se añadieron 50 µL/pozo del anticuerpo High affinity anti HA-HRP (Roche) en leche al 3% (1:3000), se incubó por una hora a 37 °C. Se descartó la solución y se realizaron 5 lavados con PBST 0.05% (PBS-Tween 20 0.5%). Se añadieron 50 µL/pozo de solución TMB-Blotting 1-Step™ (Thermo Scientific) y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Se añadieron 50 µL/pozo de solución de paro ácido clorhídrico al 10% (HCl) y se determinó la absorbancia a 450 nm por medio de un lector de placas EPOCH (BioTek). Se utilizó como blanco leche al 5% y como control positivo la proteína anti-CD63 purificada.

2.4.6 Electroforesis desnaturalizante en tricina (Tricina-SDS-PAGE)

Siguiendo la metodología establecida por Schägger y von Jagow (1987), se añadieron 10 µL de la solución de carga 5x (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%) a 40 µL del lisado de la extracción del vNAR o al vNAR puro. Se colocaron las muestras en el ThermoStat Plus (Eppendorf) por 10 min a 95 °C. Se cargaron 20 µL de muestra en un gel al 12% y se corrió a 50mA, 150V hasta observar que el frente de las proteínas marcadas llegue a la base del gel (Vargas-Peralta, 2010; Cabanillas-Bernal et al., 2019).

2.4.7 Tinción Coomassie

Se tiñó uno de los geles por medio de la tinción azul de Coomassie, se lavó el gel con 5 mL de agua tridestilada y se cubrió con 3 a 5 mL de solución de desteñido (45% Metanol; 15% ácido acético; 40% agua bidestilada) por 30 minutos en agitación constante (44 rpm). Se recuperó la solución y se añadieron 3-5 mL de azul de Coomassie (50% metanol; 40% agua; 10% ácido acético; 0.1 % coomassie) y se dejó toda la noche en agitación constante. Al día siguiente se desechó la solución de tinción y se lavó con 5 mL de agua bidestilada, se añadieron 3 a 5 mL de solución de desteñido y se mantuvo de 20 a 30 min en agitación constante (44 rpm). Una vez transcurrido el tiempo se retiró la solución, se enjuagó con agua bidestilada y se añadió más solución de desteñido. Se repitió el procedimiento las veces necesarias hasta lograr que el gel se destiñó completamente.

2.4.8 Inmunodetección del vNAR recombinante (Western Blot)

Se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (BIORAD) a 20 V constantes (200 mA) por 1 hora en un sistema semi-húmedo Trans-Blot SD (BioRad). Se bloqueó la membrana con 10 mL leche al 8% en PBST 0.05% 0.05% (PBS Tween-20 0.05%) por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación moderada. Se lavó la membrana con PBST 0.05% 0.05% (PBS Tween-20 0.05%) y se incubó en 7 mL de una dilución 1:3500 de anticuerpo High Affinity anti-HA acoplado a peroxidasa (Roche) en leche al 1% en PBST 0.05% 0.05% (PBS Tween-20 0.05%) por 1 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Se lavó 3 veces la membrana con PBST 0.05% y se detectaron las proteínas por colorimetría con el kit Pierce Substrate DAB (Thermo Scientific), la reacción se detuvo con 5 mL de agua bidestilada.

2.5 Renaturalización del vNAR W1 β 6 en cuerpos de inclusión

2.5.1 Obtención y clarificación de cuerpos de inclusión

Al sospechar que el vNAR W1 β 6 se encontraba en cuerpos de inclusión se realizó una expresión a pequeña escala con la condición óptima para este vNAR: de 1 mM de IPTG, 12 h, a 37 °C, se realizó la extracción citoplásmica, periplásmica de la proteína y la obtención de los cuerpos de inclusión.

Se siguió la metodología establecida por Palmer y Wingfield (2012) con algunas modificaciones para la obtención de los cuerpos de inclusión. Se resuspendieron los sedimentos, obtenidos de la extracción citoplásmica, en 3 mL de solución de lavado (100 mM Tris HCl, pH 7.0; 2 mM EDTA; 2 mM β -mercaptoetanol), se sonicaron por ciclos de 60 minutos, con 70 % de amplitud, encendido 30" y apagado 15" con el sonicador (Q125, 1/8" Probe, QSonica, 110V). Se centrifugaron a 14 000 g por 30 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los sedimentos obtenidos en 3 mL de solución de lavado adicionado con urea y tritón (Tris HCl 100 mM, pH 7.0; EDTA 2 mM; β -mercaptoetanol 2 mM; Triton X-100 2% (w/v); Urea 2 M). Se sonicaron y centrifugaron con las mismas condiciones, esto se repitió 4 veces hasta obtener un sobrenadante transparente. El sedimento obtenido del último lavado se resuspendió en solución de lavado, sin Tritón X-100 y urea, se centrifugó el sobrenadante se descartó y se guardaron los sedimentos a -20 °C.

2.5.2 Purificación desnaturante por cromatografía de afinidad a metales (IMAC)

Se utilizó el método de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés), con la técnica de cromatografía de afinidad a metales, ya que el vNAR de interés presenta una etiqueta de histidinas que permite que se una al ion níquel (Ni^{2+}). Se utilizó la columna HisTrap™ FF (Fast Flow) de 5 mL (GE HealthCare) precargada con sefarosa de níquel en un equipo FPLC ÄKTA pure (GE HealthCare) con el software UNICORN. La regeneración de la columna, el acondicionamiento del equipo, los lavados y la elución de la proteína se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el manual "The QIAexpressionist" (QIAGEN ©, 2003), con las modificaciones de que se utilizó como solución A al tampón de DNT10 (Tris HCl 0.02M, pH 7.0; Urea 6 M; NaCl 0.3 M) y como solución B al tampón DNT1500 (Tris HCl 0.02M, pH 7.0; Urea 6 M; 0.3 M NaCl; Imidazol 500 mM).

Se realizó un gradiente utilizando diferentes concentraciones de la solución B: 10% (50 mM imidazol); 20% (100 mM imidazol); 30% (150 mM imidazol); 40% (200 mM imidazol); 50% (250 mM imidazol); 60% (300 mM imidazol); 70% (350 mM imidazol); 80% (400 mM imidazol) y 100% (500 mM imidazol), para determinar en qué condición eluyó la mayor parte de la proteína de interés en condiciones desnaturantes. Las fracciones obtenidas de las eluciones, la fracción del "Flow Through" y la fracción del desecho; se realizó la detección del vNAR por medio de un ELISA de expresión y electroforesis desnaturante de tricina como se describió en 2.4.7 y 2.4.8, los resultados del ELISA se analizaron mediante un ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 9.0.

2.5.3 Concentración de proteínas por precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

Se concentraron las proteínas presentes en cada fracción por medio de precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Se les añadió el 20% de TCA (100%) respecto al volumen inicial que se busca concentrar, se incubaron en hielo por 20 minutos, posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm, 4 °C por 15 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 200 µL de acetona (100%) fría, con cuidado se aplicó vortéx a cada tubo. Se centrifugaron a 14 000 rpm, 4 °C por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió 2 veces el lavado con acetona (100 %) fría. Se desechó el sobrenadante y se evaporó el remanente de acetona al colocar los tubos en el ThermoStat Plus (Eppendorf) a 95 °C, se resuspendieron los sedimentos en el volumen específico de solución de carga 1X (SDS 1%; Glicerol 10%; Azul bromofenol 0.02%; Tris-HCl 50 mM; β-mercaptoetanol 1%) dicho volumen depende de cuantas veces se desee concentrar la proteína. Se desnaturalizaron las proteínas concentradas a 95 °C por 10 minutos en el ThermoStat Plus (Eppendorf) y se analizaron las muestras por medio de electroforesis desnaturalizante de tricina como se describió en 2.4.6; 2.4.7 y 2.4.8.

2.5.4 Renaturalización *in situ*: “On column refolding”

Para obtener el vNAR de interés en su conformación nativa y funcional, se siguió la metodología de “On column refolding” establecida por GE Healthcare (1999) con ligeras modificaciones. Para iniciar el proceso de renaturalización es necesario contar con las proteínas solubilizadas. Se solubilizaron los cuerpos de inclusión clarificados al resuspenderlos en 3 mL de tampón de solubilizado A1 (Urea 8M; Tris-HCl 20 mM pH 7.0; NaCl 0.5 M; Imidazol 5 mM; β-mercaptoetanol 1 mM), se incubaron 2 horas en hielo en agitación constante (44 rpm) en un agitador orbital BenchWaver (BenchMark) y se filtró la muestra por un filtro de 0.22µ.

Se acondicionó la columna His Trap FF 5 mL (GE HealthCare) de forma manual utilizando una bomba peristáltica con el tampón de unión A2 (Urea 6 M; Tris-HCl 20 mM; NaCl 0.5 M; Imidazol 5 mM; β-mercaptoetanol 1 mM), simultáneamente se realizó el lavado con agua bidestilada filtrada del equipo de FPLC ÄKTA-prime de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

La muestra de los cuerpos de inclusión solubilizados, se cargó de forma manual por gravedad y se recirculó tres veces para que la proteína de interés se retuviera por afinidad. Una vez cargada la columna se conectó al equipo y se dio inicio con el programa de renaturalización (Figura 3). Se inició con un lavado extendido

de 25 mL con el tampón de unión A2. Se realizó el cambio de tampón al tampón de renaturalización B (20 mM Tris-HCl; 0.5M NaCl; 5 mM Imidazol; 1 mM 2-mercaptoetanol; 100 mM L-Arginina) y se realizó un gradiente de renaturalización hasta alcanzar el 100 % del tampón B. Una vez terminado el gradiente de renaturalización se realizó un cambio de tampón para colocar el tampón de elución A3 (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazol, 1 mM 2-mercaptoetanol, 100 mM L-Arginina), se eluyeron las proteínas con 15 mL de tampón A3 al 30% (150 mM imidazol) y 15 mL del tampón A3 al 100% (500 mM imidazol). Las fracciones obtenidas se analizaron por medio de un ELISA de expresión y por electroforesis desnaturalizante de tricina como lo descrito en 2.4.6, 2.4.7 y 2.4.8, los resultados del ELISA se analizaron mediante un ANOVA de una vía utilizando el software GraphPad Prism 9.0.

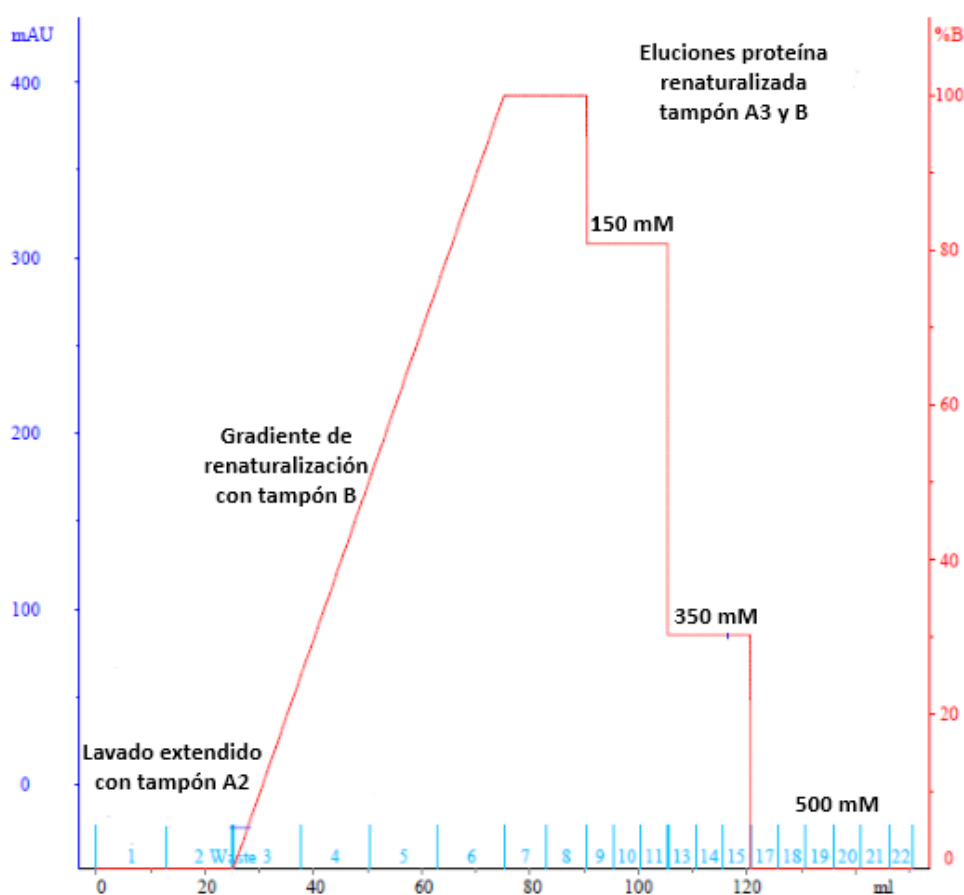


Figura 3. Diagrama del protocolo de renaturalización *in situ*: On column refolding. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestran las miliunidades de absorbancia y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B de renaturalización. Los números en celeste representan las fracciones recuperadas durante el proceso de renaturalización.

2.5.5 Diálisis

La elución recuperada de la fracción de interés durante la renaturalización o purificación se colocó en una membrana tubular SnakeSkin™ Dialysis tubing 3500 MVCO (ThermoScientific) y se dializó contra PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 8.0) en una relación 5:1000 (muestra:PBS). Se colocó en un agitador magnético por 2 horas a 4 °C, se realizó un recambio de solución PBS y se colocó la membrana nuevamente en el agitador magnético por 2 horas a 4 °C. Se realizó un último recambio de solución de PBS y se dejó en agitación toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se recuperó la proteína dializada y se almacenó en tubos nuevos, en alícuotas de 0.1 y 1 mL a 4°C, para su evaluación y cuantificación. El resto se almacenó a -20 °C.

2.5.6 ELISA de reconocimiento

Por triplicado en una placa de 96 pozos se colocaron 250 ng del antígeno (IL1β o IL6/IL6R), se utilizó como blanco leche al 5%; como control negativo BSA al 3%, para el reconocimiento del vNAR anti IL-1β y leche al 5% para el reconocimiento de los vNAR anti IL6R/IL6. Se fijó el antígeno por 1 hora a 37 °C. Se descartó el antígeno y se bloquearon los pozos con 200 μL de leche al 5%, por una hora a 37 °C. Se retiró la solución y se realizaron de 3 a 5 lavados con 200 μL de PBS 1X. Se añadieron 50 μL/pozo del vNAR de interés (vNAR anti IL1β o vNAR anti IL6/IL6R), se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se descartó la proteína y se añadieron 50 μL/pozo del anticuerpo High affinity anti-HA acoplado a peroxidasa (Roche) en leche al 3% (1:3000), se incubó por una hora a 37 °C. Se descartó la solución y se realizaron 5 lavados con PBST 0.05% (PBS-Tween 20 0.5%). Se añadieron 50 μL/pozo de solución TMB-ELISA 1-Step™ Turbo (Thermo Scientific) y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Se añadieron 50 μL/pozo de solución de paro de ácido clorhídrico 10 % y se determinó la absorbancia a 450 nm por medio de un lector de placas EPOCH (BioTek).

2.6 Segunda búsqueda de clonas que reconozcan a la IL-1β

Se realizó una búsqueda a partir de los fagos obtenidos en la ronda 3 y 4 de la bioselección anti IL-1β, para encontrar otras clonas que potencialmente reconocieran el antígeno de interés. Se realizaron por duplicado una serie de diluciones para cada una de las preparaciones de fago obtenidas de la ronda 3 y de la ronda 4: dilución de 10⁻³ (999 μL de medio SB + 1 μL de la preparación de fago); dilución de 10⁻⁶ (999 μL de medio SB + 1 μL de la dilución de 10⁻³) y dilución de 10⁻⁸ (990 μL de medio SB + 10 μL de la dilución 10⁻³).

⁶). Se infectaron directamente 50 μ L de *E.coli* ER2738 con 2 μ L de la dilución de 10^{-8} por 20 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron los 52 μ L y se plaquearon directamente en placas de LB+ carbenicilina (100 μ g/mL), se incubaron toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente se realizó el lavado de colonias y la resiembra de las mismas para poder realizar la PCR de codón STOP y PCR de colonia (véase 2.3.3), posteriormente las clonas positivas al fragmento vNAR fueron enviadas a secuenciar (véase 2.3.4). Una vez obtenidos los resultados de las clonas funcionales, se extrajo el plásmido por lisis alcalina (véase 2.3.5) y se transformaron las células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) como se describió en 2.4.2. Se realizó una expresión a pequeña escala utilizando las condiciones estándar del grupo de trabajo 37°C, 0.5 mM IPTG, 6 horas, 5 g para un cultivo de 500 mL.

Se cosecharon las células al dividir el cultivo en tubos Corning de 50 mL y se centrifugaron a 4500 g por 20 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y con los sedimentos se guardaron a -20 °C. Posteriormente, las proteínas de interés se obtuvieron por extracción periplásmica, como se describió en 2.4.3. Se realizó un ELISA de reconocimiento, como se describió en 2.5.6, utilizando el sobrenadante de la extracción periplásmica que presentará una mayor absorbancia en el ELISA de expresión.

2.7 Expresión a gran escala del vNAR recombinante

Se preparó un preinóculo al añadir una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) transformada a 70 mL de medio SB adicionado con 140 μ L de carbenicilina (50 mg/mL) se incubó a 37 °C con 250 rpm toda la noche en la incubadora MaxQ400 (ThermoScientific). Al día siguiente, se añadieron 50 mL del preinóculo a 948.1 mL de medio SB con 1.9 mL de carbenicilina (50 mg/mL) y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600}) de 0.6-0.8, una vez alcanzada la densidad óptica se añadió el volumen necesario de IPTG 0.5M, con base en las condiciones específicas de inducción del vNAR de interés. Una vez concluida la expresión, se cosechó el cultivo al dividirlo en tubos de 50 mL, se centrifugó a 4500 g por 20 minutos, los sedimentos y el sobrenadante se almacenaron a -20 °C. La extracción de la proteína se realizó como se indicó anteriormente en 2.4.4. Se cuantificó por Nanodrop Lite (Thermo Scientific) la concentración de proteína total de los extractos obtenidos y se supuso que aproximadamente 1% de la proteína total representa al vNAR presente en la muestra para determinar la cantidad teórica de vNAR a cargar en la columna.

2.8 Purificación vNAR recombinante por cromatografía de afinidad a metales (IMAC)

Se utilizó el método de FPLC con la columna HisTrap™ FF (Fast Flow) de 5 mL (GE HealthCare) precargada con sefarosa de níquel en un equipo FPLC ÄKTA pure (GE HealthCare) con el software UNICORN. Se purificó el extracto con un flujo constante de 2.5 mL/min y una presión máxima de 0.8 Mpa. Como fase móvil A se utilizó una solución de (NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 0 mM) y como fase móvil B una solución (NaH₂PO₄ 20 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 500 mM), ambas soluciones a pH 7.4. Previo a determinar las condiciones ideales para la purificación de la clona de interés se realizó un gradiente de purificación como se describió en 2.5.2, con la excepción de que no se utilizaron las soluciones desnaturalizantes.

La columna se lavó con 30 mL de agua bidestilada y posteriormente se equilibró la columna con 35 mL de solución B al 4% (20 mM imidazol). Previo a iniciar la purificación, se preparó el extracto al añadirle el 10% de glicerol respecto al volumen total y el volumen necesario de solución de fase móvil B, para que el extracto tuviera una concentración final de 20 mM de imidazol, el extracto se centrifugó dos veces a 14 000 g, 30 min a 4 °C y finalmente se tomó una muestra inicial del extracto de 1 mL para posteriores análisis.

Una vez equilibrada la columna, el extracto obtenido se dividió en dos lotes y cada lote se recirculó tres veces a través de la columna a un flujo de 1.5-1.7 mL/min utilizando una bomba peristáltica a 4 °C. Una vez finalizada la recirculación del extracto, se recolectó y se identificó como FT (del inglés Flow Through). La elución de la proteína se inició con 45 mL de fase móvil B al 4% (20 mM imidazol) con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de proteínas inespecíficas, se procedió a realizar una elución de 30 mL de fase móvil B al 100% (500 mM imidazol), se finalizó con un re-equilibrado de la columna utilizando 35 mL de fase móvil B al 4% (20 mM imidazol). Cada fracción recolectada se identificó y se tomaron muestras de 40 µL para su análisis inmediato y el resto se guardó a 4 °C.

En algunos casos fue necesario llevar a cabo una repurificación de las fracciones donde se detectó la presencia de la proteína, la cual se encontraba contaminada con otras proteínas inespecíficas. Para lo anterior se dializaron la o las fracciones de interés como se describió en 2.5.5, la muestra se preparó y se recirculó como se describió anteriormente. Para el proceso de repurificación se inició con una elución de 45 mL de fase móvil B al 4% (20 mM imidazol), seguido por una elución con 30 mL de fase móvil B al 20% (100 mM imidazol), posteriormente se realizó una elución con 30 mL de fase móvil B al 100%. Cada fracción se identificó y se tomaron muestras de 40 µL para su posterior análisis.

2.9 Título de reconocimiento del vNAR a diferentes concentraciones del antígeno IL6R/IL6

Se evaluó la capacidad de reconocimiento de diferentes cantidades del antígeno IL6R/IL6 por parte de los vNARs seleccionados previamente purificados. Se analizaron 6 cantidades diferentes del antígeno (ng): 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625 y 7.812. Las cantidades se prepararon a partir de diluciones de la concentración inicial a la que se encuentra el antígeno (250 ng) con PBS. Se fijaron por triplicado las cantidades de antígeno, se utilizó como blanco y control negativo leche al 5%. Se siguió el procedimiento para realizar el ELISA de reconocimiento como se describió en 2.5.6, con la modificación de que se añadieron 100 μ L del vNAR a probar.

2.10 Ensayo de neutralización *in vitro* del complejo IL6/IL6R en células C33A

De acuerdo con el estudio realizado por Chouet al. (2022), las células epiteliales de cérvix humano C33A (ATCC) son estimuladas por el complejo de la IL-6 con su receptor soluble, ya que la inflamación generada por este complejo se vincula con la angiogénesis, por lo que la inducción de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un proceso desencadenado en la señalización río abajo de la vía de STAT3. Se reprodujo el ensayo, con ligeras modificaciones. Al no contar con un anticuerpo comercial anti-VEGF para su detección por ELISA, se utilizó el vNAR V13 previamente reportado por nuestro grupo de investigación (Millán-Gómez, 2018), el cuál reconoce dicha molécula. Para lo anterior, se sembraron las células C33A a una densidad de 1×10^5 células/pozo en doce pozos de una placa de 24 pozos en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) adicionado con 1% de antibiótico/antimicótico (1% A/A) y 10% de suero fetal bovino (BFS). Se cultivaron durante 24 h a 37 °C con 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%, una vez alcanzada se realizó un cambio de medio por medio EMEM sin suero adicionado con 1% A/A, se incubaron por 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Se prepararon los tratamientos en tubos estériles de 1.5 mL, control negativo, 200 μ L PBS; control positivo, 180 μ L de PBS y 20 μ L de la quimera IL6R/IL6 (concentración final de 50 ng/mL); tratamientos experimentales, 20 μ L de la quimera IL6R/IL6 (concentración final de 50 ng/mL) y 180 μ L del vNAR de la clona 8 y 16 de manera individual (Figura 4). Se incubaron por 1 hora a 37 °C. Una vez concluidas las 24 h de las células en medio sin suero y de la hora de incubación de los tratamientos, se añadieron 50 μ L de los tratamientos a analizar a cada pozo. Se incubaron los tratamientos por 24 h. Se recuperó el sobrenadante y se fijó en una placa de ELISA por triplicado para realizar la

detección de VEGF utilizando el vNAR V13 mediante un ELISA de reconocimiento de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.5.6.

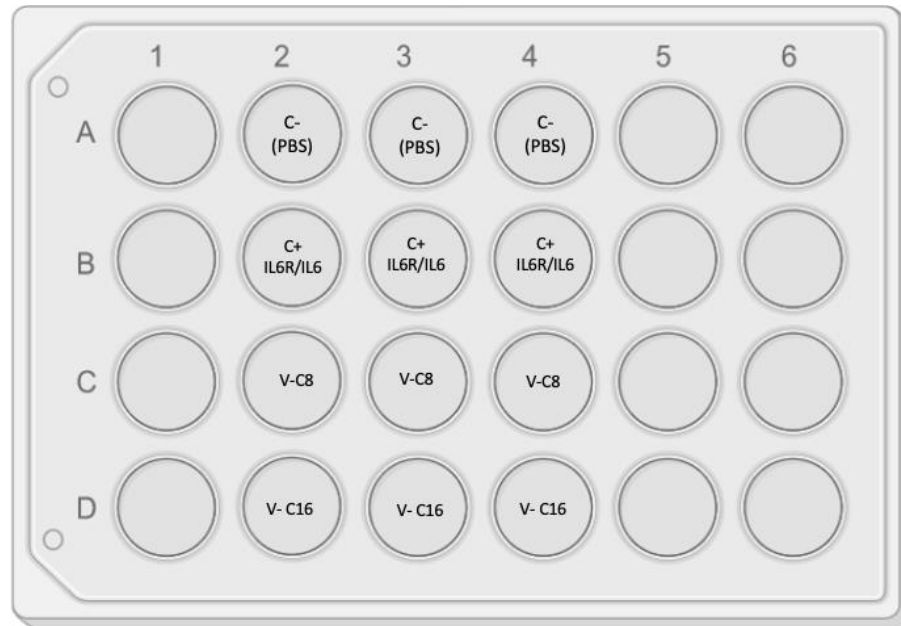


Figura 4. Diseño experimental de la producción de VEGF en células C33A por estimulación del complejo IL6R/IL6. Donde, C-, corresponde al control negativo donde se adicionó PBS; C+, corresponde al control positivo donde se adicionó la quimera IL6R/IL6 (50 ng/mL); V-C8 y V16, corresponde a los tratamientos donde se añadieron los vNARs de la clona 8 y 16 respectivamente, junto con la quimera IL6R/IL6 (50 ng/mL).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Preparación de células electrocompetentes

Para la cepa de *E. coli* ER2738, se observó que reducir el volumen de resuspensión y completar posteriormente el volumen total antes de centrifugar ayudó a preparar más rápido las células y mejorar los títulos de competencia de 10^6 a 10^8 . En el caso de TG1 utilizar un protocolo distinto al del grupo de trabajo aumentó los títulos de competencia a 10^8 .

Ambas células se prepararon para ser utilizadas en el proceso de bioselección de los vNAR que reconocieran a la IL-1 β y al IL6/IL6R, los resultados de los títulos de competencia obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Títulos de células electrocompetentes para el proceso de bioselección.

Cepa <i>E. coli</i>	Fecha de preparación	Títulos de competencia
ER2738	20/10/2021	2.26×10^{08}
TG1	26/10/2021	1.24×10^{08}

Ninguna presentó contaminación por alguno de los fagos analizados, los resultados obtenidos en las pruebas de contaminación se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Pruebas de contaminación células electrocompetentes.

Cepa <i>E. coli</i>	Fecha de preparación	Contaminación por fagémido pComb3x	Contaminación por fago ayudador	Contaminación por fago lítico
ER2738	20/10/2021	Negativo	Negativo	Negativo
TG1	26/10/2021	Negativo	Negativo	Negativo

3.2 Preparación fago ayudador M13K07

Al determinar los títulos para el fago ayudador en el caso de las diluciones de 10^{-7} y 10^{-9} , se tuvieron fallas al realizar la técnica del TOP agar, ya que se condensó el agar y fue imposible poder observar la formación de placas, por lo que tomaron los resultados presentes en la placa de la dilución de 10^{-8} para determinar el título del fago ayudador, estos se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Título de competencia del fago ayudador M13K07.

Fecha de preparación	Dilución	Número de placas formadas	Título (pfu/ml*)
29/10/2021	10^{-7}	0	ND
	10^{-8}	6	6×10^{11}
	10^{-9}	0	ND

ND: no determinado.

*pfu/mL: unidades formadoras de placas por mililitro.

3.3 Bioselección a partir de bibliotecas sintéticas de fagos que reconozcan la IL-1 β y el IL6R/IL6

3.3.1 Reamplificación de bibliotecas VS0, VS1 y VS2

Se realizó la reamplificación de las 3 bibliotecas preparadas por Cabanillas-Bernalet al. (2019), En la Tabla 6 se muestran los títulos obtenidos en las siembras de 1 μ L y 10 μ L, de la bioselección anti IL1- β en la y en la Tabla 7 para anti- IL6R/IL6.

Tabla 6. Título de reamplificación de bibliotecas VS0, VS1 y VS2 en la bioselección de IL1 β

REAMPLIFICACIÓN	TÍTULO 1 μ L	TÍTULO 10 μ L
	1.45X10 ¹⁰ pfu	2.78 X10 ¹⁰ pfu

*PFU: Unidades formadoras de placas

Tabla 7. Título de reamplificación de bibliotecas VS0, VS1 y VS2 en la bioselección de IL6R/IL6

REAMPLIFICACIÓN	TÍTULO 1 μ L	TÍTULO 10 μ L
		3.0 X10 ⁹ pfu

*PFU: Unidades formadoras de placas

3.3.2 Rondas de bioselección de fagos fagos que reconocen IL-1 β o IL6R/IL6 (Biopanning)

Con las bibliotecas reamplificadas se realizaron 4 rondas de bioselección contra el antígeno IL-1 β , el título que se obtuvo en cada ronda se muestra en la Figura 5 . De la tercera y cuarta ronda se aislaron 80 colonias aleatoriamente, se analizaron mediante PCR de cada colonia.

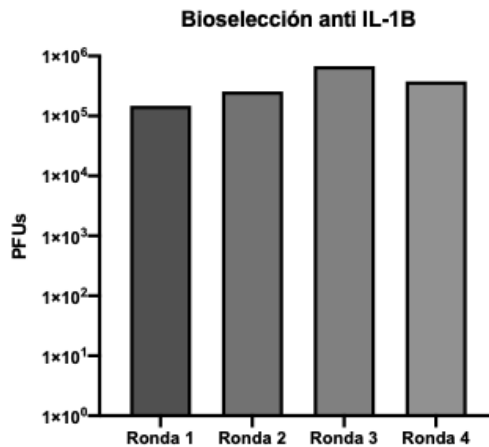


Figura 5. Títulos de salida de fago en cada ronda de bioselección anti IL1 β . En el eje X se muestran cada una de las rondas de bioselección, mientras que en el eje Y los títulos expresados como “Unidades Formadoras de Placas”.

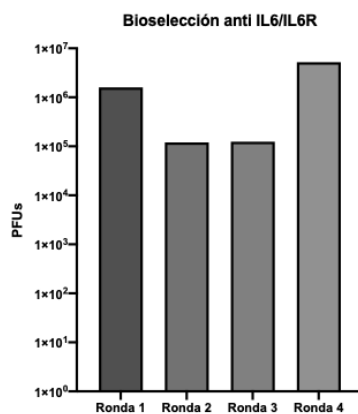


Figura 6. Títulos de salida de fago en cada ronda de bioselección anti IL6/IL6R. En el eje X se muestran cada una de las rondas de bioselección, mientras que en el eje Y los títulos expresados como “Unidades Formadoras de Placas”

En la bioselección contra el antígeno IL6R/IL6 con las bibliotecas reamplificadas se realizaron igualmente, 4 rondas de bioselección, el título que se obtuvo en cada ronda se muestra en la Figura 6. De la tercera ronda se aislaron 21 colonias y de la cuarta ronda se aislaron 123 colonias aleatoriamente, se analizaron mediante PCR.

3.3.3 Búsqueda de clonas funcionales por PCR

En la Figura 7 y Figura 8 se muestran los productos de PCR de la bioselección anti IL-1 β en un gel de agarosa al 2%, con el objetivo de observar la presencia del fragmento de interés con un tamaño aproximado de 600 -700 pb, que corresponde al tamaño de un vNAR.

Se identificaron 72 colonias positivas de las ochenta seleccionadas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 y 80) y fueron enviadas a secuenciar.

De las 144 clonas analizadas a partir de la bioselección de IL6R/IL6, se detectaron 40 clonas que pertenecían a alguna de las tres bibliotecas originales (Figura 9), por lo que, las 104 clonas restantes se analizaron por medio de PCR para poder identificar aquellas que presentarán el fragmento vNAR de interés.

De las 104 clonas analizadas, 102 presentaron el fragmento vNAR de interés (Figura 10). Se enviaron a secuenciar 53 clonas que correspondieron a: 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 22, 24, 25, 28, 30, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 54, 56, 57, 66, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 101, 104, 105, 106, 107, 116, 122, 133, 134, 135, 141, 142 y 144.

El criterio de selección se basó en elegir aquellas clonas cuyo producto de PCR correspondiente al fragmento vNAR no presentó barridos o la presencia de otras bandas inespecíficas, el resto de las clonas positivas se guardaron como respaldo.

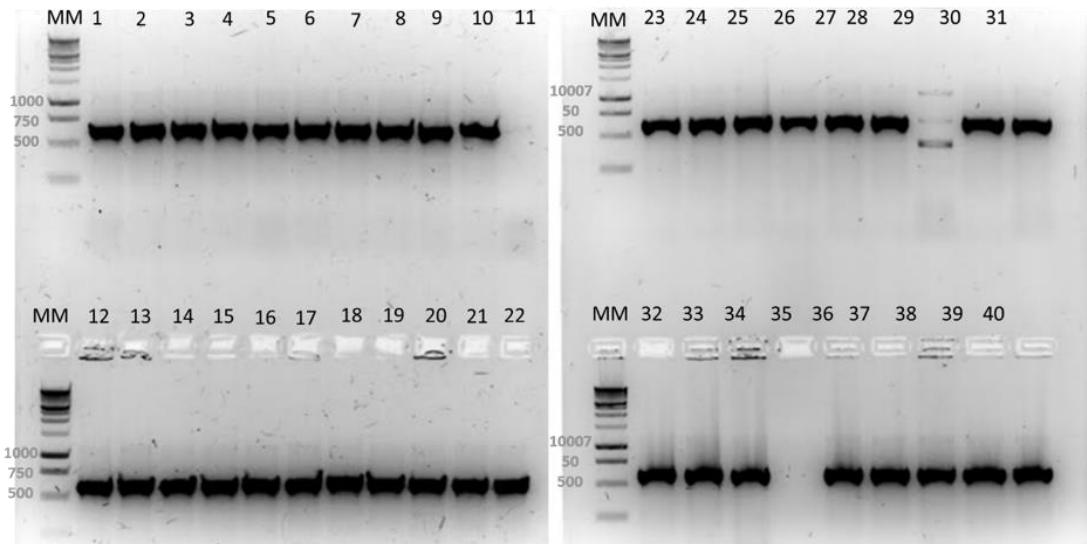


Figura 7. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la ronda 3 de bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas; y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

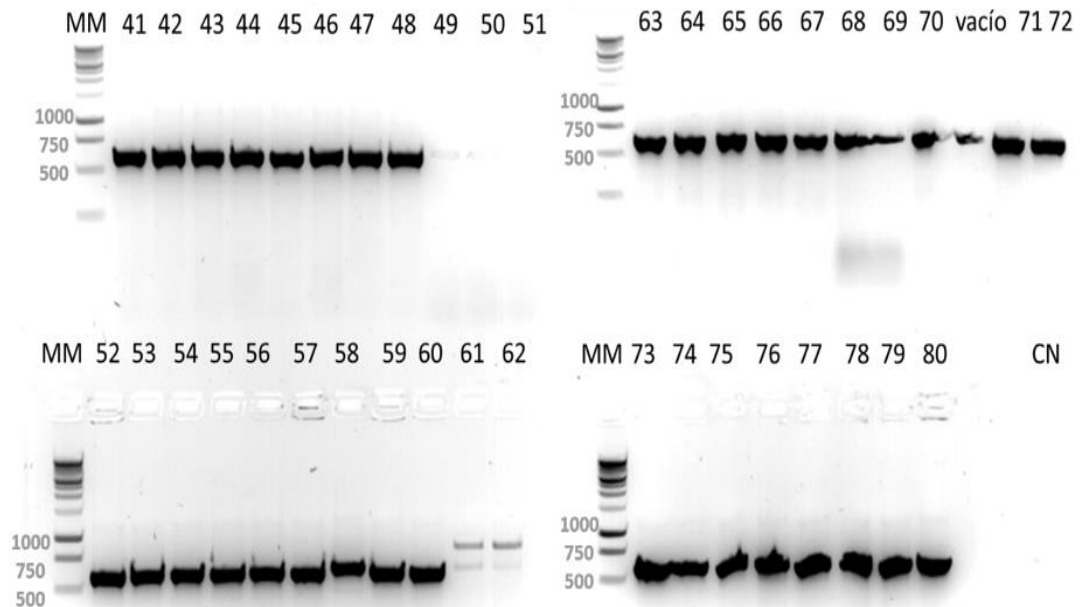


Figura 8. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la ronda 4 de bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas; vacío, corresponde a un carril que no polimerizo bien y no se cargó muestra ahí; y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

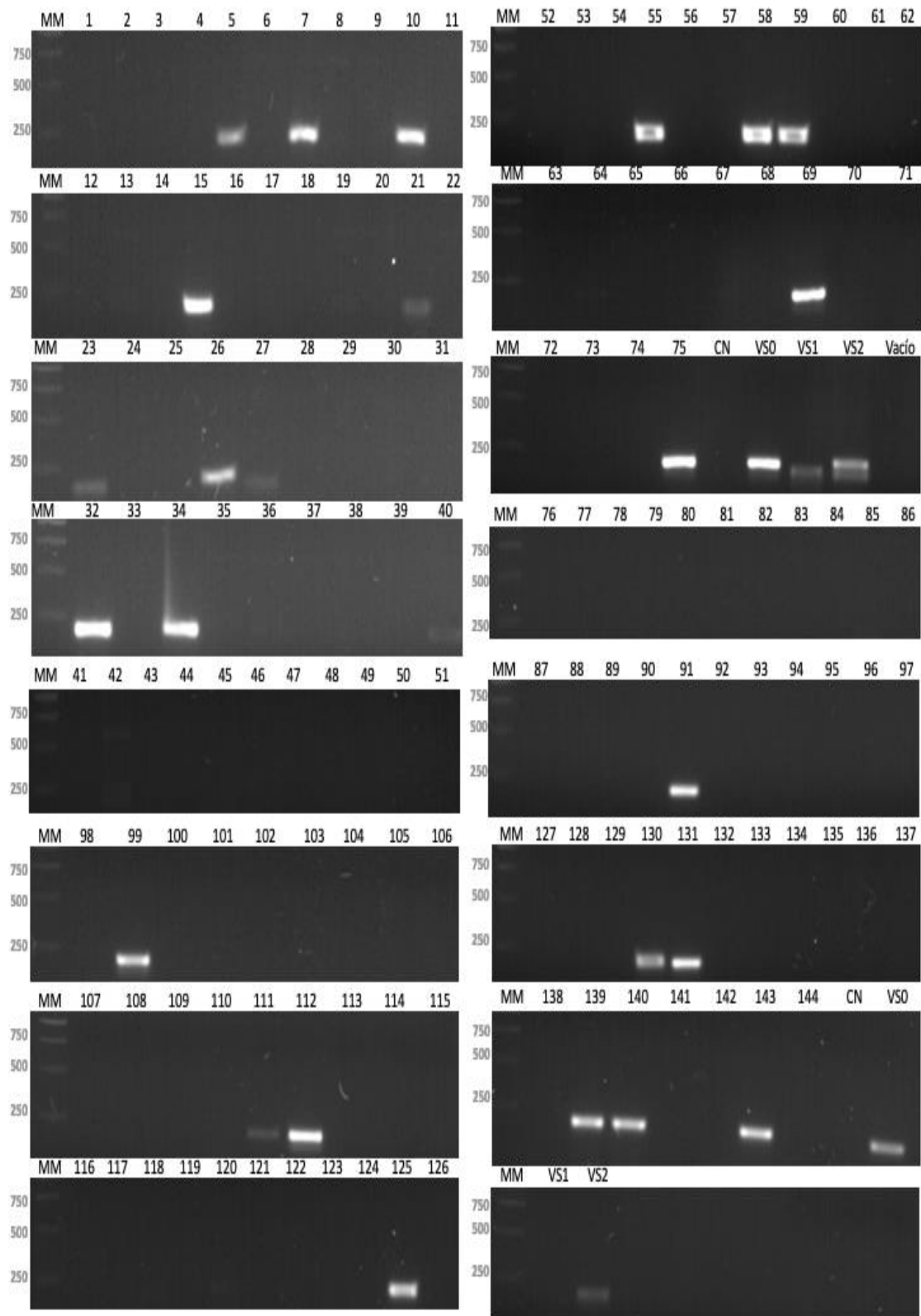


Figura 9. Análisis de productos de PCR STOP de las colonias aisladas de la ronda 3 y 4 de la bioselección anti IL6/IL6R, en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas; y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

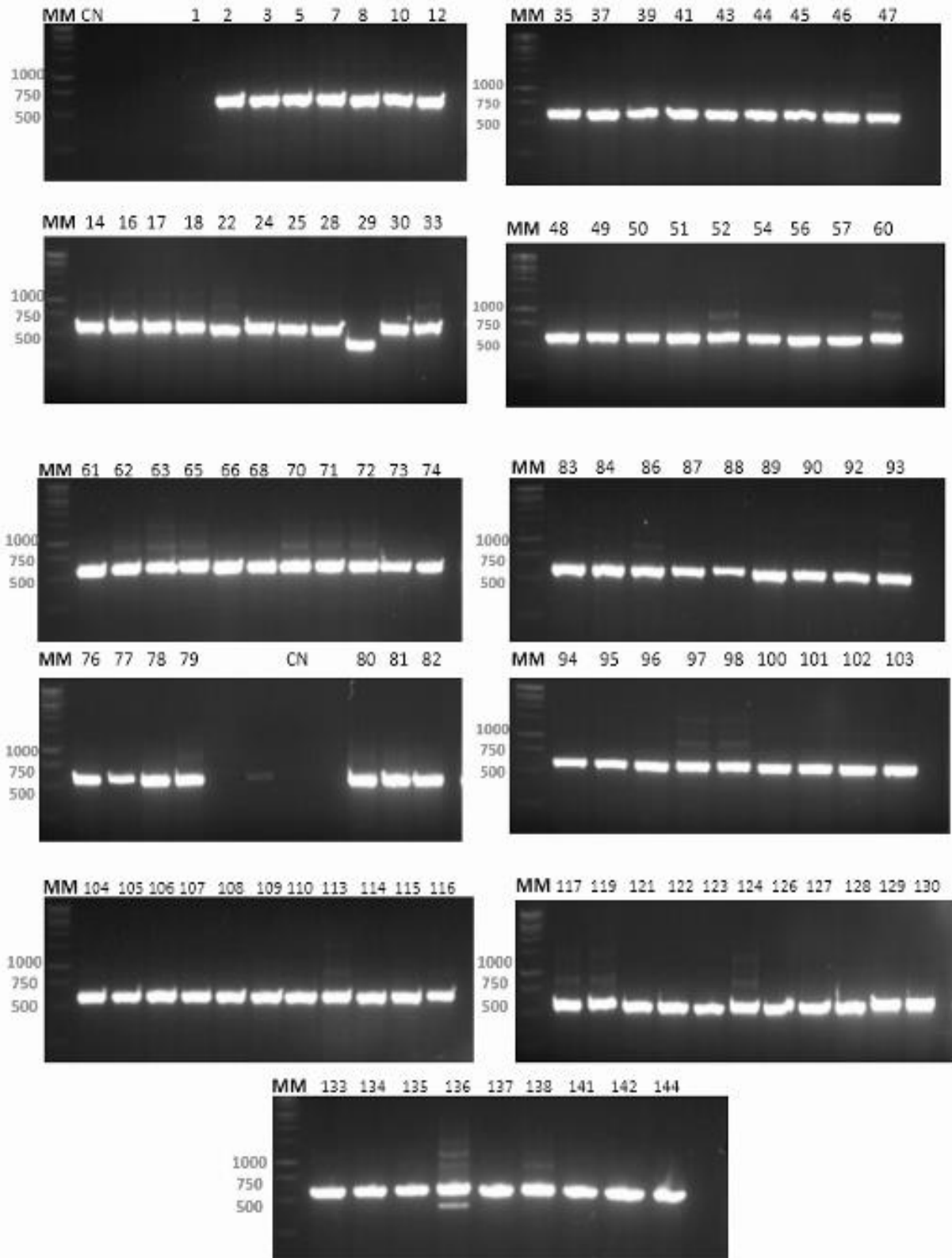


Figura 10. Análisis de productos de PCR de las colonias que presentan el fragmento vNAR de interés de la bioselección anti IL6/IL6R, en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas; y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

3.3.4 Secuenciación

Se analizaron las 72 secuencias con un resultado positivo de PCR a partir de la bioselección anti IL-1 β y se identificaron 5 secuencias que difirieron de los marcos de lectura originales pero que mantuvieron las cisteínas canónicas (Figura 11). Las secuencias 22-IL1B y 24-IL1B fueron idénticas a la secuencia perteneciente a la biblioteca de VS0. Las secuencias de las clonas 6-IL1B, 7-IL1B y 8-IL1B, presentan la misma secuencia. Por lo que se seleccionó la secuencia 6-IL1B para su expresión y evaluación.

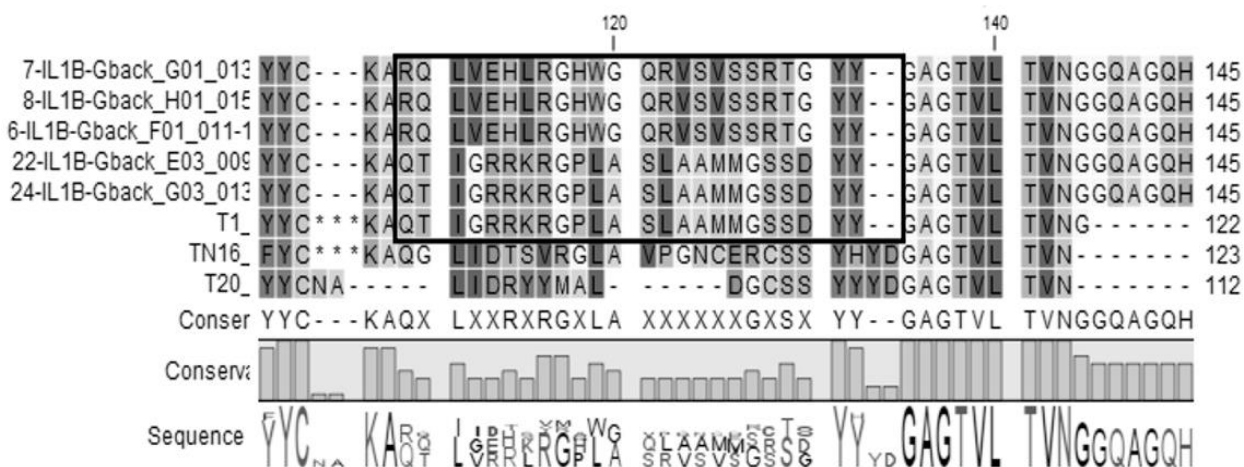


Figura 11. Alineamiento del CDR3 de las secuencias que presentaron un CDR3 distinto al marco de las bibliotecas originales. En el recuadro rojo se resalta la secuencia correspondiente al CDR3 de cada clona.

La clona 6 que codifica para la proteína W1B6, está compuesta por 150 aminoácidos (con etiquetas), tiene un tamaño teórico aproximado de 16.5 kDa, pertenece a la biblioteca VS0 y es una proteína rica en argininas, glicinas y serinas.

De las 53 clonas la bioselección contra IL6R/IL6 secuenciadas, se obtuvieron 36 clonas funcionales que difirieron de los marcos de lectura originales. Sin embargo, varias clonas se encontraron repetidas en los resultados de secuenciación. Del total de clonas se eliminó la secuencia de la clona 24, ya que correspondía a la misma secuencia de la biblioteca VS0. Las secuencias repetidas corresponden a la clona 39 (repetida 7 veces); clona 49 (repetida 6 veces); clona 2 (repetida 3 veces); clona 89 y 14 (repetidas 2 veces). Estas clonas pertenecían a la biblioteca VS0 y fueron aisladas de la ronda 4 de bioselección, con excepción de las clonas 2 y 14 que se encontraron en la ronda 3 y 4. Con excepción de la clona 33 la cual pertenecía a la biblioteca VS1. Es de resaltar, que la mayoría de las secuencias presentaron un triptófano conservado en la posición 130 en su CDR3, excepto la clona 56 que presentó una mutación por una tirosina y la clona 33

que no lo presentó. Por lo que, al eliminar aquellas clonas repetidas se obtuvieron un total de 18 clonas funcionales (Figura 12).

El haber encontrado clonas aisladas y separadas repetidas, denotan que posiblemente se tuvo un proceso exitoso de bioselección. Por lo anterior, se seleccionaron las dos clonas más repetidas para poder determinar si reconocían o no el antígeno de interés, se realizó paralelamente un proceso de cribado con las 18 clonas funcionales para elegir con base en la expresión y reconocimiento del antígeno las clonas candidatas para los ensayos de neutralización.

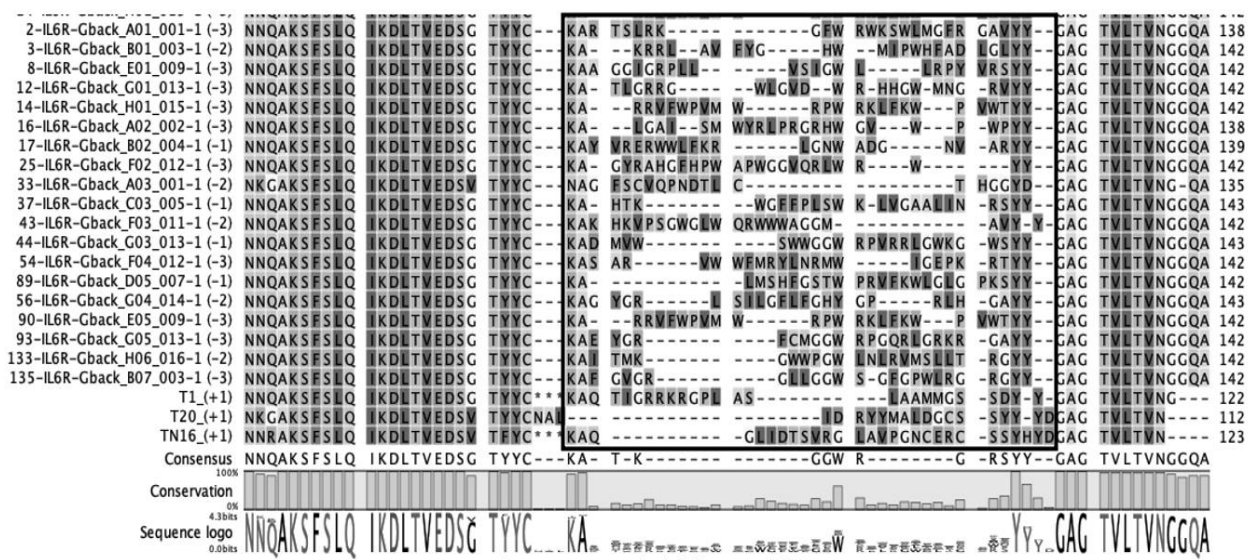


Figura 12. Alineamiento del CDR3 de las secuencias que presentan un CDR3 distinto a los marcos de las bibliotecas originales. En el recuadro se resalta la secuencia correspondiente al CDR3 de cada clona.

3.3.5 Extracción y purificación de plásmido por lisis alcalina

El tamaño esperado del fragmento a visualizar se esperaba entre 3000 a 4000 pb que corresponde al tamaño aproximado del fagémido pComb3X, que es el vector en el que se encuentra clonada la secuencia del vNAR de interés. El plásmido obtenido de la clona 6 se encontró dentro del rango de tamaño esperado y su integridad se observó en el gel de agarosa (Figura 13).

En el caso de las clonas obtenidas en la bioselección de IL6R/IL6 se analizó la integridad y pureza de las 18 clonas funcionales obtenidas. En algunos casos, como el de las clonas 8 y 17 las bandas obtenidas fueron tenues. A pesar de que, los plásmidos de todas las clonas extraídas se encontraron dentro del tamaño esperado, respecto al control positivo (C+), como podemos observar en la Figura 14.

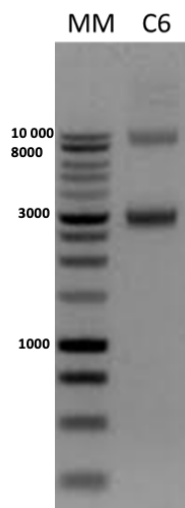


Figura 13. Análisis de la presencia del plásmido de la secuencia 6-IL1B por electroforesis de un gel de agarosa al 1.2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; el carril C6, corresponde al plásmido extraído de la clona 6 el 29/01/2022.

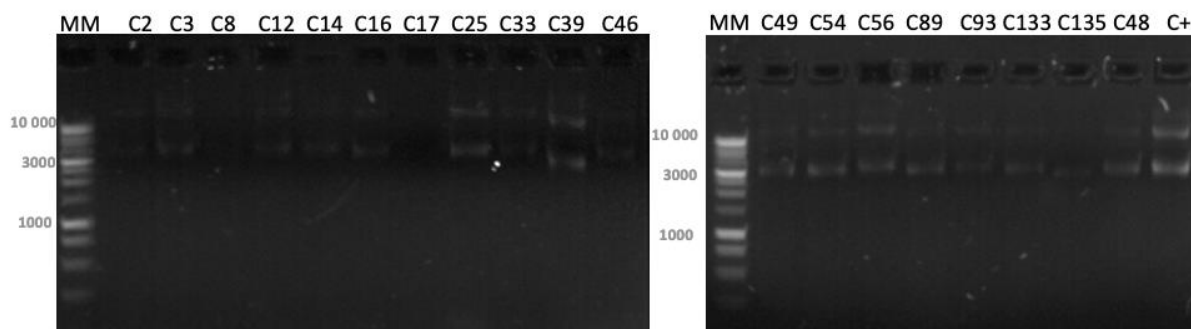


Figura 14. Análisis de la presencia del plásmido de las secuencias funcionales anti IL6R/IL6 por electroforesis de un gel de agarosa al 1.2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; C+, corresponde al control positivo, el plásmido obtenido del vNAR de la clona 6 anti IL1 β y el resto corresponden al número de las clonas obtenidas a partir del proceso de bioselección.

3.4 Expresión y evaluación del vNAR recombinante

3.4.1 Preparación de células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3)

Tabla 8. Título de competencia de las células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3).

Fecha de preparación	Plásmido	Título de competencia
31/01/2022	Pet28a	2.75×10^6

La competencia de las células preparadas se encontró por debajo del título esperado como se observa en la Tabla 8.

Tabla 9. Pruebas de contaminación células quimiocompetentes.

Fecha de preparación	Por fagémido	Por fago ayudador	Por fago lítico
31/01/2022	Negativo	Positivo	Positivo

Respecto a las pruebas de contaminación, las células presentaron un resultado positivo a la contaminación con el fago ayudador y con fago lítico (Tabla 9). Se repitieron las pruebas del fago ayudador y del fago lítico a las células recién preparadas y a las células de donde se partió para prepararlas, pero se obtuvieron los mismos resultados.

3.4.2 Cinética de expresión y extracción del vNAR recombinante

Se detectaron las proteínas obtenidas de la extracción citoplásmica a partir de la cinética de expresión de la clona 6 anti IL-1 β por medio de un ELISA de expresión (Figura 15). Los resultados obtenidos, se analizaron por medio de un ANOVA de una sola vía con el 95% de confianza y se obtuvo que hubo diferencias significativas entre las medias ($P 0.6 \times 10^{-6}$). Se encontró que las condiciones de inducción a 37 °C por 24 h en las concentraciones de IPTG de 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM presentaron diferencias respecto al tratamiento control (sin inducción de IPTG a 24 h). Además, no hubo diferencias en la expresión entre 12 y 24 h ($p=1$), por cuestiones de tiempo y practicidad se eligió la condición de 12 h, 1mM a 37 °C

En el caso de los vNARs obtenidos del proceso de bioselección contra el complejo de la IL-6, de las 18 clonas a transformar se obtuvieron solamente 11 clonas transformadas exitosamente, estas corresponden a las clonas: 3, 8, 12, 14, 16, 25, 33, 39, 43, 49, 54, 56, 89, 90 y 133. Es de resaltar, que si fue posible transformar la clona 33; la cuál no presentó el aminoácido conservado en la posición 130 del CDR3 y que pertenece a la biblioteca VS1; así como a la clona 56, la cual presentó una mutación de una tirosina en vez del triptófano en la posición 130. La obtención de estos resultados fue el primer cribado para poder reducir el número de vNAR candidatos para los ensayos en líneas celulares. Posteriormente al expresar estas clonas, se seleccionaron a aquellas clonas que presentaron una mejor expresión (Figura 16).

Las clonas que presentaron diferencias significativas respecto al blanco fueron: 8, 25, 39 y 133, en el sobrenadante de la solución de magnesio; 12, 14, 16, 49, 54 y 89, en el sobrenadante de la solución hipertónica y la 90 en el medio de cultivo. Estas, se seleccionaron y se utilizaron para realizar un ELISA de reconocimiento contra el antígeno IL6R/IL6, y se utilizaron las que presentaron el mejor reconocimiento.

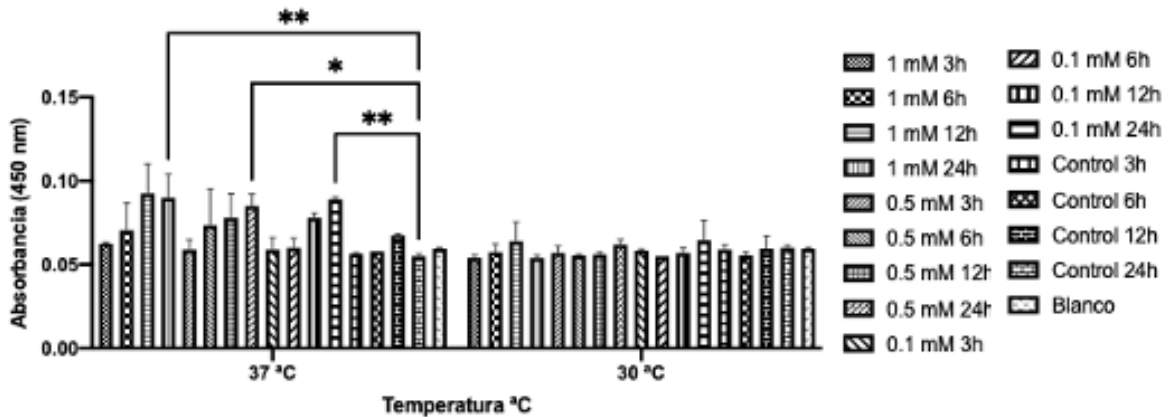


Figura 15. Ensayo de ELISA de expresión para evaluar la presencia del vNAR W126 en las diferentes condiciones estudiadas en la cinética de expresión. Blanco: leche al 8%. Del lado derecho se aprecian las concentraciones de IPTG y el tiempo de inducción probados. ANOVA de una vía (*)= P < 0.05; (**) = P < 0.01; (***) = P < 0.001; (****) = P < 0.0001.

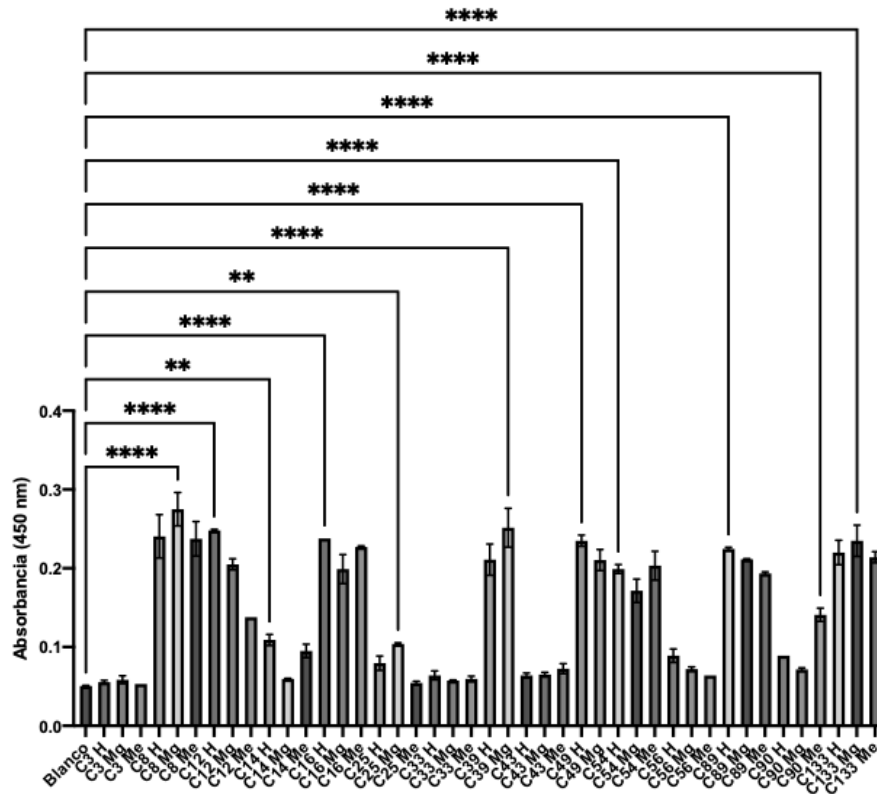


Figura 16. Expresión de vNARs candidatos anti IL6R/IL6. Detección de la presencia de vNAR mediante ELISA bajo la expresión en las condiciones estándares del grupo de trabajo. Donde, blanco corresponde a leche al 5%; las letras junto al número de la clona corresponden, H a la solución hipertónica, Mg a la solución de sulfato de magnesio y Me al medio de cultivo analizado. ANOVA de una vía (*)= P < 0.05; (**) = P < 0.01; (***) = P < 0.001; (****) = P < 0.0001

3.4.3 ELISA de reconocimiento

3.4.3.1 Interleucina 1 β

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un ANOVA de un factor, a pesar de que se encontraron diferencias entre las medias ($p= 3.12 \times 10^{-8}$), no se presentaron diferencias entre el reconocimiento por el antígeno y el control negativo ($p= 0.9475$), aunque la expresión vNAR fue de 0.109 (Figura 17). Estos resultados podrían indicar que la cantidad del vNAR vNAR W1 β 6 era muy poca o porque se encontraba dentro de cuerpos de inclusión y no era un anticuerpo funcional.

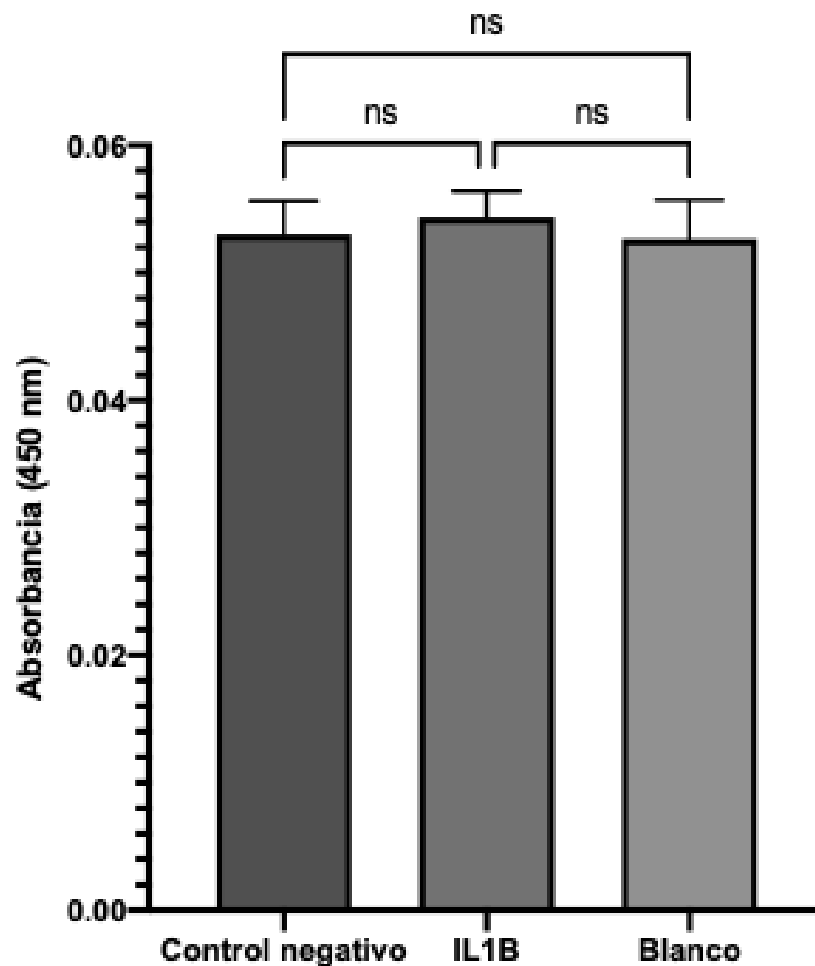


Figura 17. Ensayo de ELISA de reconocimiento del vNAR W1B6 contra su blanco molecular la interleucina 1 β . Donde, Blanco: leche al 8%; Control negativo: leche al 8%. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**) = $P < 0.01$; (***) = $P < 0.001$; (****) = $P < 0.0001$.

3.4.3.2 Receptor soluble de la interleucina IL-6

Las clonas 8, 14,16,25, 39,49 y 54 que presentaron reconocimiento por el antígeno (Figura 18).Se analizó por medio de un ANOVA de una vía, presentaron diferencias entre el reconocimiento de estas clonas, en especial contra las clonas 39 y 49, que fueron las que se obtuvieron repetidas en los resultados de secuenciación. Respectivamente, las clonas 8 y 25 presentaron un mayor reconocimiento respecto al resto de clonas. Posteriormente, para poder seleccionar a las clonas candidatas para los ensayos de neutralización, se analizó la relación de la expresión y el reconocimiento de las clonas.

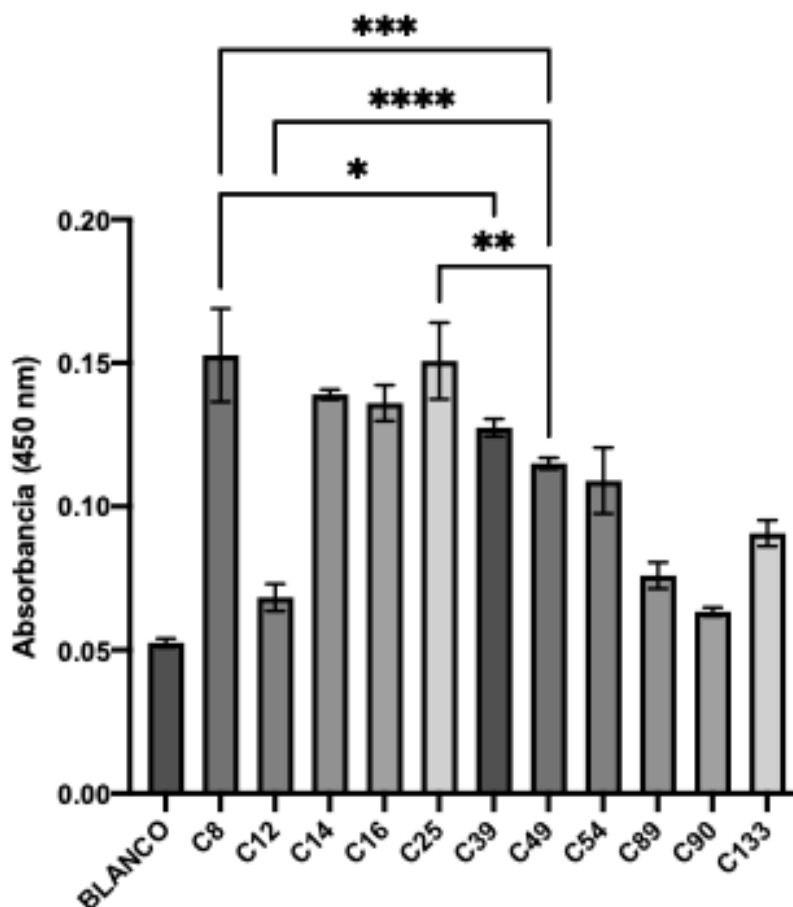


Figura 18. ELISA de reconocimiento de los vNAR candidatos contra su blanco molecular el complejo del receptor soluble de la citocina 6 (IL6R/IL6). Donde, Blanco: leche al 5%. ANOVA de una vía (*)= P <0.05; (**)= P <0.01; (***)= P < 0-001; (****)= P < 0.0001.

La clona 25 presentó la mejor relación expresión/reconocimiento por su blanco molecular (Figura 19). A pesar de que presentó muy baja expresión, por lo que sería necesario establecer su cinética de expresión y por el tiempo con el que se contaba para finalizar la fase experimental no se pudo estandarizar su

producción y por lo tanto, no se seleccionó como candidata para continuar con los ensayos de neutralización. Por lo anterior, se eligieron las clonas 8 y 16 las cuales presentaron una buena relación expresión/reconocimiento ya que aproximadamente el 50% del vNAR que se expresó reconoció al antígeno de interés (Figura 19). A los vNARs expresados por estas clonas se les denominó IL6R-8 e IL6R-16.

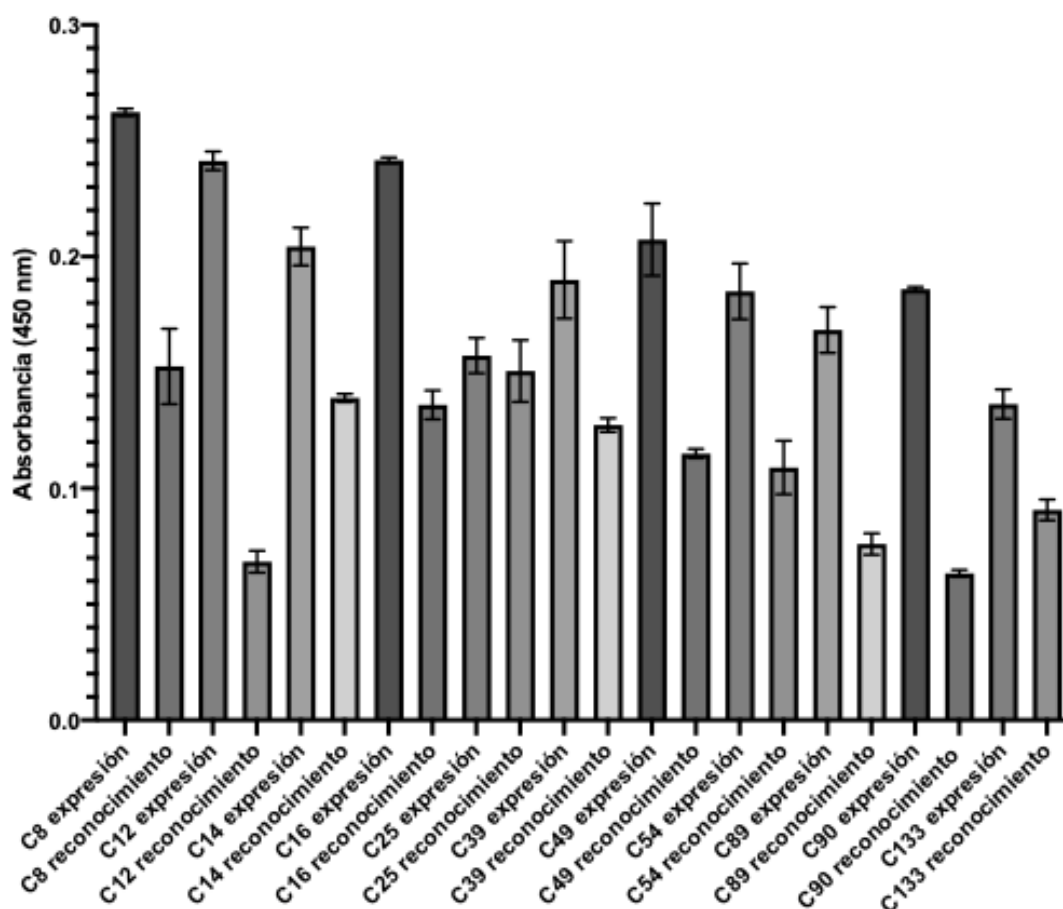


Figura 19. Análisis de la expresión vs el reconocimiento de los vNARs candidatos que reconocen el blanco molecular IL6R/IL-6.

3.5 Renaturalización *in situ*: “On column refolding”

3.5.1 Obtención y clarificación de cuerpos de inclusión

Los resultados obtenidos de la tinción de Coomassie y la inmunodetección confirmaron que la proteína W1β6 se encontraba formando cuerpos de inclusión (Figura 20).

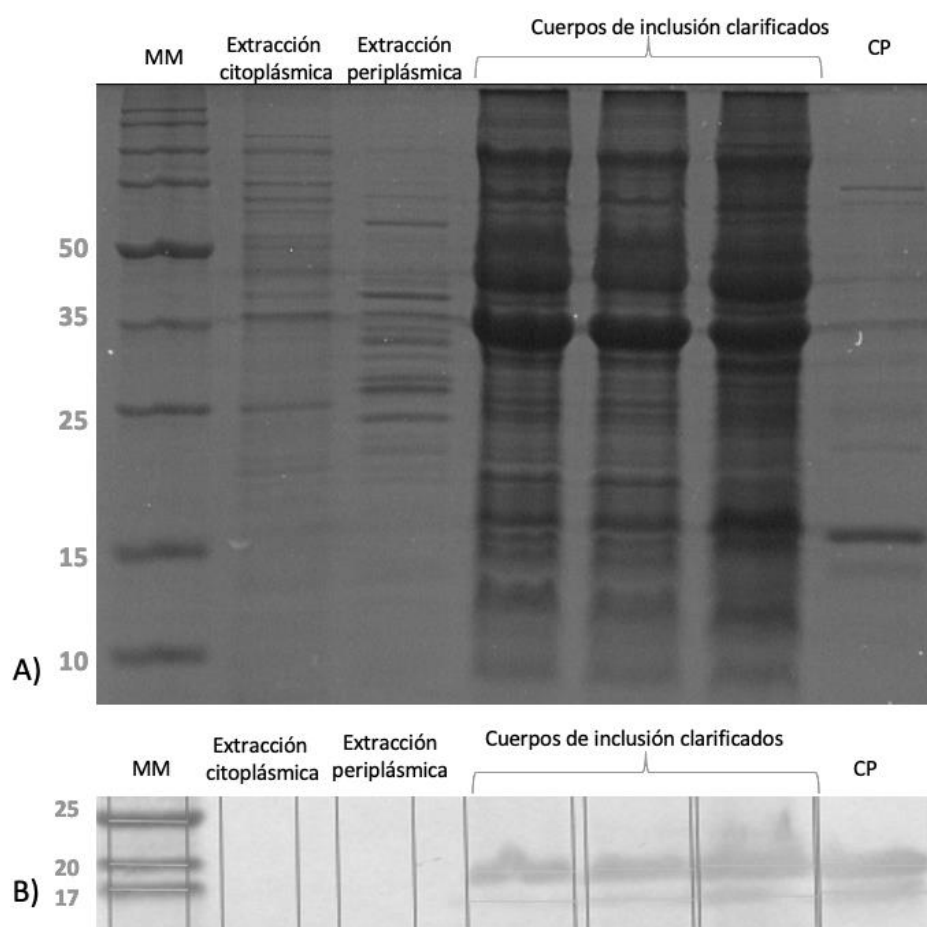


Figura 20. Análisis de la presencia del vNAR W1 β 6 en extracción citoplásmica, periplásmica y en cuerpos de inclusión clarificados. A) Tinción de Coomassie. B) Inmunodetección. Donde, MM corresponde al marcador molecular; CP corresponden al vNAR TN16.

3.5.2 Purificación desnaturalizante

Se cargó a la columna una concentración de proteína total de 0.378 mg/mL de los cuerpos de inclusión clarificados. Se analizaron las fracciones de la purificación desnaturalizante, pero medio de ELISA (Figura 21).

Los resultados del ELISA para detectar el vNAR W1 β 6 de las fracciones obtenidas, se analizaron por medio de un ANOVA de una vía y se encontraron que las fracciones 13; 26; 27; 28; 29; 30; 31 y 32 fueron significativamente diferentes con respecto al blanco. Siendo la fracción 13 de 200 mM de imidazol la que presentó una mayor observancia, por lo que es probable que la proteína haya eluido en esa concentración como se puede observar en la Figura 22. Estos resultados se corroboraron por medio tinción de Coomassie e inmunodetección.

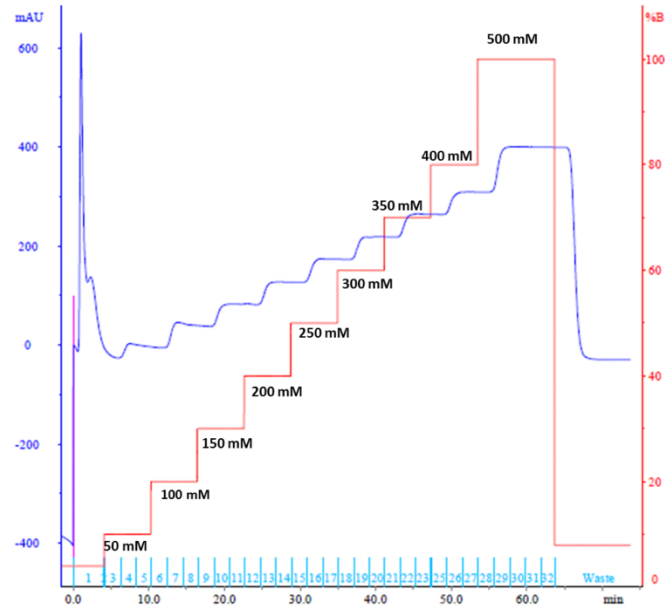


Figura 21. Cromatograma de la purificación desnaturalizante de W1B6 con DNTI500. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestran las miliunidades de absorbancia y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B (DNTI500). Los números en celeste representan las fracciones que se recuperaron durante el proceso de renaturalización.

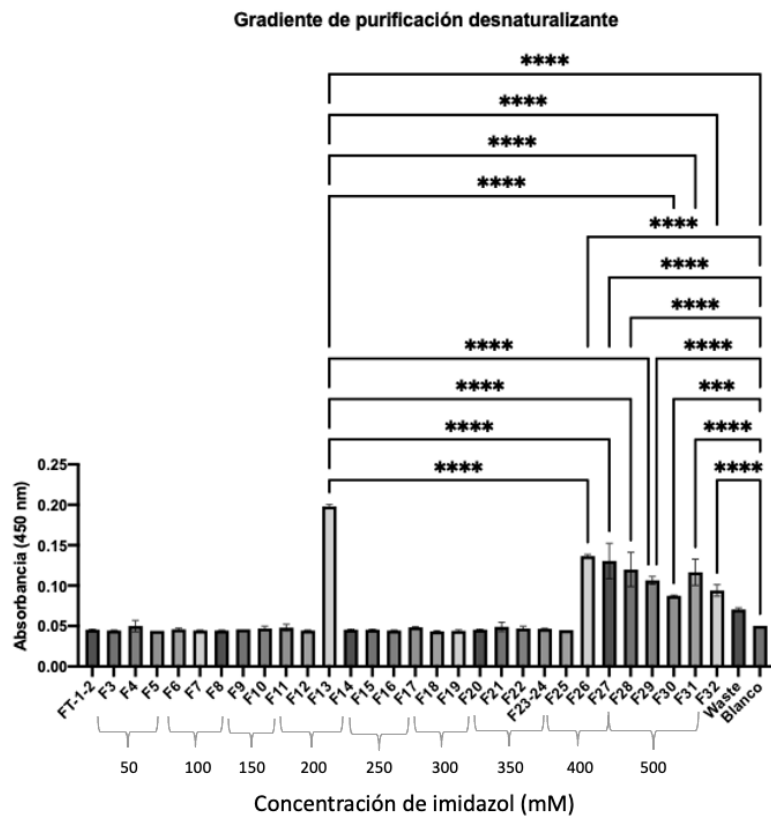


Figura 22. ELISA de expresión de las fracciones obtenidas a partir de la purificación desnaturalizante por FPLC. Donde, FT corresponde a Flow Through; Waste a la fracción de desperdicio; blanco es leche al 8%. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**) = $P < 0.01$; (***) = $P < 0.001$; (****) = $P < 0.0001$.

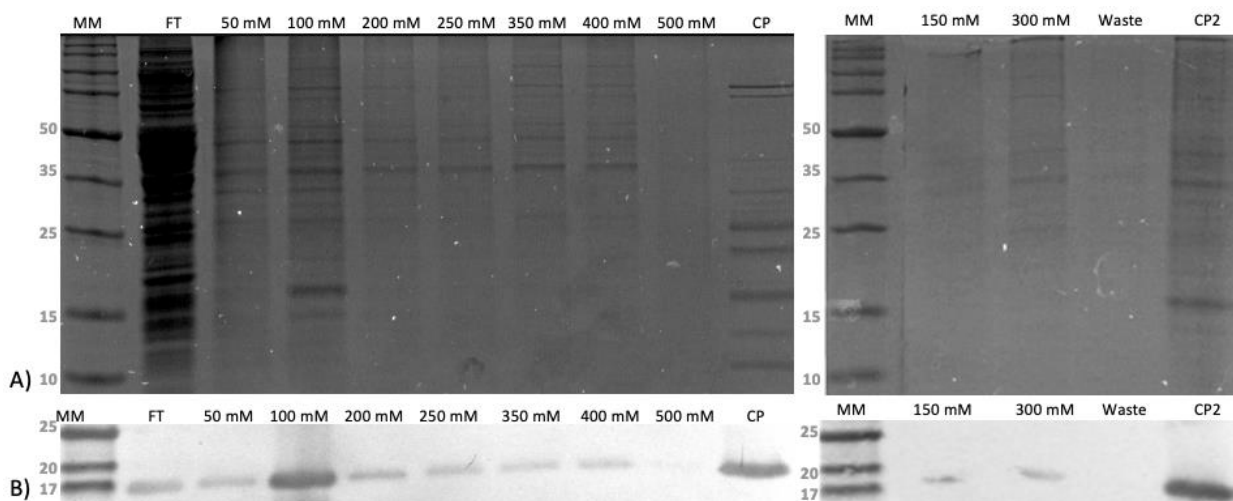


Figura 23. Análisis de la presencia del vNAR W1 β 6 en las fracciones de la purificación desnaturalizante. A) Tinción de Coomassie B) Inmunodetección. Donde, MM corresponde al marcador de peso molecular; FT al Flow Through; control positivo es el vNAR anti CD63; Waste a la fracción de desecho recolectada al terminar la purificación; CP2, control positivo es la fracción de 100 mM.

Se observó, que en la fracción de 100 mM eluyó la mayor cantidad de la proteína en su estado desnaturalizado, ya que se encontró presente en la tinción de Coomassie y esto fué respaldado por la presencia de una banda en la inmunodetección (Figura 23). Mediante volumetría, se infirió la concentración de proteína en la fracción de 100 mM, es de 7.78 ng/ μ L. Sin embargo, dichas fracciones se encontraban concentradas veinte veces por medio de precipitación con TCA, por lo que la cantidad de proteína fue de 0.389 ng/ μ L. El volumen total de la fracción de 100 mM recuperada a partir de la purificación fue de aproximadamente 5 mL por lo que se recuperaron 1.95 μ g.

3.5.3 Renaturalización del vNAR W1 β 6

Durante el primer ensayo de renaturalización de los cuerpos de inclusión clarificados, estos se solubilizaron utilizando hidrocloreuro de guanidina 6 M y las soluciones A2, y A3 se trabajaron con una concentración de imidazol de 40 mM. Sin embargo, al realizar la detección por medio de un ELISA se observó que la proteína de interés W1 β 6 eluyó en las fracciones 1-4 durante el lavado inicial. Por lo que, muy poca proteína se sometió al gradiente de renaturalización (Figura 24), a pesar de presentarse un pico en la fracción de 150 mM de imidazol, no se detectó el vNAR de interés y pudo tratarse de otra proteína presente en el proceso de renaturalización. Debido a esto, se modificaron las concentraciones de imidazol utilizadas en las

soluciones A2 y A3 para tener una concentración de imidazol de 20 y 5 mM, respectivamente y evitar que la proteína eluyera durante el lavado inicial.

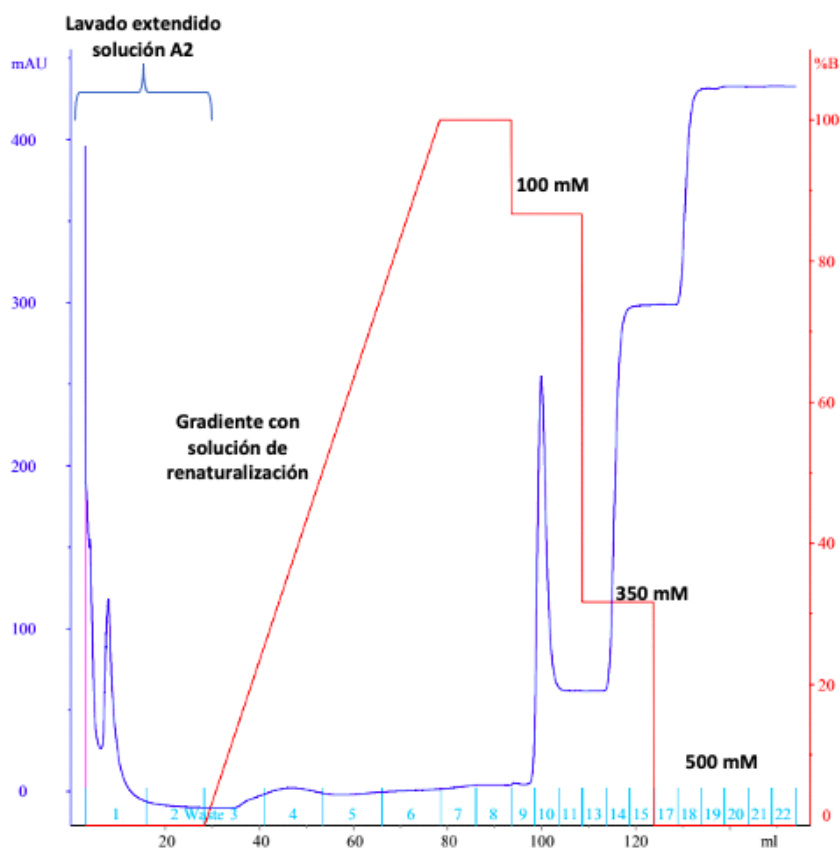


Figura 24. Cromatograma de la renaturalización de la proteína W1β6 con hidrocloreuro de guanidida 6 M como agente desnaturante. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestra las miliunidades de absorbancia y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B de renaturalización. Los números en celeste representan las fracciones que se recuperaron durante el proceso de renaturalización.

Al no contar con más hidrocloreuro de guanidina, se solubilizaron los cuerpos de inclusión con urea 8 M. Sin embargo, la proteína de interés W1β6, eluyó de la columna durante el gradiente de renaturalización y no en las condiciones esperadas de 100, 350 y 500 mM. El que la proteína eluyera antes de concluir el gradiente de renaturalización, significó que se obtuvo una mezcla de proteína parcialmente renaturalizada. Para poder descartar que se tratara de alguna falla durante el protocolo se repitió la renaturalización y se obtuvo el mismo comportamiento, donde la proteína eluyó en la fracción 4 como se observa en la Figura 25.

Se analizaron las fracciones mediante ELISA (Figura 26) y se analizaron por medio de una prueba ANOVA de una vía ($p=0$), la prueba de Tukey encontró diferencias significativas con el blanco y las fracciones 1; 2; 3; 4; 5 y 6. Estos resultados respaldan lo que se obtuvo en el cromatograma de renaturalización (Figura

25), ya que se observó que la proteína comenzó a eluir justo cuando inició el gradiente de renaturalización, desde la fracción 1 (F1). Sin embargo, la mayor parte de la proteína de interés eluyó en la fracción 4 (F4), pero no en las fracciones de 100, 350 y 500 mM (F9-F22), que es donde se esperaba que eluyera. Tampoco se detectó en las fracciones de lavado con DNTI500 lo que confirmó que eluyó en su totalidad en las fracciones 4 y 5. Posteriormente, se analizaron las fracciones del Flow Through, el lavado con el tampón A1, la fracción 4, 15, 17 y las dos fracciones del lavado con DNTI500 por tinción de Coomassie e inmunodetección.

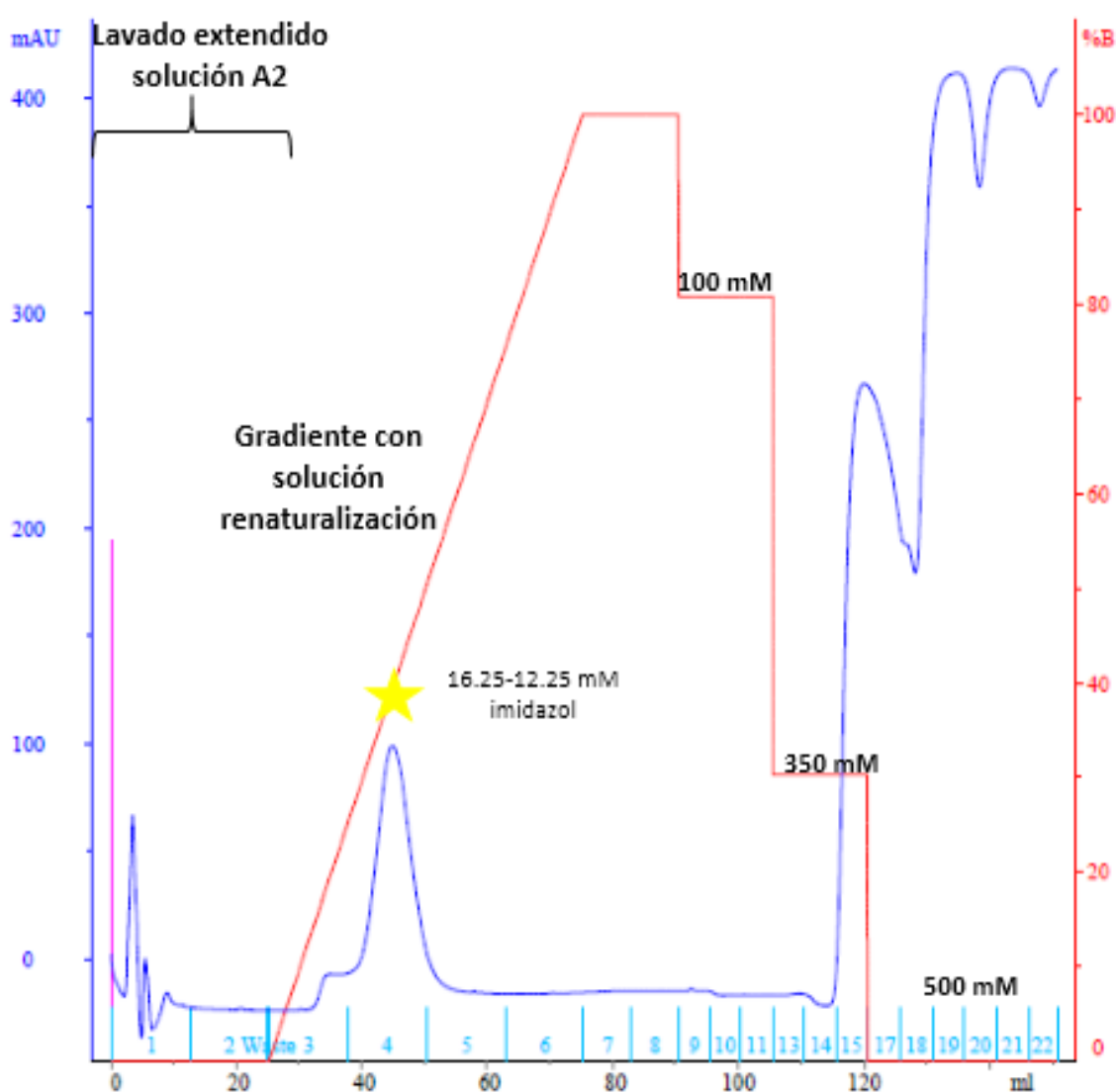


Figura 25. Cromatograma de la renaturalización de la proteína W1β6 con urea 8M como agente desnaturante. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestra las miliunidades de absorción y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B de renaturalización. Los números en celeste representan las fracciones que se recuperaron durante el proceso de renaturalización.

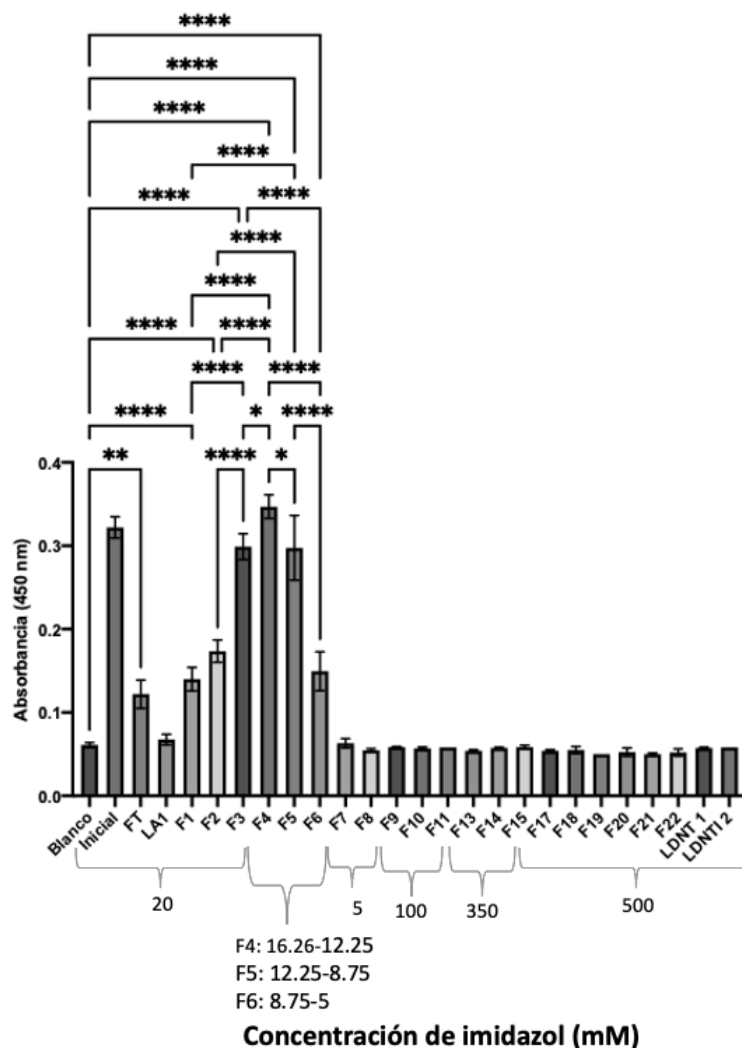


Figura 26. ELISA de expresión de las fracciones obtenidas a partir de la renaturalización de la proteína W1β6. Donde, Inicial corresponde al vNAR solubilizado en el tampón; FT, corresponde a Flow Through; LA1, corresponde a un lavado con el tampón A1; F1-F22, corresponden a las fracciones recuperadas durante la renaturalización; LDNTI1 y LDNTI2, corresponden a los lavados con la solución de DNTI500; blanco, corresponde a leche al 5%. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**) = $P < 0.01$; (***) = $P < 0.001$; (****) = $P < 0.0001$.

Tanto la tinción de Coomassie y la inmunodetección respaldan que la proteína W1β6 eluyó en la fracción 4, sin haber concluido el gradiente de renaturalización. No se detectó proteína en el resto de fracciones analizadas, más que en el Flow Through que correspondió a un porcentaje de proteína que no se adhirió a la columna (Figura 27). Sin embargo, el que la proteína haya eluído en la fracción 4, generó la incógnita de que se desconocía qué porcentaje de la proteína recuperada se encuentra en un estado renaturalizado, parcialmente renaturalizado o desnaturalizado. Por lo que, la única alternativa para determinar si se tenía una proteína funcional era el realizar un ELISA de reconocimiento, para esto se dializó la proteína en PBS para eliminar el imidazol, urea y L-arginina y evitar interferencias durante en el ensayo.

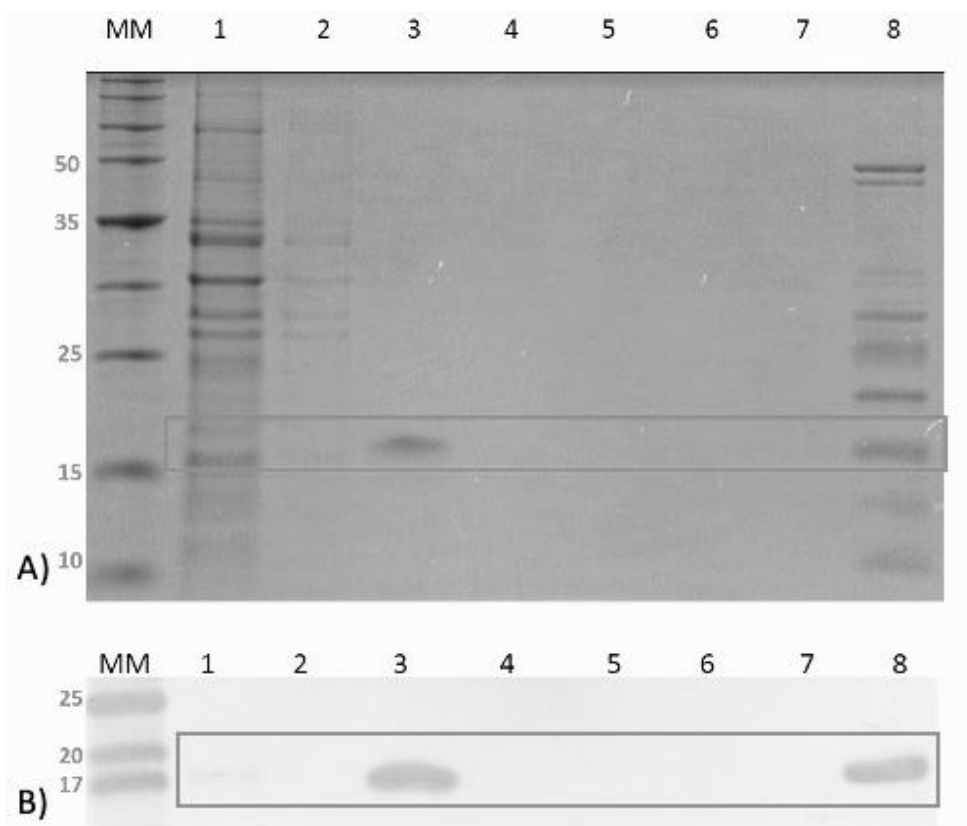


Figura 27. Análisis de la presencia del vNAR W1 β 6 en las fracciones de la renaturalización. A) Tinción de Coomassie; B) Inmunodetección. Donde, MM corresponde al marcador de peso molecular; 1 corresponde al Flow Through; 2 corresponde al lavado con el tampón A1; 3 corresponde a la fracción 4 del gradiente de renaturalización (16.25-12.25 mM imidazol); 4 corresponde a la fracción 15 (350 mM imidazol); 5 corresponde a la fracción 17 (500 mM imidazol); 6 y 7 corresponden a los lavados con DNTI500; 8 corresponde al control positivo el vNAR anti CD63.

3.5.4 ELISA de reconocimiento del vNAR renaturalizado

Los resultados del reconocimiento se analizaron por medio de una prueba ANOVA de una vía, donde se encontró que hubo diferencias significativas entre las medias ($p=0.01993$). El análisis de Tukey arrojó diferencias significativas entre el reconocimiento del vNAR W1 β 6 por la IL-1 β ($p=0.0198$), con respecto al blanco y al control negativo ($p=0.04208$), mientras que el blanco y el control negativo no presentaron diferencias significativas ($p=0.4322$). Estos resultados permitieron observar que hubo reconocimiento por parte del vNAR renaturalizado (Figura 28). La cantidad de proteína que reconoce fue mínima a comparación de la alta expresión del vNAR W1 β 6 (0.66), lo que podría indicar que el vNAR reconoció débilmente a su antígeno o que la cantidad de proteína renaturalizada fue muy poca, lo que podría haber influido en los resultados. También, es de resaltar que en este ensayo se debió haber incluido el vNAR W1 β 6 en su estado desnaturalizado para poder comparar diferencias entre el reconocimiento con el vNAR renaturalizado.

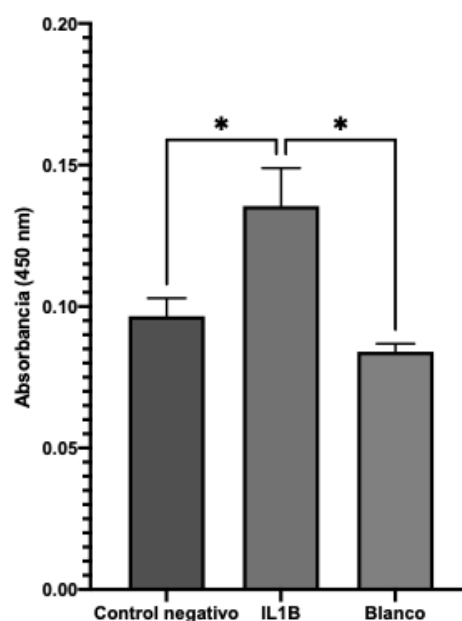


Figura 28. Ensayo de ELISA de reconocimiento del vNAR W1 β 6 renaturalizado contra su blanco molecular la interleucina 1 β . Blanco: leche al 8%; Control positivo (C+): vNAR anti CD63; Expresión: ELISA de expresión del vNAR W1 β 6; Control negativo: BSA al 3%. ANOVA de una vía (*)= P <0.05; (**)= P <0.01; (***)= P < 0-001; (****)= P < 0.0001.

3.6 Segunda búsqueda de clonas que reconozcan a la IL-1 β

Paralelamente, se realizó una segunda búsqueda de clonas funcionales a partir del proceso de bioselección realizado en diciembre del 2021. Se seleccionaron 50 colonias de la ronda tres y 50 de la ronda cuatro, se analizaron por medio de PCR y se detectaron aquellas clonas idénticas a las bibliotecas originales (Figura 29 y Figura 30).

Tabla 10. Número de colonias obtenidas de la infección de *E.coli* ER2738 con los fagos de la bioselección anti IL1 β .

Ronda de bioselección	Número de colonias
Ronda 3	56
Ronda 3 duplicado	75
Ronda 4	109
Ronda 4 duplicado	Incontable

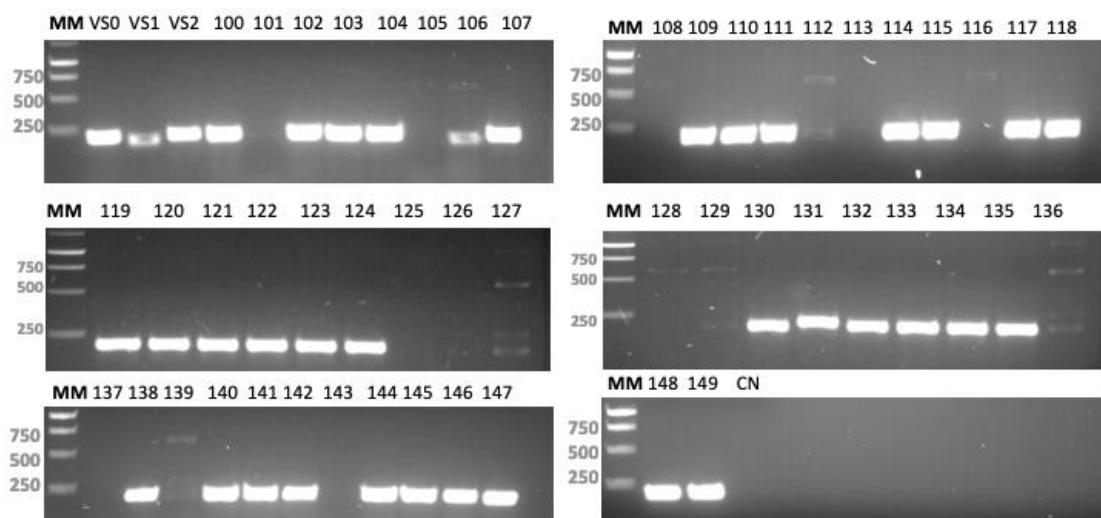


Figura 29. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la segunda búsqueda de la ronda 3 de bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

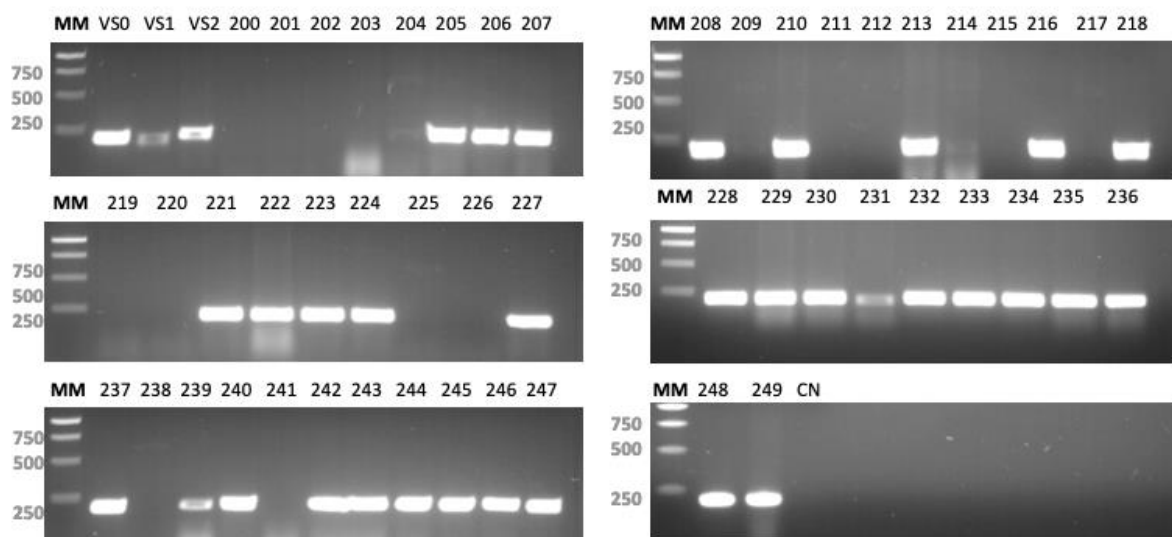


Figura 30. Análisis de productos de PCR de las colonias aisladas de la segunda búsqueda de la ronda 4 de bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas; y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

Se obtuvieron 25 clonas que no correspondieron a las secuencias originales de las tres bibliotecas utilizadas durante la bioselección (VS0, VS1 y VS2), se analizaron nuevamente por PCR, para identificar aquellas con el fragmento vNAR de interés (Figura 31) y se tuvieron 13 clonas positivas (101, 105, 108, 116, 126, 139, 200, 201, 202, 209, 212, 217, 225), las cuales se mandaron a secuenciar y se obtuvieron cuatro clonas con

una secuencia completa y sin codones de paro en el CDR3. Las cuales, correspondieron a las clonas 200, 202, 209 y 225, provenientes de la cuarta ronda de bioselección anti IL1 β y pertenecen a la biblioteca VSO (Figura 32).

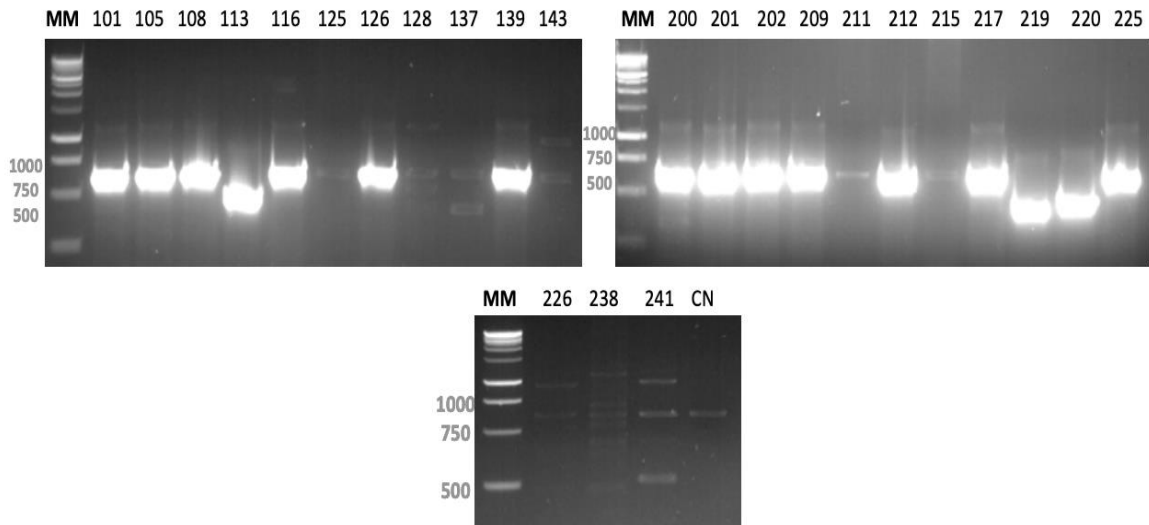


Figura 31. Detección del fragmento vNAR en las clonas que no pertenecen a las bibliotecas originales de la segunda búsqueda de la bioselección anti IL-1 β , en gel de agarosa al 2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; los carriles numerados, corresponden a las colonias evaluadas; y CN, corresponde al control negativo compuesto de la reacción de PCR sin muestra de DNA.

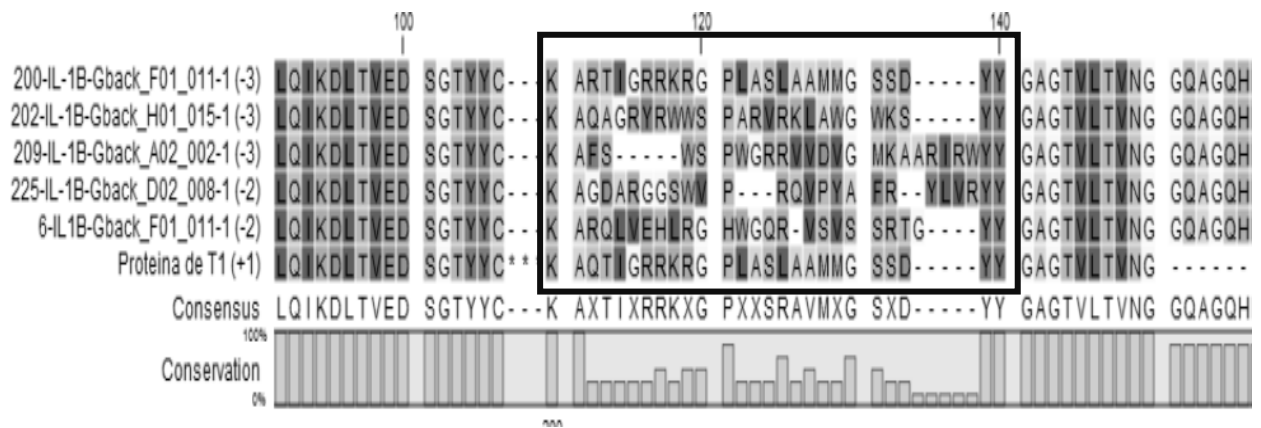


Figura 32. Alineamiento del CDR3 de las secuencias de la segunda búsqueda que presentaron un CDR3 distinto al marco de las bibliotecas originales. En el recuadro se resalta la secuencia correspondiente al CDR3 de cada clona.

Las clonas 200, 202 y 209 están conformadas por 146 aminoácidos y tienen un tamaño teórico aproximado de 16.06 kDa. Mientras que la clona 225 está conformada por 150 aminoácidos y tiene un tamaño teórico aproximado de 16.5 kDa. Resalta que la clona 200, que presentó casi la misma secuencia que la biblioteca VSO, con la diferencia en la posición 112 en el CDR3, donde contiene una arginina en vez de una glutamina.

3.6.1 Extracción y purificación de plásmido por lisis alcalina de las clonas 200, 202, 209 y 225

Los plásmidos de las clonas 200, 202, 209 y 225 se encontraban íntegros y dentro del rango de tamaño esperado (Figura 33).

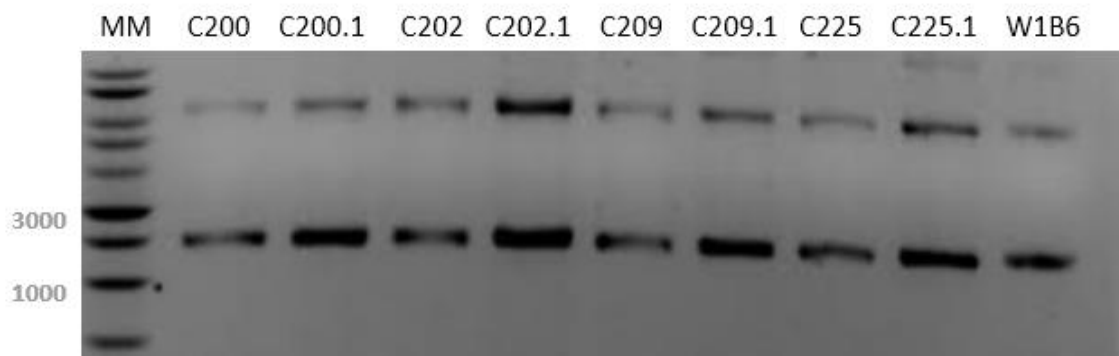


Figura 33. Análisis de la presencia del plásmido de las secuencias 200, 202, 209 y 225 por electroforesis de un gel de agarosa al 1.2%. Donde MM, corresponde al marcador molecular; para las clonas 200.1, 202.1, 209.1 y 225.1 corresponden a que se cargaron 2 µL del plásmido en el gel mientras que para el resto se cargó 1 µL. Se utilizó como control positivo el plásmido extraído que codifica para el vNAR W1β6.

3.6.2 Expresión a pequeña escala y extracción periplásmica de las proteínas expresadas por las clonas 200, 202 y 209

Se realizó la expresión a pequeña escala de los vNARs producidos por las clonas 200, 202, 209 y 225 al tomar una colonia transformada de *E. coli* BL21 (DE3) y posteriormente se realizó la extracción periplásmica de las proteínas. Se detectó la presencia de los vNARs en los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica mediante ELISA (Figura 34) y se analizaron los resultados mediante un ANOVA de una vía, los sobrenadantes de la solución hipertónica y de magnesio presentaron diferencias significativas de la clona 200 y el sobrenadante de la solución de sulfato de magnesio de la clona 209 presentaron diferencias respecto al blanco (Figura 34).

La expresión de las proteínas en las clonas 202 y 225 fue baja y se cuantificó la proteína total por medio de Nanodrop Lite (Thermo Scientific), se ajustó la cantidad a analizar en 100 µg por muestra de cada clona para la tinción de Coomassie y la inmunodetección.

Una vez determinada la proteína total, se concentraron los sobrenadantes de la solución de sulfato de magnesio por medio de precipitación con TCA, la clona 200 se concentró cinco veces; la clona 202 se

concentró dos veces y las clonas 209 y 225 se concentraron 3 veces y se detectaron las proteínas expresadas por las cuatro clonas analizadas en la tinción de Coomassie e inmunodetección (Figura 35)

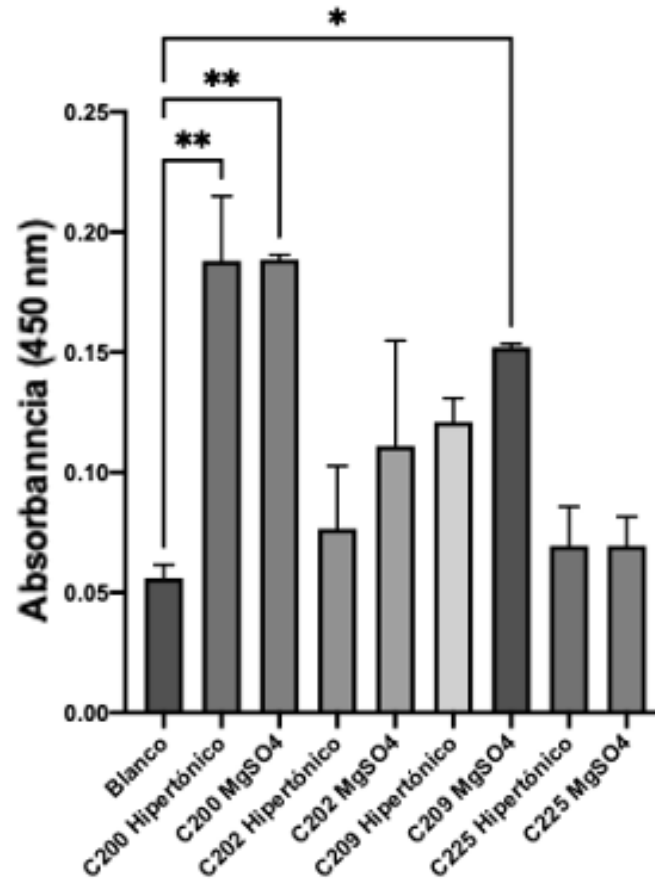


Figura 34. ELISA de expresión de los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica de las clonas 200, 202, 209 y 225. Donde, el blanco es leche al 5% y CP corresponde al control positivo el vNAR Anti-CD63. ANOVA de una vía (*)= P <0.05; (**) = P <0.01; (***)= P < 0-001; (****)= P < 0.0001.

Tabla 11. Cuantificación de proteína total de las clonas 200, 202, 209 y 225 por Nanodrop.

Clona	Solución hipertónica (µg/µl)	Solución de MgSO4 (µg/µl)
200	5.621	1.193
202	6.373	3.623
209	6.725	2.669
225	6.041	2.549

La proteína expresada por la clona 225 presentó bandas tenues y se descartó. Las clonas 200, 202 y 209 se expresaron nuevamente en un volumen de cultivo de 500 mL, se detectó la presencia de las proteínas en los sobrenadantes de la extracción periplásmica mediante ELISA (Figura 36). Y se analizaron los resultados con un ANOVA de una vía, los dos sobrenadantes de las clonas 200 y 209 y el sobrenadante de la solución de sulfato de magnesio de la clona 202 presentaron diferencias significativas respecto con el blanco. Se seleccionaron los sobrenadantes de la solución de sulfato de magnesio por tener las mayores absorbancias para realizar un ELISA de reconocimiento.

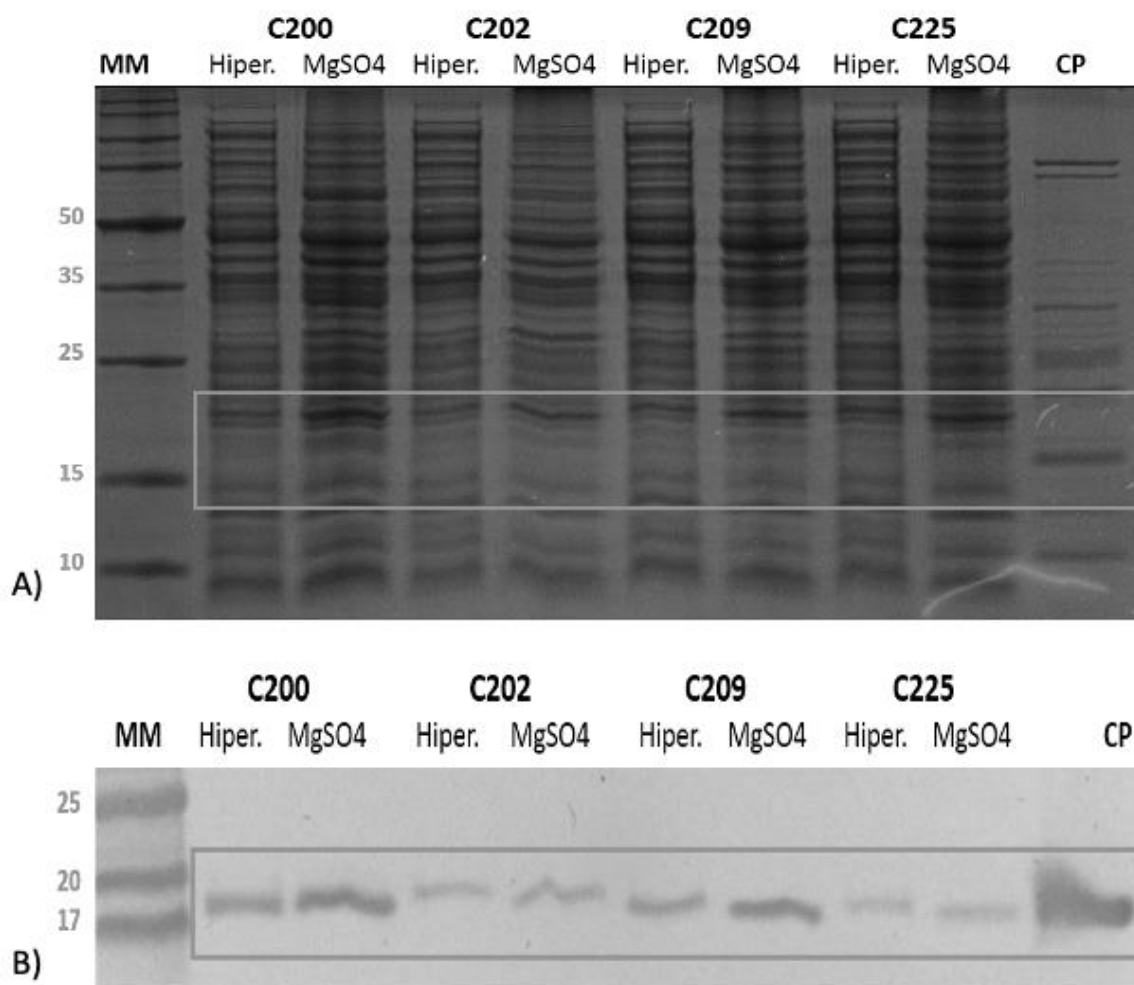


Figura 35. Análisis de la presencia del vNAR de las clonas 200, 202, 209 y 225 en los sobrenadantes de la extracción periplásmica por electroforesis desnaturalizante de tricina. A) Tinción Coomassie. B) Inmunodetección. Donde, MM corresponde al marcador de peso molecular; CP corresponde al control positivo el vNAR anti CD63; Hiper corresponde al sobrenadante de la solución hipertónica y $MgSO_4$ corresponde al sobrenadante de la solución de sulfato de magnesio.

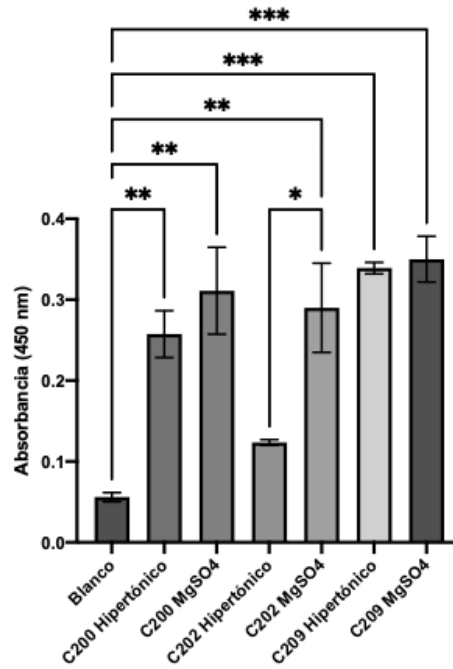


Figura 36. ELISA de expresión de los sobrenadantes obtenidos de la extracción periplásmica de la expresión 500 mL de cultivo de las clonas 200, 202 y 209. Donde, el blanco es leche al 5%. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**)= $P < 0.01$; (***)= $P < 0.001$; (****)= $P < 0.0001$.

3.6.3 ELISA de reconocimiento por las clonas 200, 202 y 209

Las clonas 200, 202 y 209 no presentaron reconocimiento por la IL-1 β de acuerdo con el ANOVA de una vía de los resultados del ELISA de reconocimiento (Figura 37).

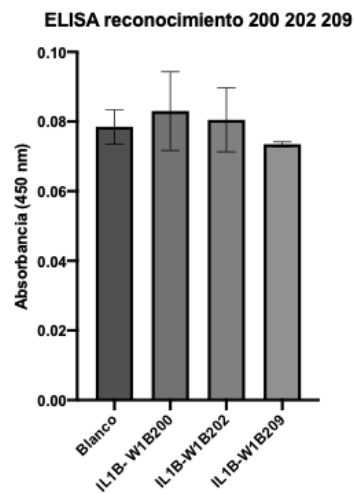


Figura 37. Ensayo de ELISA de reconocimiento del vNAR expresado por las clonas 200, 202 y 209 contra su blanco molecular la interleucina 1 β . Blanco: leche al 5%. ANOVA de una vía (*) = $P < 0.05$; (**)= $P < 0.01$; (***)= $P < 0.001$; (****)= $P < 0.0001$.

3.7 Expresión a gran escala del vNAR recombinante

De la expresión a gran escala de los vNARs IL6R-8 e IL6R-16, se determinó la cantidad teórica de vNAR obtenido de los extractos periplásmicos mediante su cuantificación por Nanodrop se supuso que el 1% de la proteína total expresada correspondía al vNAR de interés (Tabla 14).

Tabla 12. Cuantificación por Nanodrop de la concentración de proteína total en extractos periplásmicos.

vNAR	Solución hipertónica (mg)	Solución de sulfato de magnesio	Cantidad de vNAR (mg)
IL6R-8	1184.56	1068.96	22.53
IL6R-1616 (10-dic-22)	1555.2	851.52	24.06
IL6R-16 (20-dic-22)	927.66	490.38	14.18

3.8 Purificación por cromatografía de afinidad a metales IMAC

Al no contar con el material suficiente de los vNARs IL6R-8 e IL6R-16, se realizó un gradiente de purificación para la clona 39 para determinar las condiciones óptimas de elución (Figura 38), se detectó la presencia del vNAR mediante ELISA.

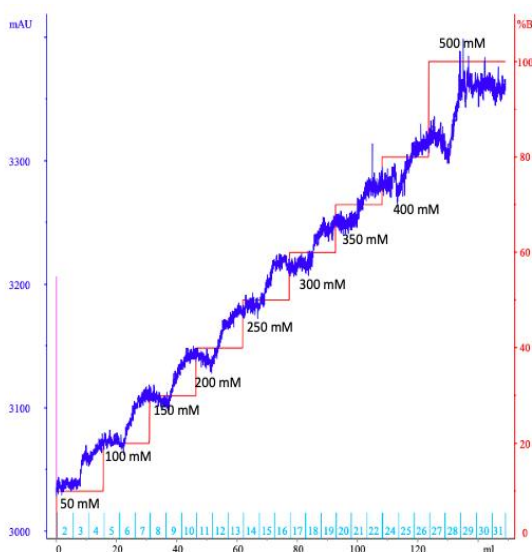


Figura 38. Gradiente de purificación clona 39. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestran las miliunidades de absorbancia y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B (NPI500). Los números en celeste representan las fracciones que se recuperaron durante la purificación.

El vNAR eluyó en las concentraciones de 150, 250 y 300 mM de imidazol de acuerdo con los resultados del ELISA (Figura 39). Las tres fracciones de cada una de las concentraciones se juntaron y se analizaron para determinar la pureza y presencia del vNAR en cada fracción, mediante tinción de Coomassie e inmunodetección; esos resultados arrojaron que el vNAR eluyó en las fracciones de 100, 200 y 250 mM de imidazol (Figura 40).

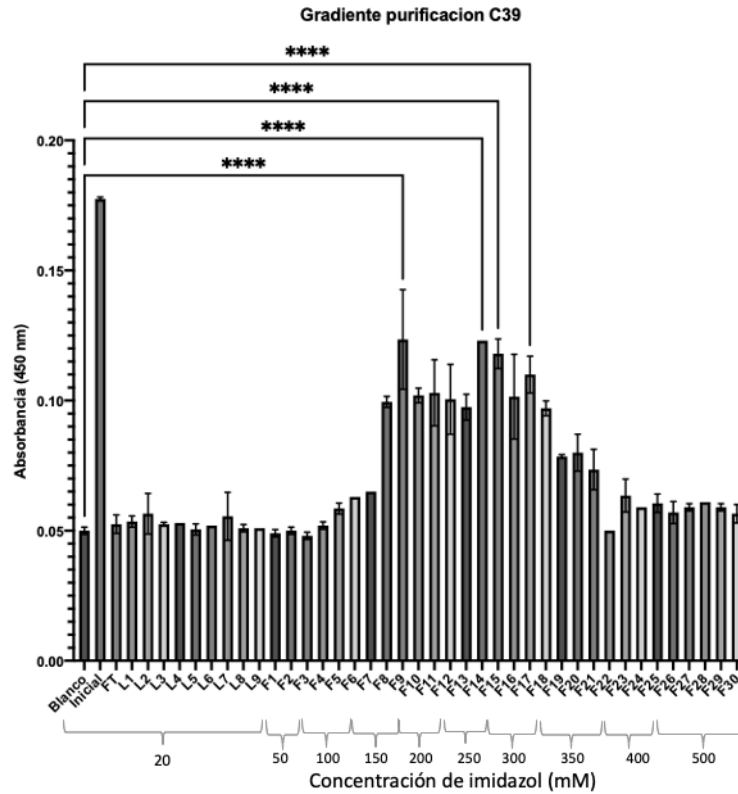


Figura 39. ELISA de expresión para detección del vNAR de la clona 39 en el gradiente de purificación. Donde, blanco corresponde a leche al 5%; inicial, a la muestra de la proteína cargada en la columna; L1-L9: lavados del 1 al 9 realizados con 20 mM de imidazol; F1-F30, fracciones recolectadas durante el gradiente a diferentes concentraciones de imidazol. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**)= $P < 0.01$; (***)= $P < 0.001$; (****)= $P < 0.0001$.

Para el vNAR IL6R-8 se purificaron 264 mL del lisado periplásmico con el programa de la Figura 41, por la naturaleza viscosa del lisado se diluyó en 100 mL de la solución de elución A NPIO. El vNAR IL6R-8, se detectó en las fracciones 10, 11 y 12 (Figura 42), no obstante, estas fracciones presentaban impurezas y se repurificaron con el programa descrito en el inciso B de la Figura 41. En la repurificación, el vNAR IL6R-8 eluyó en la fracción 18 de 500 mM de imidazol (Figura 43). Se dializó la fracción 18 y se concentró veinte veces para verificar la pureza de la proteína, se cuantificó la proteína por nanodrop y obtuvo a una

concentración de $0.006 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, esta proteína se utilizó para los ensayos de reconocimiento del antígeno IL6R/IL6.

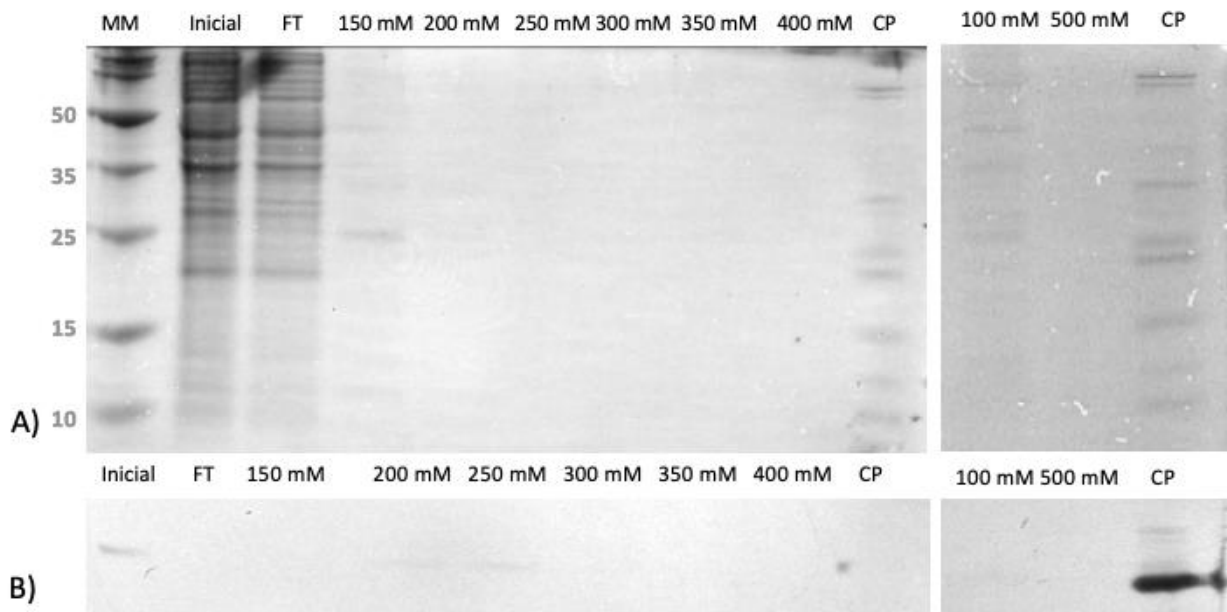


Figura 40. Análisis de las fracciones obtenidas del gradiente de purificación del vNAR clona 39. A) Tinción de Coomassie. B) inmunodetección del vNAR de la clona 39. Donde, MM corresponde al marcador molecular; Inicial, a la muestra inicial de la proteína cargada en la columna; FT, del inglés Flow Trough, al remanente recuperado de la recirculación de la muestra en la columna; CP, al control positivo el vNAR anti CD63 y el resto a las concentraciones de imidazol analizadas.

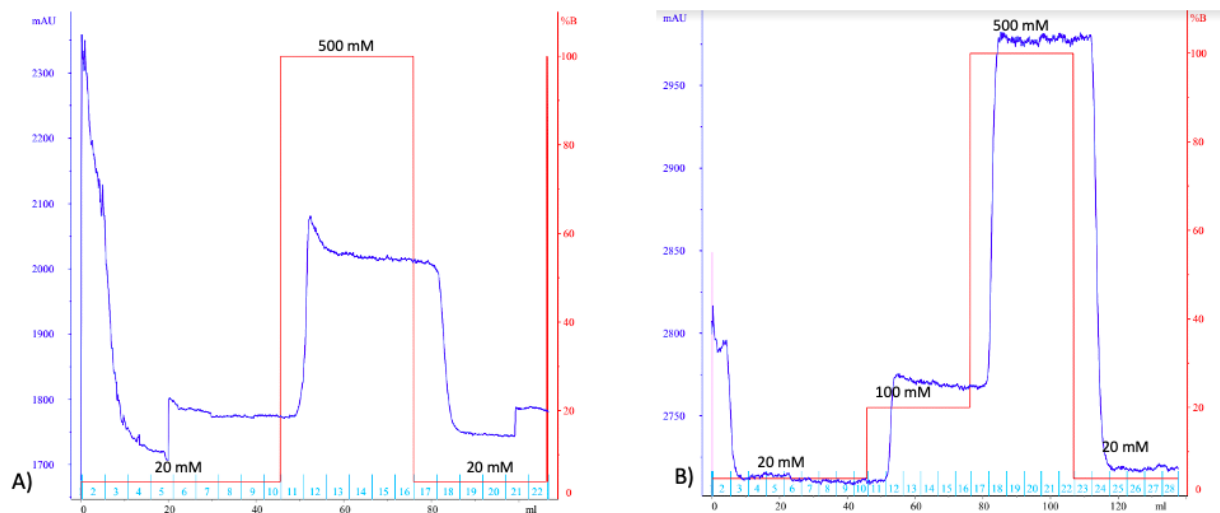


Figura 41. Programa de purificación del vNAR IL6R-8. A) Purificación lisado periplásmico. B) Repurificación clona 8. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestran las miliunidades de absorbancia y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B (NPI500). Los números en celeste representan las fracciones que se recuperaron durante el proceso de purificación

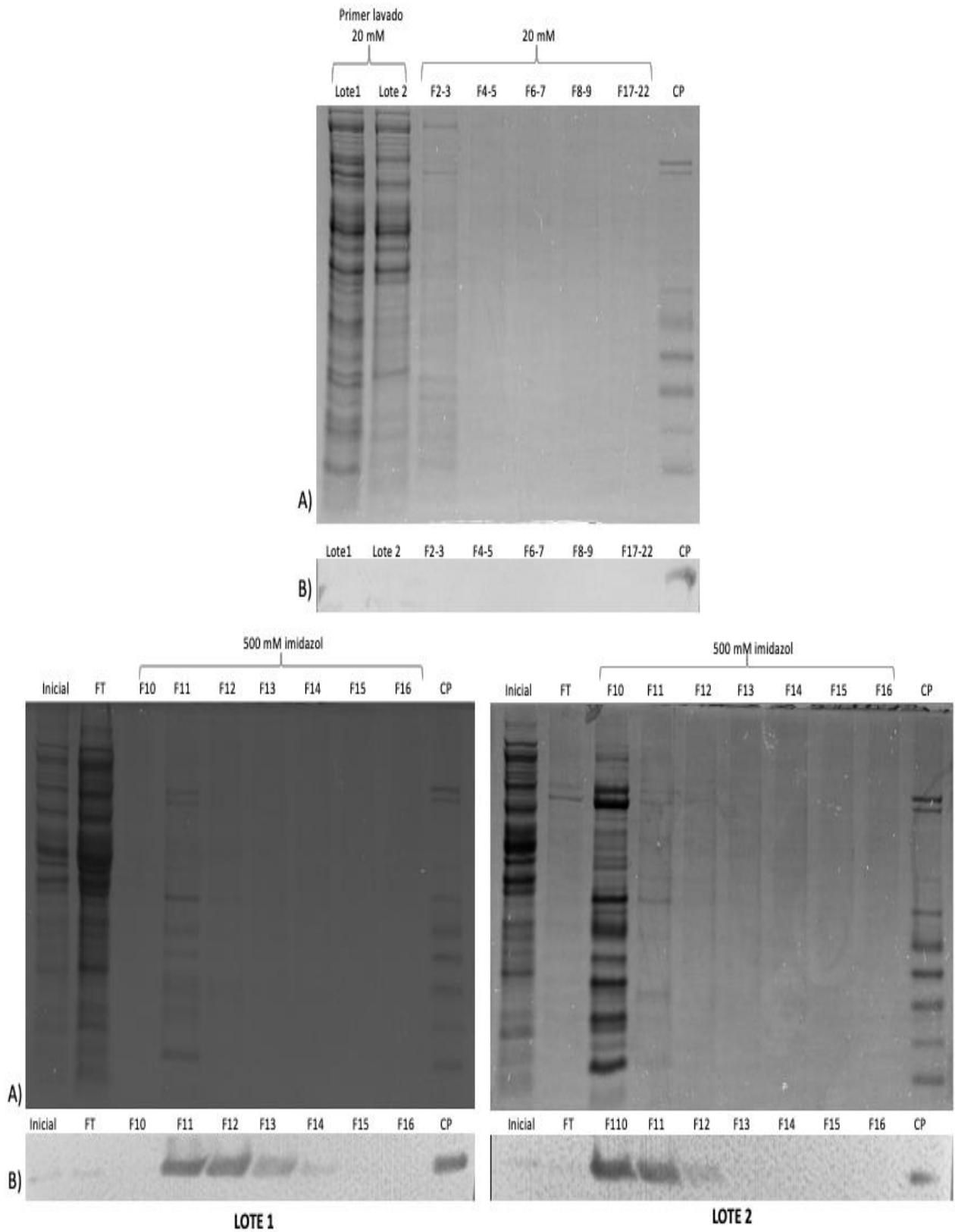


Figura 42. Análisis de las fracciones obtenidas de la purificación del vNAR IL6R-8. A) Tinción de Coomassie. B) Inmunodetección. Donde, Inicial, corresponde a la muestra inicial para purificar; FT, al Flow Trough que es el lisado recuperado después de haber sido recirculado por la columna; CP, al control positivo el vNAR anti CD63.

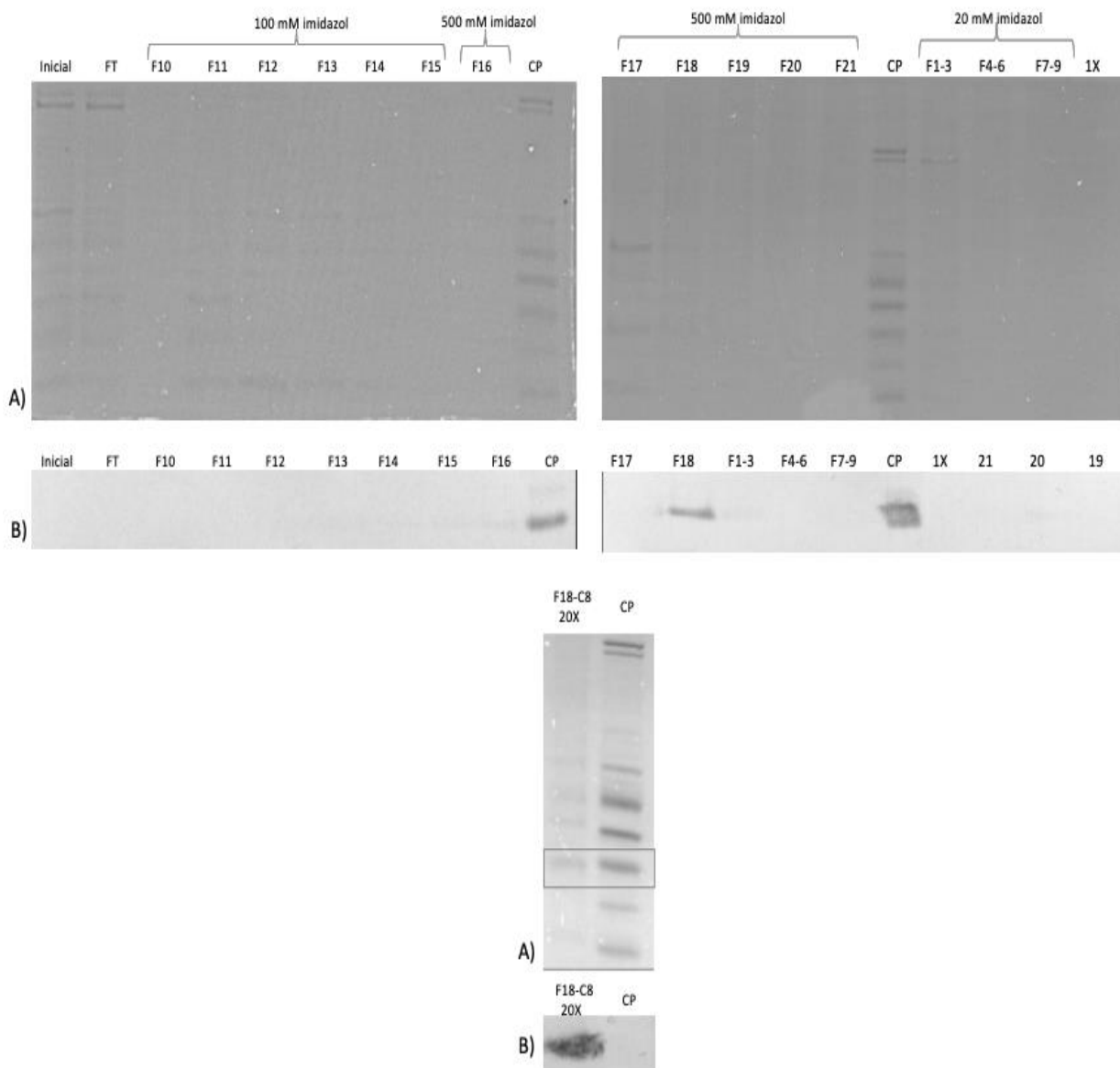


Figura 43. Análisis de las fracciones obtenidas de la repurificación de las fracciones 11 y 12 de la purificación del vNAR IL6R-8. A) Tinción de Coomassie. B) Inmunodetección. Donde, Inicial, corresponde a la muestra inicial para purificar; FT, al Flow Trough que es el lisado recuperado después de haber sido recirculado por la columna; CP, al control positivo el vNAR anti CD63; 1X, es un carril vacío; F18-C8 20X, es la proteína purificada IL6R-8 concentrada 20 veces.

Para el vNAR IL6R-16, también se siguió el programa de purificación descrito en la Figura 44. Este vNAR eluyó puro en las fracciones 12 a 14 en una concentración de 500 mM de imidazol (Figura 45). Se juntaron las fracciones 11 y 12; 13 y 14 respectivamente, se dializaron y se cuantificaron por nanodrop. Para las fracciones 11 y 12, se obtuvo una concentración de $0.47 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y para 13 y 14, fue de $0.283 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Estas fracciones se guardaron a -80°C en tubos de plástico y se utilizaron 11 y 12 para los ensayos de reconocimiento del antígeno IL6R/IL6.

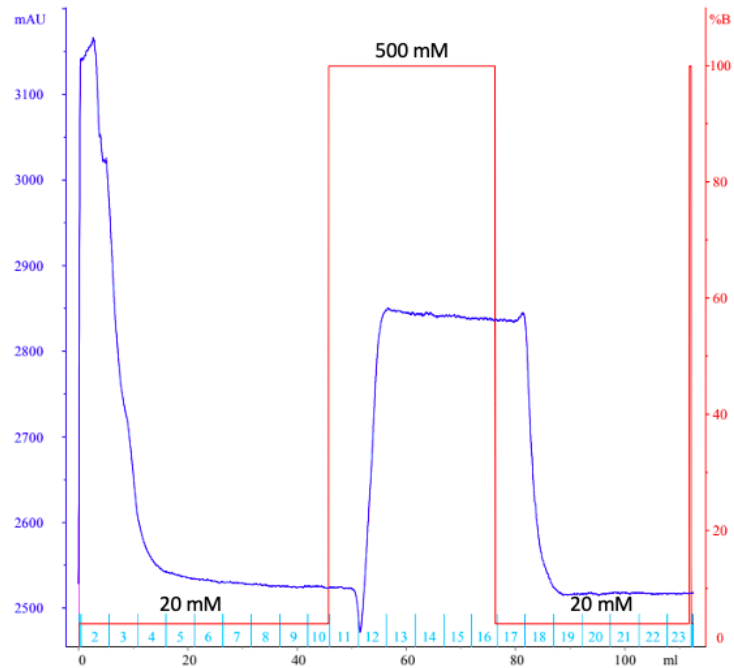


Figura 44. Programa de purificación del vNAR expresado por la clona 16. En el eje X se muestra el volumen en mililitros, en el eje Y (azul) se muestran las miliunidades de absorbancia y en el eje Y (rojo) se muestra el porcentaje del tampón B (NPI500). Los números en celeste representan las fracciones que se recuperaron durante el proceso de purificación.

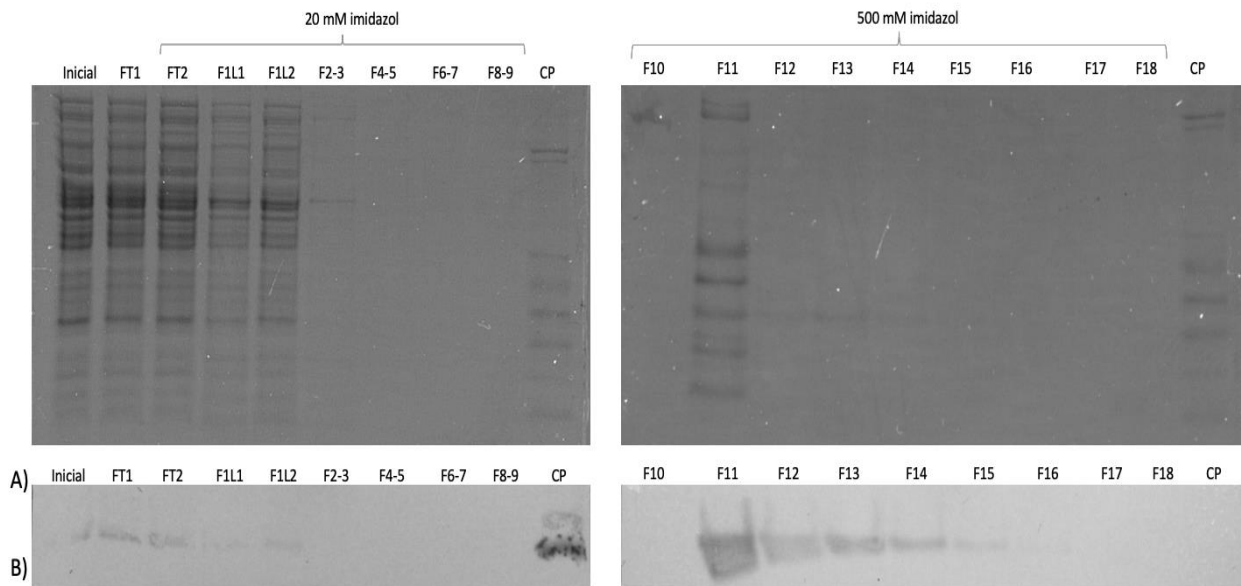


Figura 45. Análisis de las fracciones obtenidas de la purificación del vNAR expresado por la clona 16. Donde, Inicial, corresponde a la muestra inicial para purificar; FT, al Flow Trough que es el lisado recuperado después de haber sido recirculado por la columna; CP, al control positivo el vNAR anti CD63.

3.9 Título de reconocimiento del vNAR a diferentes concentraciones del antígeno IL6R/IL6

El vNAR IL6R-8 demostró un mejor reconocimiento del antígeno respecto al vNAR IL6R-16 y fue capaz de reconocer la concentración mínima de antígeno probada en este ensayo, mientras que el segundo no presentó reconocimiento por el antígeno (Figura 46).

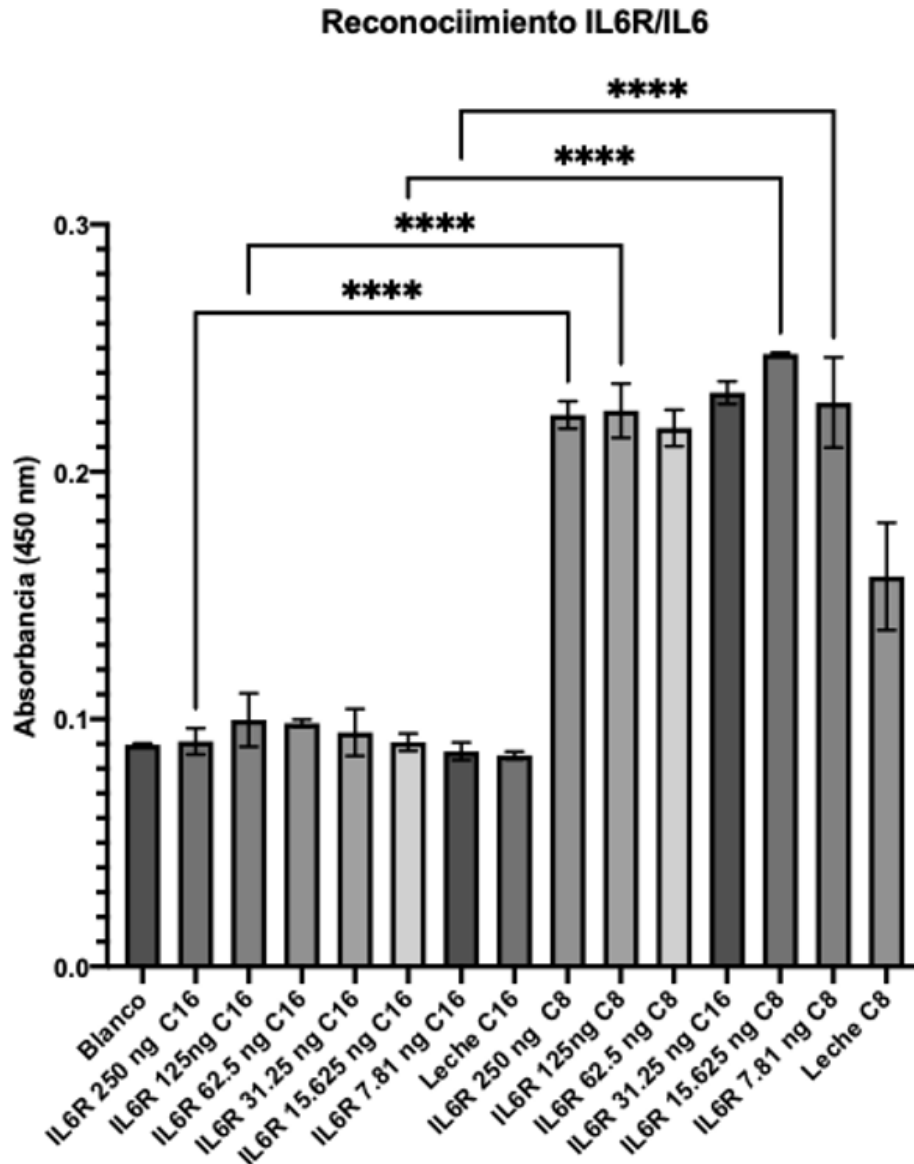


Figura 46. ELISA de reconocimiento del antígeno IL6R/IL6 a diferentes concentraciones por parte de los vNARs expresados por las clonas 8 y 16. Donde, blanco corresponde a leche al 5%; Leche C16 y Leche C8; corresponden al control negativo. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**) = $P < 0.01$; (***) = $P < 0.001$; (****) = $P < 0.0001$.

3.10 Ensayo de neutralización del complejo IL6R/IL6

Los resultados del ensayo de neutralización *in vitro* en la línea celular C33A (Figura 47), arrojaron que no hubo diferencias significativas entre el control positivo ni el control negativo, probablemente la quimera de IL6R/IL6 no estimuló las células para que produjeran el VEGF o el vNAR V13 no fue capaz de detectarlo. Además, se obtuvo muy poca señal de los vNARs IL6R-8 e IL6R-16, ya que no se obtuvo por lo menos una absorbancia de 0.1, lo que hace sospechar que la cantidad de vNAR utilizada en este ensayo fue muy baja.

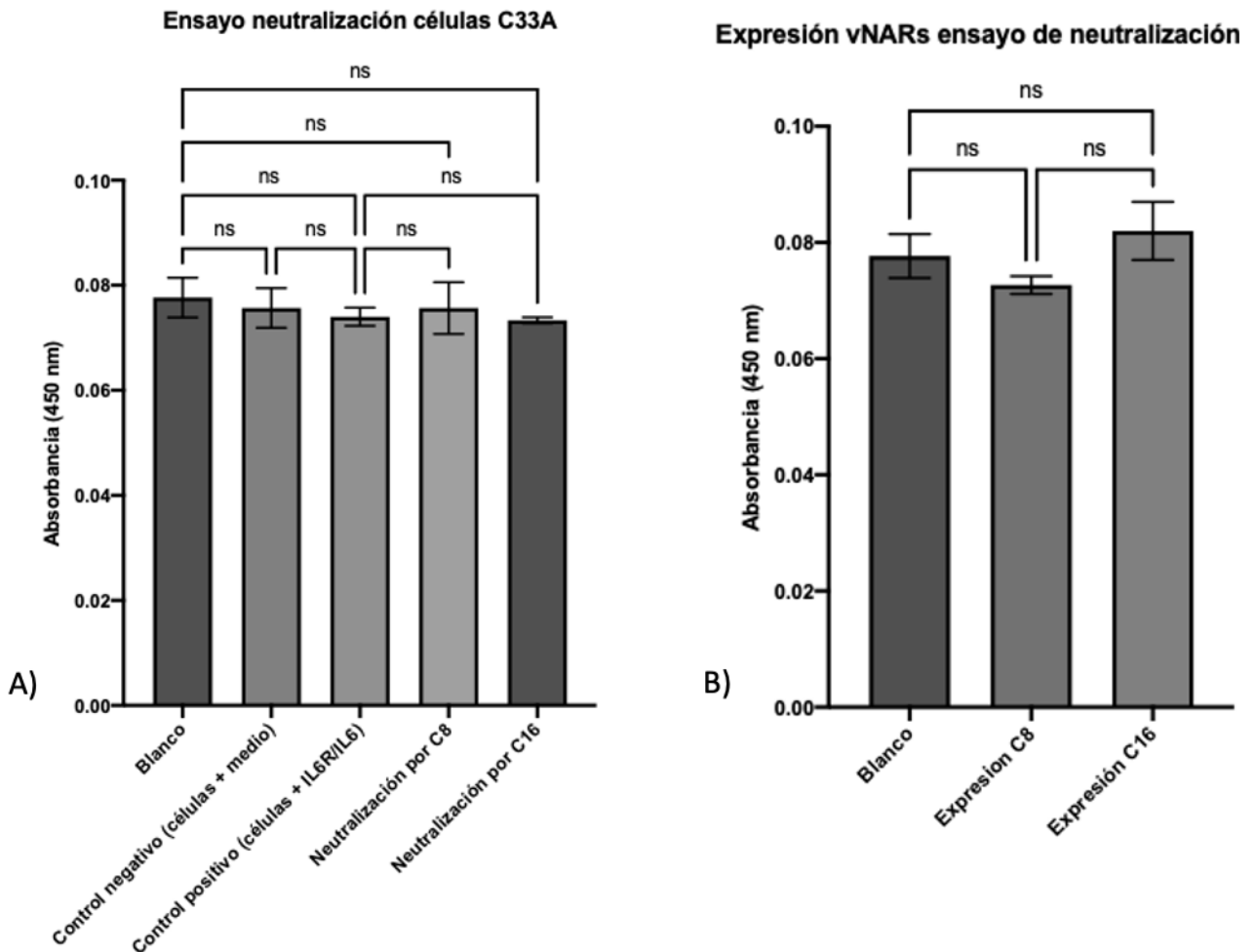


Figura 47. Ensayo de neutralización *in vitro* del complejo de la IL-6 con su receptor soluble con base en la producción de VEGF. A) Ensayo de neutralización *in vitro*. B) Niveles de expresión de los vNARs utilizados durante el ensayo de neutralización. Donde, blanco corresponde a leche al 5%; control negativo, corresponde al tratamiento donde se adicionó PBS; control positivo, corresponde al tratamiento donde se adicionó la quimera IL6R/IL6 y neutralización por C8 y C16, corresponden a los tratamientos experimentales donde se analizó la capacidad de neutralización de los vNARs IL6R-8 e IL6R-16 respectivamente.

Capítulo 4. Discusión

4.1.1 Preparación de células electrocompetentes *E. coli* ER2738 y células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3)

La eficiencia de las células electrocompetentes para la preparación de nuevas bibliotecas sintéticas debe encontrarse por encima de 1×10^9 , no obstante, pueden emplearse las células con una eficiencia por debajo de 1×10^9 para la preparación del fago ayudador o en la reamplificación de bibliotecas sintéticas (Barbas et al., 2001). Otros autores como Sambrook et al. (1989) sugieren que las células electrocompetentes deben encontrarse con una eficiencia en el rango de $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$. En este trabajo se obtuvieron células electrocompetentes de *E. coli* ER2738 con un título de 2.26×10^8 y sin contaminación por alguno de los fagos analizados, aunque presentaron un título inferior al recomendado por Barbas et al. (2001) para la preparación de nuevas bibliotecas, estas células no fueron utilizadas para este proceso. Sin embargo, si se encontraban dentro del rango sugerido por Sambrook et al. Por lo que, con base en los criterios sugeridos en la literatura previamente mencionada y debido a que las células fueron utilizadas para la reamplificación de bibliotecas previamente preparadas y en las rondas de bioselección, se consideró adecuado su título y fueron utilizadas.

En el caso de las células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) se obtuvieron células con una eficiencia de 2.75×10^6 , la eficiencia esperada para estas células es de $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ (New England BioLabs, 2023), la eficiencia obtenida fue baja, sin embargo, es posible mejorar la eficiencia de transformación al modificar la cantidad de plásmido utilizado al momento de transformar las células, ya que estas células pueden ser transformadas con una cantidad de plásmido en el rango de 1 pg a 100 ng de plásmido puro (New England BioLabs, 2023). En este trabajo se utilizó la cantidad de 10 ng para transformarlas con el plásmido de la clona 6 anti IL-1 β y en el caso de los plásmidos de las clonas anti IL6R/IL6 se aumentó la cantidad a 30 ng, ya que las células tenían una antigüedad de 6 meses lo que podría haber reducido su eficiencia, estas modificaciones resultaron en la transformación exitosa de once de las dieciocho clonas obtenidas en ese proceso de bioselección.

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) presentaron un resultado positivo a la contaminación por fago ayudador y por fago lítico. La contaminación por fago ayudador se rastreó hasta el "stock" de células del cuál se partió para preparar este lote de células. Estas células no presentan resistencia por sí mismas ante el

antibiótico kanamicina, por lo que el haber obtenido resultados positivos posiblemente se debió a que las placas con antibiótico utilizadas no contenían la concentración adecuada o por la antigüedad de las placas el antibiótico pudo degradarse, lo que permitió el crecimiento de las bacterias. En el caso de la prueba positiva a la contaminación por fago lítico, esto pudo deberse a un error humano al momento de realizar la técnica del TOP agar, la cual al no ser realizada correctamente puede arrojar falsos positivos por la formación de grumos o burbujas, que pueden ser confundidas con placas de fago lítico. La prueba de contaminación por el fagémido pComb3X fue negativa y esto es muy importante porque se buscaba transformar estas células con este vector que es en el que se encuentran clonados el o los vNARs de interés.

4.1.2 Selección de vNARs candidatos contra el antígeno de interés

4.1.2.1 Interleucina 1 β

Del proceso de bioselección contra la interleucina 1 β , se obtuvo un vNAR candidato W1 β 6 para reconocer y neutralizar a la molécula blanco. En trabajos realizados por otros miembros del grupo de investigación del laboratorio de inmunología molecular y biotoxinas, donde se utilizaron bibliotecas sintéticas se ha obtenido más de una clona como vNARs candidatos (Cabanillas-Bernal et al., 2019; Gasperín-Bulbarela; 2021; Valdovinos-Navarro; 2022). El haber obtenido una sola clona como candidato podría asociarse al tamaño pequeño del antígeno (17.5 kDa) y que este haya imposibilitado el conseguir más anticuerpos que pudiesen reconocerlo. Sin embargo, Vargas-Peralta (2010) obtuvo a partir de bibliotecas naïve dos vNARs candidatos contra la interleucina 18, la cual tiene un tamaño de 18 kDa, similar al de la IL-1 β . Por lo que ese resultado podría asociarse con errores durante la bioselección; como el haber desechado uno de los tubos con los fagos reamplificados de la biblioteca, lo cual habría disminuido la diversidad de fagos con potencial de reconocimiento contra el antígeno blanco. Lo anterior, se vio reflejado en la tendencia no esperada que siguieron los títulos de salida en las rondas de bioselección (Figura 5). Barbas et al. (2001) sugirieron que los títulos deben disminuir en la segunda y tercera ronda, porque se descartaron los fagos menos afines al antígeno y observar un ligero aumento en la ronda final por la amplificación de los fagos con mayor afinidad por el antígeno.

El vNAR W1 β 6 candidato pertenece al marco de lectura de la biblioteca VS0, esta se caracteriza por no presentar cisteínas dentro de su CDR3, pero mantiene las cisteínas canónicas del marco de lectura 1 y 3

(FR1 y FR3) (Cabanillas-Bernal et al, 2019). El CDR3 de este vNAR es rico en argininas, glicinas, serinas y valinas, con un tamaño teórico de 16.5 kDa con etiquetas. Sin embargo, se sospechó que era producido en cuerpos de inclusión al momento de ser expresado en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) por las bajas absorbancias en la detección por ELISA, se confirmaron estas sospechas al analizar el extracto periplásmico y detectar que el vNAR no era enviado al periplasma (Figura 20). Es importante que los vNARs sean enviados al espacio periplásmico, ya que este es un ambiente altamente oxidante que permite la formación de enlaces disulfuro por acción de las proteínas de enlaces disulfuro de oxidoreductasas (Denocin y Collet, 2013). El que el vNAR W1 β 6 no fuera enviado al periplasma, podría significar que no se estarían formando adecuadamente sus enlaces disulfuro y esto generaría la obtención de una proteína insoluble, es decir, no funcional y que fue enviada a cuerpos de inclusión.

La formación de cuerpos de inclusión puede asociarse a la expresión a gran escala de proteínas recombinantes, por el uso de vectores de alta expresión con promotores fuertes; uso de plásmidos con un alto nivel de copias; el uso de codones por parte de la bacteria y el tipo de cepa de *E. coli* utilizado (Bhatwa et al., 2021). Millán-Gómez (2018), obtuvo el vNAR V13 en cuerpos de inclusión al momento de realizar la expresión a gran escala en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Sin embargo, en el caso del vNAR W1 β 6, se obtuvo una proteína insoluble en cuerpos de inclusión, desde la expresión a pequeña escala, lo que indicaría que la proteína está siendo producida en un estado insoluble al momento de la traducción y no precisamente porque la cepa bacteriana de *E. coli* BL21 (DE3) se encontraba bajo estrés por los altos niveles de expresión (Bhatwa et al., 2021).

El obtener un vNAR insoluble desde la expresión a pequeña escala, podría estar asociado a las características de los aminoácidos del CDR3, ya que es la región dentro del marco estructural de la biblioteca VS0 que difiere del vNAR parental el vNAR T1 (anti TGF β). El vNAR W1 β 6 presentó cuatro argininas en su CDR3 (Figura 11), siendo el aminoácido predominante en esta región, la arginina es un aminoácido altamente hidrofílico por sus características fisicoquímicas (Hristova y Wimley, 2010). Además, es utilizada como un agente de replegado durante el proceso de renaturalización (Palmer y Wingfield, 2012; Gasperín-Bulbarela, 2021). No obstante, la presencia de aminoácidos de características hidrofóbicas o hidrofílicas no puede considerarse un determinante respecto a la solubilidad de la proteína (Dyson et al., 2004). Generalmente los vNARs presentan sus aminoácidos polares y cargados expuestos al solvente para mejorar su solubilidad (Cabanillas-Bernal et al., 2019) por lo que, es probable que el plegamiento dado por la interacción entre los aminoácidos que conforman el CDR3 y el resto de residuos del marco estructural de la proteína W1 β 6 influyeran en el mal plegamiento de la misma. El haber realizado el modelado por

homología de la estructura del vNAR W1 β 6 podría habernos permitido comprender el efecto de la interacción de sus residuos en su plegamiento.

Otro factor para considerar que propicia o disminuye la formación de cuerpos de inclusión, es la temperatura durante el proceso de expresión del vNAR. Varios autores recomiendan crecer la cepa de *E. coli* hasta alcanzar una densidad óptima deseada a una temperatura de 37 °C y realizar la inducción de la proteína recombinante en un rango de 15 a 20 °C (Schein, 1989; Wang et al., 2019). Millán-Gómez (2018) recomendó una estrategia similar para el vNAR V13. Realizar el modelado y probar la inducción del vNAR W1 β 6 a bajas temperaturas, hubiesen favorecido el haber obtenido un vNAR soluble durante la producción en *E. coli* BL21 (DE3), aún así realizar el proceso de renaturalización *in situ* representaba una estrategia más rápida y eficiente al momento para obtener el vNAR funcional y por lo tanto se optó por ella.

Se utilizó el método de renaturalización *in situ*: On column refolding, el cual fue el mismo utilizado con éxito para la renaturalización del vNAR V13 (Millán-Gómez, 2018). Desafortunadamente, en el caso del vNAR W1 β 6, la proteína eluyó durante el gradiente de renaturalización, lo que dio como resultado la obtención de una mezcla de proteínas renaturalizadas, parcialmente renaturalizadas y desnaturalizadas.

El que el vNAR eluyera durante el gradiente de renaturalización podría asociarse con la formación de agregados, estos podrían haberse formado por distintos factores durante el proceso de re-plegado de la proteína. Tsumoto et al. (2003), describieron dos factores importantes durante el proceso de renaturalización de proteínas que influyen en la formación de agregados: el primero es el efecto de la concentración intermedia del agente desnaturizante (urea 8 M) y el agente renaturalizante (L-arginina) sobre la proteína a renaturalizar, esta concentración debe ser la adecuada para inducir el correcto plegamiento de la estructura, mientras se mantiene la solubilidad y flexibilidad de la proteína; el segundo es la velocidad en la que se reduce el agente desnaturizante, para que las estructuras no colapsen bruscamente y se formen los agregados que son estructuras muy rígidas e incapaces de reorganizarse, afectando directamente la eficiencia de plegamiento. Además, el tiempo en el que se encuentren expuestas las proteínas a concentraciones intermedias del agente desnaturizante puede afectar la eficiencia de plegamiento, la flexibilidad y solubilidad de las proteínas, resultando en la formación de agregados o el plegamiento incorrecto (Mirhosseini et al., 2019).

Por otro lado, existen ventajas al realizar la renaturalización con el método de “On column refolding”, ya que utilizar una columna cromatográfica favorece el plegamiento, debido a que actúa como una

chaperona, ya que la unión de la proteína por medio de la cola de histidinas permite que tenga un plegamiento más controlado (Wang et al., 2005). Los contactos que ejerce la proteína con la columna al estar unidas podrían propiciar la formación de agregados, siendo que en algunos casos las proteínas pueden tener múltiples contactos con la columna afectando así su plegamiento (Tsumoto et al., 2003).

Entre otros factores que influyen en la formación de agregados, encontramos la presencia de contaminantes como polipéptidos, fosfolípidos y otros componentes bacterianos en los cuerpos de inclusión clarificados, que disminuyen la eficiencia del plegamiento y aumentan la formación de agregados (Maachupalli-Reddy et al., 1997). En el caso de la renaturalización del vNAR W1 β 6, se realizó un lavado con 25 mL del tampón A3 (imidazol al 20 mM) para eliminar contaminantes del lisado, mientras que en la renaturalización del vNAR V13 se utilizaron aproximadamente 50-60 mL del tampón, lo que pudo favorecer la eliminación de más contaminantes y redujo el riesgo de formación de agregados, por lo que podría haber sido conveniente realizar el lavado con un volumen mayor de solución en la renaturalización del vNAR W1 β 6, aunque en la fracción 4 donde eluyó el vNAR a mitad del gradiente, no se observó la presencia de impurezas que pudiesen haber contribuido en la formación de agregados y apoyen esta hipótesis (Figura 27).

Por otro lado, Wang et al. (2005), describen que en el caso del replegado de la lisozima por medio de diálisis, dos tercios de la proteína total a renaturalizar tendieron a formar agregados o estructuras mal plegadas, reduciendo la eficiencia de renaturalización. Esto debido a que durante el proceso de re-plegado de las proteínas pueden formarse estructuras intermediarias que pueden tender a convertirse en una proteína correctamente plegada, una proteína mal plegada o en agregados. Lo anterior podría asociarse con lo que sucedió en el caso de la renaturalización del vNAR W1 β 6, ya que posiblemente durante la aparición de las estructuras intermediarias (inestables y poco solubles) se favoreció la formación de agregados o proteínas mal plegadas y esto contribuyó a la elución temprana de la proteína.

Durante el proceso de renaturalización del vNAR W1 β 6, se mantuvieron las condiciones adecuadas, como mantener el pH de los tampones en 8, eliminar de forma lenta y gradual el agente desnaturizante (urea 8 M) con un flujo de 0.1 mL/min y se utilizó un método cromatográfico para favorecer el plegado correcto de la proteína a renaturalizar. Sin embargo, aun controlando dichos factores, las interacciones iónicas e hidrofóbicas entre los residuos de la proteína; el tiempo de exposición de la proteína a concentraciones intermedias del agente desnaturizante; las formación de estructuras intermedias; impurezas presentes en los cuerpos de inclusión clarificados y el número de interacciones entre la proteína y la columna Histrap

FF (Ge Healthcare), podrían haber contribuido al bajo éxito de renaturalización obtenido para la proteína W1 β 6.

A pesar de no haber obtenido un alto éxito de renaturalización, se observó al comparar el reconocimiento de la proteína W1 β 6 en la Figura 17 con el de la Figura 28, que se logró renaturalizar una fracción de la proteína total sometida a dicho proceso, por lo que sí se obtuvo un vNAR que reconociera a la IL-1 β , aunque no fuese posible renaturalizar toda la proteína sometida al proceso. No obstante, el haber realizado un ensayo comparativo del reconocimiento entre el estado desnaturalizado y renaturalizado de la proteína W1 β 6 en un mismo experimento, hubiese brindado más información acerca del éxito en la renaturalización, desafortunadamente a esa altura del proyecto ya no se contaba con el antígeno suficiente para realizar dicho ensayo.

Paralelamente a la renaturalización de la proteína W1 β 6, se realizó una segunda búsqueda en los fagos obtenidos del proceso de bioselección anti IL-1, de esta segunda búsqueda se encontraron cuatro clonas con una secuencia completa y sin codones de paro en el CDR3. Sin embargo, se encontró que no reconocieron al antígeno de interés (Figura 37).

Las clonas obtenidas de la segunda bioselección pertenecen a la ronda 4, mientras que la clona que expresa el vNAR W1 β 6 pertenece a la ronda 3 y se obtuvo repetida tres veces durante el proceso de bioselección, lo que podría considerarse un indicativo de su potencial para reconocer al antígeno de interés, como se comprobó mediante ELISA después de su renaturalización (Figura 28). Otro aspecto que pudo influir en haber obtenido clonas completas sin codón de paro, que no reconocieron el antígeno de interés, es que al fijar el antígeno en la placa para las rondas de bioselección se corre el riesgo de que se no fije en la misma conformación, lo que podría resultar en que no se cuente con la estructura nativa del antígeno al someter a los fagos que podrían reconocerlo (Lausten, 2016; Lausten et al., 2017). Por lo que, es posible que la clona funcional que reconoce el antígeno, que codifica para la proteína W1 β 6, fue seleccionada en la ronda 3, pero al fijar el antígeno para la ronda 4 este se fijó en una conformación distinta y posiblemente por eso dicha clona apareció en la última ronda, pero sí otras clonas que reconocen esta nueva conformación pero no por el antígeno en la conformación nativa, como podría haber sido el caso de las clonas 200, 202 y 209.

Finalmente, Lausten (2016) sugirió que una de las mayores desventajas durante el proceso de bioselección por medio del despliegue de fagos, es la influencia de la variación clonal porque introduce un sesgo en la amplificación, ya que factores como la traducción; el transporte; el plegamiento y la estabilidad de la fusión

de las proteínas presentadas en los fagos favorecen el ensamble rápido y estable de partículas que pueden no presentar una alta afinidad por el antígeno, pero sí una facilidad en su ensamblaje. Por lo que aquellos fagos con fragmentos de anticuerpo con una alta afinidad, pero que son complejos de ensamblar y presentar, son superados por aquellos fragmentos que se ensamblan rápidamente pero que no necesariamente son afines, perdiéndose así los fagos afines entre las rondas de bioselección. Esto podría haber sucedido durante el proceso de bioselección ya que posiblemente la clona 6 codifica para un fragmento que representaba una estructura más compleja de ensamblar y fue superada durante la ronda 4. Sin embargo, las clonas 200, 202 y 209 podrían haber codificado fragmentos más sencillos de ensamblar, pero no fueron clonas con afinidad por el antígeno.

Respecto a los ensayos de neutralización para determinar la capacidad de inhibición de la vía proinflamatoria generada por la IL-1 β , no fue posible realizarlos, al no contar con el antígeno suficiente para reanudar las pruebas de reconocimiento con la proteína W1 β 6 renaturalizada y para estimular los fibroblastos humanos. Además, no se tenía el anticuerpo anti STAT3 fosforilado y no fosforilado para poder determinar el grado de neutralización.

4.1.2.2 Receptor soluble de la interleucina 6

En el proceso de bioselección contra la quimera del receptor soluble de la IL-6 unido a la IL-6 (IL6R/IL6), se obtuvieron resultados más favorables tanto en el título de las rondas de bioselección como en el número de vNARs candidatos para reconocer a este blanco molecular. Respecto al título de las rondas de bioselección (Figura 6), se observó la tendencia esperada de una disminución en las rondas 2 y 3, seguido por un aumento en la ronda 4 donde se esperaba que amplificaran las clonas con mayor afinidad hacia el antígeno (Barbas et al., 2001). Se obtuvieron un total de 18 vNARs funcionales, sin embargo, no era posible trabajar paralelamente con tantos anticuerpos por lo que de acuerdo con los criterios de selección utilizados por Cabanillas-Bernal et al. (2019) se eligieron dos vNARs candidatos basado en la relación reconocimiento/expresión de ambos candidatos, siendo el los vNARs IL6R-8 e IL6R-16 los seleccionados.

Dichos candidatos pertenecen a la biblioteca VSO y tienen un tamaño teórico aproximado de 14.41 kDa con etiquetas. El vNAR IL6R-8 es rico en triptófano, prolina, arginina y lisinas; mientras que el vNAR IL6R-16 es rico en leucinas, glicinas y argininas. Ambos fueron muy sencillos de expresar y purificar a gran escala; siendo el vNAR IL6R-8 el que mostró una mayor expresión en los cultivos a gran escala. Sin embargo, hubiese sido favorecedor estandarizar las condiciones óptimas de inducción para cada proteína ya que los

rendimientos obtenidos después de la purificación fueron bajos. En el caso de la purificación, a pesar de que se utilizaron las condiciones estandarizadas para la clona 39, estas funcionaron muy bien en especial para IL6R-16, donde se obtuvieron fracciones de la proteína pura sin necesidad de realizar una repurificación, como fue el caso de la clona 8, aunque las condiciones de repurificación estandarizadas para la clona 39, también fueron exitosas.

Respecto a la capacidad de reconocimiento, a diferentes concentraciones del antígeno IL6R/IL6, de ambos vNARs, es de resaltar que en el caso de IL6R-16, la muestra estaba comprometida lo que se vio reflejado en el nulo reconocimiento. Se tuvieron dos errores al manejar el IL6R-16 purificado (lote del 10 de diciembre de 2022), primero el tiempo transcurrido entre la obtención de la proteína pura y la diálisis para eliminar el imidazol fue muy largo ya que el imidazol a altas concentraciones (0.5 M) puede tener un efecto negativo en las proteínas y reducir sustancialmente su actividad (Blowers, 2000); el segundo fue el haber almacenado las muestras en plástico a 4 °C, dado que las proteínas tienden a adherirse al plástico (Bratcher y Gaggar, 2013), lo anterior se buscó reducir al almacenar las proteínas a -80 °C en los viales de plástico. Los errores mencionados anteriormente influyeron en la pérdida de la capacidad de reconocimiento, sobretodo porque se probó un lote de la proteína IL6R-16 recién purificado (20 de diciembre de 2022) y mostró reconocimiento contra los 250 ng de antígeno (Anexos A1), aun así, la capacidad de reconocimiento fue menor en comparación del vNAR IL6R-8.

Ambos vNARs fueron seleccionados para realizar el ensayo de neutralización *in vitro*. El estándar de oro utilizado para determinar la inhibición de la vía *trans* de la IL-6, se basa en la inmunodetección de la proteína STAT3 fosforilada, al no contar con el anticuerpo para detectar STAT3 se realizó la búsqueda de un ensayo diferente y el lograr estandarizar este ensayo a utilizar representó un gran reto. Se replicó el ensayo realizado por Chou et al. (2022), para determinar con base en la producción de VEGF la capacidad de neutralización de los vNARs. Este ensayo se replicó con dos líneas celulares diferentes, primero con la línea celular HeLa (ATTC), para determinar preliminarmente si la quimera IL6R/IL6 estimulaba la producción de VEGF, los resultados en este ensayo mostraron que en las células HeLa la quimera no estimuló la producción de VEGF (Anexos A2). Se realizó el ensayo utilizando la misma línea celular empleada por los autores Chou et al. (2022), la línea epitelial C33A y esta vez se montó el ensayo completo añadiendo los tratamientos de neutralización con el vNAR IL6R-8 e IL6R-16. Desafortunadamente, no se obtuvo señal del vNAR V13 en el control positivo (células C33A + quimera IL6R/IL6), donde se esperaba que la quimera hubiese inducido la producción de VEGF, ya que no hubo diferencias significativas respecto al control negativo, por lo que no fue posible validar el ensayo (Figura 47).

El no haber obtenido señal en el control positivo, pudo deberse a que la quimera IL6R/IL6, no logró estimular las células C33A o que el vNAR V13 no tuvo la capacidad de detectar a VEGF. Chou et al. (2022) encontraron que la quimera IL6R/IL6 (R&D systems) indujo la producción de aproximadamente entre 0.0025- 0.0003 $\mu\text{g/mL}$ de VEGF, mientras que el vNAR V13 tiene una concentración inhibitoria media (IC_{50}) para neutralizar el VEGF de 18 $\mu\text{g/mL}$, en el trabajo realizado por Millán-Gómez (2018) no se determinó la concentración mínima de VEGF que reconoce el vNAR V13, ya que el objetivo de producir este vNAR era neutralizar la molécula y no el ser utilizado como un método de detección de VEGF. Por lo que la concentración producida de VEGF se encontraba muy por debajo de la capacidad de detección del vNAR V13.

Finalmente, en el ensayo de neutralización no se detectó señal de los vNARs utilizados, esto probablemente que fueron obtenidos en muy bajas concentraciones lo que podría haber llevado a su degradación durante su almacenamiento. Sin embargo, el no haber utilizado un anticuerpo comercial para la detección de VEGF, representó la mayor desventaja del ensayo ya que no fue posible detectarlo en el control positivo.

Capítulo 5. Conclusiones

Se logró obtener un anticuerpo (W1 β 6) que reconoció a la IL-1 β mediante ELISA, el cual se aisló desde el principio en una forma no funcional presente en cuerpos de inclusión. Sin embargo, fue posible renaturalizar una fracción de la proteína W1 β 6 por medio del método de “*On column refolding*” la cuál presentó reconocimiento frente a su molécula blanco. Por cuestiones técnicas no fue posible evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* de la vía proinflamatoria que ejerce la citocina IL-1 β en una línea celular de fibroblastos humanos.

Se obtuvieron otros cuatro anticuerpos funcionales con potencial de reconocimiento por la citocina IL-1 β , derivados de una segunda búsqueda de los fagos obtenidos del proceso de bioselección. Tres de ellos se produjeron exitosamente pero no presentaron reconocimiento por la citocina IL-1 β .

En el caso del receptor soluble de la IL-6, se obtuvieron dieciocho anticuerpos funcionales, de los cuales once se produjeron exitosamente y siete mostraron reconocimiento por el antígeno mediante ELISA. Sin embargo, solamente dos anticuerpos se seleccionaron con base en su nivel de expresión y reconocimiento, como candidatos para realizar los ensayos de neutralización *in vitro* en la línea celular epitelial C33A. De estos dos anticuerpos, el expresado por la clona 8 fue el que presentó un mejor reconocimiento frente al complejo de la IL-6 con su receptor a la menor concentración probada en este trabajo (7.81 ng).

Se realizó el ensayo de neutralización *in vitro*, con la línea celular epitelial C33A utilizando el anticuerpo V13 para detectar los niveles de VEGF producidos por la estimulación del complejo del receptor soluble con la IL6. Sin embargo, el VEGF producido por las células C33A, estuvo por debajo del límite de detección del anticuerpo V13 y no fue posible validar el ensayo.

El haber obtenido anticuerpos capaces de reconocer tanto a la IL-1 β y al complejo del receptor soluble de la IL6, representa una ventana de oportunidad para ampliar la gama de tratamientos disponibles para la neutralización de las vías inflamatorias inducidas por estas interleucinas, al utilizar plataformas biológicas distintas a las convencionales como son los vNARs. Especialmente en el caso de la IL-6, ya que los tratamientos actualmente disponibles bloquean ambas vías de señalización de esta citocina y solamente hay dos moléculas en estudio enfocadas en neutralizar el complejo receptor/citocina asociado con su vía *trans* inflamatoria, por lo que el haber obtenido varios anticuerpos que muestran reconocimiento por el complejo y que potencialmente puedan presentar una capacidad de neutralización permitiría inhibir la

vía proinflamatoria sin la aparición de los efectos adversos a largo plazo relacionados a la inhibición de las dos vías de señalización de la IL-6.

5.1 Perspectivas

Para el caso del vNAR W1 β 6 se requiere repetir y estandarizar el proceso de renaturalización, sobre todo el aumentar el volumen de tampón de lavado previo a iniciar el gradiente de renaturalización. Así mismo realizar el modelado *in silico* de dicho anticuerpo para poder conocer si las interacciones entre los residuos de su CDR3 y el resto del marco estructural favorecen un mal plegamiento de la proteína. En caso de llegar a contar con más citocina IL-1 β disponible, determinar el grado de renaturalización al comparar su capacidad de reconocimiento entre el estado desnaturalizado y renaturalizado. También realizar el ensayo de neutralización *in vitro* en fibroblastos humanos (Anexo 3)

Se requiere repetir el ensayo de neutralización del receptor soluble de la IL-6 en células C33A, para detectar la producción de VEGF con ayuda de un anticuerpo comercial que lo detecte mediante ELISA, para poder validar el ensayo y determinar la capacidad inhibitoria de la vía proinflamatoria de la IL-6 por los dos vNARs candidatos IL6R-8 e IL6R-16. Es recomendable estandarizar las condiciones óptimas de producción y purificación de los cinco anticuerpos restantes para ser probados en los ensayos de neutralización *in vitro*. Dándole prioridad al anticuerpo expresado por la clona 25, con el mejor reconocimiento, pero bajos rendimientos en su producción, ya que, presentó potencial para la neutralización de la IL-6.

Literatura citada

- Afonina, I. S., Müller, C., Martin, S. J. y Beyaert, R. (2015). Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. *Immunity*, 42(6), 991-1004. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.003
- Barbas, C., Burton, D., Scott, J., Silverman, G. (2001). *Phage Display: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Bent, R., Moll, L., Grabbe, S. y Bros, M. (2018). Interleukin-1 beta—a friend or foe in malignancies?. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2155. doi: 10.3390/ijms19082155
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z. y Zhou, T. (2021). Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 630551. doi: 10.3389/fbioe.2021.630551
- Biosciences, A. (1999). Rapid and efficient purification and refolding of a (His) 6-tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies. *Application Note HiTrap Chelating*, 1-4.
- Blowers, D. P. (2000). Affinity separation: immobilized metal ion chromatography. *Encyclopedia of separation science*, Academic Press. 2, 277-283. doi: 10.1016/B0-12-226770-2/00521-4.
- Bratcher, P. E. y Gaggar, A. (2013). Characterization and prevention of the adsorption of surfactant protein D to polypropylene. *PLoS One*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0073467
- Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T. y Licea-Navarro, A. F. (2019). Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLoS one*, 14(6), e0213394. doi: 10.1371/journal.pone.0213394
- Cantin, A. M. (2019). Cystic fibrosis lung disease and immunometabolism. Targeting the NLRP3 inflammasome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200 (11), 1335-1337. doi: 10.1164/rccm.201908-1558ED
- Chai, D., Wang, G., Fang, L., Li, H., Liu, S., Zhu, H. y Zheng, J. (2020). The optimization system for preparation of TG1 competent cells and electrotransformation. *MicrobiologyOpen*, 9(7), e1043. doi: 10.1002/mbo3.1043
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. y Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 220–233. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
- Chatenoud, L., Ferran, C., Reuter, A., Legendre, C., Gevaert, Y., Kreis, H. y Bach, J. F. (1989). Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]. *The New England Journal of Medicine*, 320(21), 1420-1421. doi: 10.1056/nejm198905253202117

- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qu, J., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J. Yu, T. Zhang, X. y Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The lancet*, 395(10223), 507-513. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
- Cheong, W.S., Leow, C.Y., Majeed, A.B.A. y Leow, C.H. (2020). Diagnostic and therapeutic potential of shark variable new antigen receptor (VNAR) single domain antibody. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 369-375. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.039
- Chou, C. C., Hua, K. T., Chen, M. W., Wu, C. J., Hsu, C. H., Wang, J. T. y Wei, L. H. (2022). Discovery and characterization of a monoclonal antibody targeting a conformational epitope of IL-6/IL-6R α to inhibit IL-6/IL-6R α /gp130 hexameric signaling complex formation. *MAbs*. 14 (1). doi: 10.1080/19420862.2022.2029675
- Clackson, T., Hoogenboomt, H. R., Griffithst, A. D. y Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Letters to Nature*, 352, 160–162. doi: 10.1038/352624a0
- Conti, P., Ronconi, G., Caraffa, A. L., Gallenga, C. E., Ross, R., Frydas, I. y Kritas, S. K. (2020). Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 34(2), 1.
- Corey-Bloom, J., Fischer, R. S., Kim, A., Snell, C., Parkin, G. M., Granger, D. A. y Thomas, E. A. (2020). Levels of interleukin-6 in saliva, but not plasma, correlate with clinical metrics in Huntington's disease patients and healthy control subjects. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6363. doi: 10.3390/ijms21176363
- De Luca, G., Cavalli, G., Campochiaro, C., Tresoldi, M. y Dagna, L. (2018). Myocarditis: an interleukin-1-mediated disease?. *Frontiers in immunology*, 9, 1335. Doi: 10.3389/fimmu.2018.01335
- Denoncin, K. y Collet, J. F. (2013). Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(1), 63-71. doi: 10.1089/ars.2012.4864
- Dooley, H., Flajnik, M. F. y Porter, A. J. (2003). Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular Immunology*, 40(1), 25-33. doi: 10.1016/S0161-5890(03)00084-1
- Dursun, E., Gezen-Ak, D., Hanağası, H., Bilgiç, B., Lohmann, E., Ertan, S., Atasoy, I. L., Alaylioğlu, M., Araz, Ö.S., Önal, B., Gündüz, A., Apayadin, H., Kiziltan, G., Ulutin, T., Gürvit, H. y Yilmazer, S. (2015). The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*, 283, 50-57. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.04.014
- Dyson, H. J., Wright, P. E., y Scheraga, H. A. (2006). The role of hydrophobic interactions in initiation and propagation of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13057-13061. doi: 10.1073/pnas.0605504103
- Ebadi, N., Ghafouri-Fard, S., Taheri, M., Arsang-Jang, S. y Omrani, M. D. (2020). Expression analysis of inflammatory response-associated genes in coronary artery disease. *Archives of physiology and biochemistry*, 1 (7), 601-607. doi: 10.1080/13813455.2019.1708953

- Economides, A. N., Carpenter, L. R., Rudge, J. S., Wong, V., Koehler-Stec, E. M., Hartnett, C., Pyles, E., Xu, X., Daly, T., Young, M., Fandl, J., Lee, F., Carver, S., McNay, J., Bailey, K., Ramakanth, S., Hutabarat, R., Huang, T., Radzziejewski, C., Yancopoulos, G., Stahl, N. (2003). Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nature medicine*, 9(1), 47-52. doi: 10.1038/nm811
- FDA (Food and Drug Administration). (2021). FDA-Approved Drugs. Consultado el 10 de mayo de 2021 de, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>
- Fujiwara, S., Mochinaga, H., Nakata, H., Ohshima, K., Matsumoto, M., Uchiba, M. y Nosaka, K. (2016). Successful treatment of TAFRO syndrome, a variant type of multicentric Castleman disease with thrombotic microangiopathy, with anti-IL-6 receptor antibody and steroids. *International journal of hematology*, 103(6), 718-723. doi: 10.1007/s12185-016-1978-2
- Gabay, C., Lamacchia, C. y Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(4), 232-241. Doi: 10.1038/nrrheum.2010.4
- Gasperín-Bulbarela, J. (2021). Caracterización de la actividad antifibrótica de dominios vNARneutralizantes de TGF- β en modelos dérmicos. [Tesis de Doctorado en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. 78 pp.
- Gopinathan, G., Milagre, C., Pearce, O. M., Reynolds, L. E., Hodivala-Dilke, K., Leinster, D. A., Zhong, H., Hollingsworth, R. E., Thompson, R., Whiteford, J. R. y Balkwill, F. (2015). Interleukin-6 stimulates defective angiogenesis. *Cancer research*, 75(15), 3098-3107. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1227
- Greenberg, A., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. y Flajnik, M. (1995). A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversifications in sharks. *Nature*, 374, 168-173. doi: 10.1038/374168a0
- Hadinia, A., Doustimotlagh, A. H., Goodarzi, H. R., Arya, A. y Jafarina, M. (2019). Circulating levels of pro-inflammatory cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Iranian Journal of Immunology*, 16(4), 327-333. doi: 10.22034/iji.2019.80284
- Hammad, D. R., Elgazzar, A. G., Essawy, T. S. y Abd El Sameie, S. A. (2015). Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients. *Egyptian Journal of chest diseases and tuberculosis*, 64(2), 347-352. doi: 10.1016/j.ejcdt.2015.01.005
- Hristova, K. y Wimley, W. C. (2011). A look at arginine in membranes. *The Journal of membrane biology*, 239, 49-56. doi: 10.1007/s00232-010-9323-9
- Hunter, C. A. y Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*, 16(5), 448-457. doi: 10.1038/ni.3153
- Johnson, D. E., O'Keefe, R. A. y Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(4), 234-248. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.8
- Jones, G. y Ding, C. (2010). Tocilizumab: a review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 3, 81-89. doi: 10.4137/CMAMD.S4864

- Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. y Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 160-167. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x
- Laustsen, A. H., Lauridsen, L. P., Lomonte, B., Andersen, M. R. y Lohse, B. (2017). Pitfalls to avoid when using phage display for snake toxins. *Toxicon*, 126, 79-89. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.12.010
- Laustsen, A.H. (2016). *Recombinant Antivenoms*. University of Copenhagen: Copenhagen, Denmark.
- Libby, P. (2017). Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(18), 2278-2289. doi: 10.1016/j.jacc.2017.09.028
- Lim, M. A. y Pranata, R. (2020). Worrying situation regarding the use of dexamethasone for COVID-19. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 14, 1-3. doi: 10.1177/1753466620942131
- Liu, B., Li, M., Zhou, Z., Guan, X. y Xiang, Y. (2020). Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)?. *Journal of autoimmunity*, 111. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102452
- Maachupalli-Reddy J., Kelley B.D. y De Bernardez Clark E. (1997). Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme. *Biotechnology Progress*, 13(2), 144-150. doi:10.1021/bp970008l.
- Millán-Gómez, D.V. (2018). Efecto de un vNAR anti-VEGF₁₆₅ en el tratamiento de cáncer. [Tesis de Doctorado en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. 106 pp.
- Mirhosseini, S. A., Latifi, A. M., Hosseini, H. M., Seidmoradi, R., Aghamollaei, H. y Farnoosh, G. (2019). The efficient solubilization and refolding of recombinant organophosphorus hydrolyses inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(1), 20-25. doi: 10.29252/JABR.06.01.04
- Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., Yoshizaki, K. y Nishimoto, N. (2003). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 48(6), 1521-1529. doi: 10.1002/art.11143
- New England Biolabs. (2023). BL21(DE3) competent *E. coli*. Consultado el 19 de enero de 2023 de, <https://international.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli#Product%20Information>
- Nuttall, S. D., Humberstone, K. S., Krishnan, U. V., Carmichael, J. A., Doughty, L., Hattarki, M., Coley, A. M., Casey, J. L., Anders, R. F., Foley, M., Irving, R. A. y Hudson, P. J. (2004). Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(1), 187-197. doi: 10.1002/prot.20005
- Palmer, I. y Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current protocols in protein science*, 70(1), 6-3. doi: 10.1002/0471140864.ps0603s70

- Panoskaltis, N. (2021). Are all cytokine storms the same?. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(4), 887-892. doi: 10.1007/s00262-020-02822-2
- QIAexpressionist. (2003). *A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins*. Qiagen. 5.^a ed. Chatsworth
- Qi, J., Zhao, X. F., Yu, X. J., Yi, Q. Y., Shi, X. L., Tan, H., Fan, X. F., Gao, H. L., Yue, L. Y., Feng, Z. P. y Kang, Y. M. (2016). Targeting interleukin-1 beta to suppress sympathoexcitation in hypothalamic paraventricular nucleus in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Cardiovascular toxicology*, 16(3), 298-306. doi: 10.1007/s12012-015-9338-7
- Rose-John, Stefan. (2017). The soluble interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102 (4), 591-598. Doi: 10.1002/cpt.782
- Rose-John, S., Winthrop, K. y Calabrese, L. (2017). The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(7), 399-409. doi: 10.1038/nrrheum.2017.83
- Rose-John, S. (2020). Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Research*, 9. doi: 10.12688/f1000research.26058.1
- Rothaug, M., Becker-Pauly, C. y Rose-John, S. (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(6), 1218-1227. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.018
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ^a Ed. Cold Spring Harbor, United States.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379. doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2
- Schein, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Nature Biotechnology*, 7(11), 1141-1149. doi: 10.1038/nbt1189-1141
- Scheller, J., Garbers, C. y Rose-John, S. (2014). Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Seminars in immunology*, 26 (1), 2-12. doi:10.1016/j.smim.2013.11.002
- Schreiber, S., Aden, K., Bernardes, J. P., Conrad, C., Tran, F., Höper, H., Volk, V., Mishra, N., Blase, J. I., Nikolaus, S., Bethge, J., Kühbacher, T., Röcken, C., Chen, M., Cottingham, I., Petri, N., Rasmussen B. B, Lokau, J., Lenk, L., Garbers, C., Feuerhake, F., Rose-John, S., Waetzig, G., H. y Rosentiel, P. (2021). Therapeutic interleukin-6 trans-signaling inhibition by olamkicept (sgp130Fc) in patients with active inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 160(7), 2354-2366. doi: 10.1053/j.gastro.2021.02.062
- Shimizu M. (2019). *Clinical features of cytokine storm syndrome*. En Cron R, Behrens E. (Eds.). *Cytokine Storm Syndrome*. doi: 10.1007/978-3-030-22094-5_3

- Sommerfeld, S. y Strube, J. (2005). Challenges in biotechnology production—generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44(10), 1123-1137. doi:10.1016(j.cep.2005.03.006
- Sprotocols. (2014). Preparation of Competent Cells. Consultado el día 20 de diciembre de 2021, de doi: 10.5281/zenodo.13548
- Stanfield, R. L., Dooley, H., Flajnik, M. F. y Wilson, I. A. (2004). Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. *Science*, 305(5691), 1770-1773. doi:10.1126/science.11.1148
- Su, H., Lei, C. T. y Zhang, C. (2017). Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update. *Frontiers in immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00405
- Sushak, L., Gabure, S., Maise, J., Arnett, J., Whalen, M. M. (2020). Dibutyltin alters immune cell production of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL) 1 β and IL-6: role of mitogen-activated protein kinases and changes in mRNA. *Journal of Applied Toxicology*, 40(8), 1047-1059. doi: 10.1002/jat.3964
- Tanaka, T., Narazaki, M. y Kishimoto, T. (2016). Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*, 8(8), 959-970. doi: 10.2217/imt-2016-0020
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. y Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein expression and purification*, 28(1), 1-8. doi:10.1016/S1046-5928(02)00641-1
- Valdovinos-Navarro, B. J. (2022). Obtención de un anticuerpo vNAR con capacidad neutralizante de la proteína spike SARS-CoV-2. [Tesis de Maestría en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. 63 pp.
- Vargas-Peralta, C. E. (2010). Obtención de fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con afinidad por IL-18 humana. [Tesis de Maestría en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 89 pp.
- Yadav, D. K., Tripathi, A. K., Gupta, D., Shukla, S., Singh, A. K., Kumar, A., Agarwal, J. y Prasad, K. N. (2017). Interleukin-1B (IL-1B-31 and IL-1B-511) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphisms in primary immune thrombocytopenia. *Blood research*, 52(4), 264-269. doi: 10.5045/br.2017.52.4.264
- Wang, F., Liu, Y., Chen, J., y Su, Z. (2005). Chromatographic refolding of proteins: molecular action and column control. *China Particuology*, 3(6), 337-342. Doi:10.1016/S1672-2515(07)60212-7
- Wang, W., Archbold, T., Lam, J. S., Kimber, M. S. (2019). A processive endoglucanase with multi-substrate specificity is characterized from porcine gut microbiota. *Scientific Reports*, 9(13630). doi: 10.1038/s41598-019-50050-1
- WHO (World Health Organization). (2021). WHO recommends life-saving interleukin-6 receptor blockers for COVID-19 and urges producers to join efforts to rapidly increase access. Consultado el 6 de Julio de 2021 de, <https://www.who.int/news/item/06-07-2021-who-recommends-life-saving-interleukin-6-receptor-blockers-for-covid-19-and-urges-producers-to-join-efforts-to-rapidly-increase-access>

- Zhang, H. (2011). Western blot for detecting phosphorylated STAT3. Consultado el 10 de mayo de 2021 de, <https://bio-protocol.org/pdf/Bio-protocol125.pdf>.
- Zhang, C., Wu, Z., Li, J. W., Zhao, H. y Wang, G. Q. (2020). Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105954. Doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105954
- 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. y 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. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.04.023
- Zielonka, S., Empting, M., Grzeschik, J., Könning, D., Barelle, C. J., Kolmar, H. (2015). Structural insights and biomedical potential of IgNAR scaffolds from sharks. *MAbs*. 7(1), 15-25. doi: 10.4161/19420862.2015.989032

Anexos

A.1 Comparativo de reconocimiento entre la clona 16 y la clona 8

El ELISA de reconocimiento del complejo del receptor soluble con la citocina IL6 a 250 ng, mostró que el anticuerpo expresado por la clona 16 y purificado el 10 de diciembre del 2022, perdió su capacidad de reconocimiento, ya que el lote de ésta clona purificado el 20 de diciembre del 2022 mostró reconocimiento por el antígeno, aunque fue menor que el del anticuerpo expresado por la clona 8.

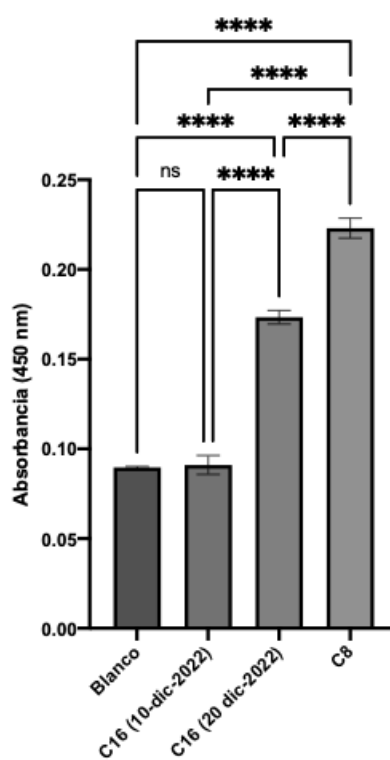


Figura 48. ELISA de reconocimiento IL6R/IL6 250 ng. Donde, blanco corresponde a leche al 5%; C16 (10-dic-2022), corresponde al lote de la clona 16 purificado el 10 de diciembre; C16 (20-dic-2022), corresponde al lote de la clona 16 purificado el 20 de diciembre; C8 corresponde al anticuerpo expresado por la clona 8. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**) = $P < 0.01$; (***) = $P < 0.001$; (****) = $P < 0.0001$.

A.2 Ensayo de detección de VEGF por el vNAR V13 en células HeLa

No se encontraron diferencias significativas entre las células no estimuladas y las células estimuladas por el complejo, respecto a la detección en la producción de VEGF por parte del vNAR V13.

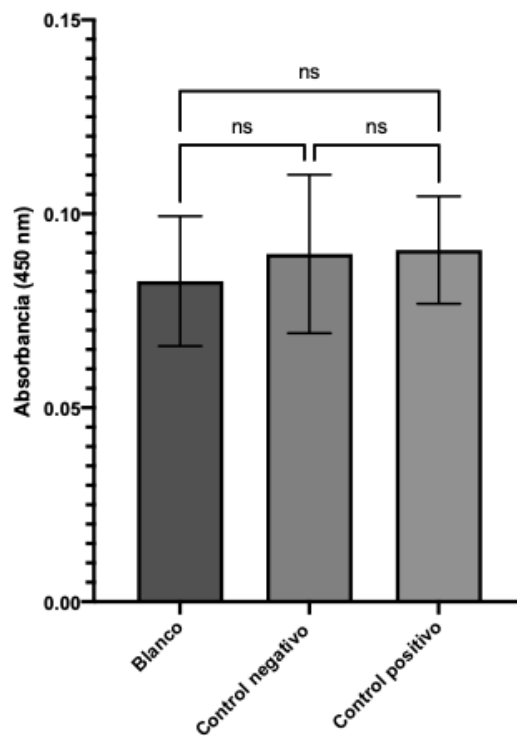


Figura 49. Ensayo de detección de VEGF por el vNAR V13 en células HeLa. Donde, blanco corresponde a leche al 5%; control negativo corresponde a las células HeLa que no fueron estimuladas por el complejo IL6R/IL6; control positivo, corresponde a las células HeLa estimuladas por 100 ng/mL del complejo IL6R/IL6. ANOVA de una vía (*)= $P < 0.05$; (**)= $P < 0.01$; (***)= $P < 0.001$; (****)= $P < 0.0001$.

A.3 Ensayo de neutralización de la IL-1 β en fibroblastos humanos

De acuerdo con los ensayos de neutralización descritos por Economides et al. (2002), IL-1 β induce la secreción de IL-6 y está provoca la fosforilación de la proteína STAT3 como parte de su cascada de señalización asociada a la vía *trans*. Se utilizarán células de fibroblastos humanos de prepucio de neonato CCD-1112Sk (ATCC). Para el ensayo se incubarán las células CCD-1112Sk por 18 h a 37 °C con 5% de CO₂ en placas de 96 pozos. Se establecerán 3 tratamientos: control positivo células adicionadas con IL-1 β (4mM); tratamiento experimental células con IL-1 β (4mM) y el vNAR recombinante; como control negativo se utilizarán los fibroblastos humanos sin estimular. Para determinar el grado de neutralización del vNAR recombinante se detectará la fosforilación de la proteína STAT3 por inmunodetección de acuerdo con el protocolo descrito por Zhang (2011).