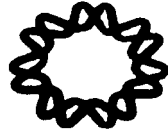




UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

00551

9



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE REPERTORIOS DE  
ANTICUERPOS HUMANOS POR "PHAGE DISPLAY"**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**LUISA ELENA FERNÁNDEZ ALTUNA**

ASESOR: Dr. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN

2003

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas  
UNAM a difundir en formato electrónico el  
contenido de mi trabajo.

NOMBRE: Luisa Elena  
Fernández Altuna

FECHA: 04/abril/2003

FIRMA: [Signature]

**FALTA DE ORIGEN  
TESIS CON**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis del Instituto de Biotecnología (UNAM) con base en una idea original del Dr. Juan Carlos Almagro Domínguez y bajo la dirección y tutoría del Dr. Baltazar Becerril Luján.

El trabajo experimental fue financiado por el apoyo económico del CONACYT (proyectos: Z-002 y 33352-N) y de DGAPA (proyecto: IN-223399).

*A mi Ángel,  
por ir conmigo de la mano cada día,  
por tu paciencia y amor.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

c

## Agradecimientos

Para empezar con mi lista de agradecimientos quiero dar las gracias al Dr. Juan Carlos Almagro Domínguez, no solo por poner en mis manos su proyecto y convencerme de su viabilidad; sino además por confiar en mi capacidad para sacarlo adelante. También quiero agradecer en esta primera línea al Dr. Baltazar Becerril Luján por darme un espacio en su grupo de trabajo cuando más lo necesité. A ambos debo agradecerles también los consejos y las críticas porque pienso que han sido la sazón principal de todo este periodo de formación.

Siguen mis tutores auxiliares, el Dr. Joel Osuna y la Dra. Goar Gervorkian, por todos estos semestres de discusión que han ayudado, no solo a remendar los errores del principio; sino además a darle sentido a mi trabajo.

De manera general a mis tutores les agradezco el tiempo que han invertido en mi formación.

A los Drs. Lorenzo Segovia, Alejandro Alagón, Karen y Mario Soberón; por la revisión de la tesis y por aceptar gustosamente fungir como tribunal evaluador de mi examen.

A mi familia le agradezco especialmente. A mi esposo Angel Ernesto Dago Rodríguez por estar siempre a mi lado. Por apoyarme en mis decisiones y prestarme su hombro cuando el camino se puso mas pedregoso. Por su paciencia y su amor. A mi papá y mi mamá por la vida que me dieron, lo cual es el principio de cualquier sueño que haya desarrollado en mi vida. A mi padre en especial por su ejemplo y por darme inspiración para emprender el camino.

A mis compañeros de laboratorio: Alejandra, Manuel, Alfredo, Enmanuel, el yuca, Gabriela, Humberto Flores, Esmeralda, Yagul, Cristian, Ricardo, Fili, Martha, Gloria, Lety y Mary; por compartir su espacio de trabajo conmigo. En especial a Flores por toda su ayuda cuando mis enredos computacionales.

A Carlos González por su soporte técnico durante mis ELISAs fallidos y tantas otras cosas.

Al Dr. Alberto Darsón y todos los que en su laboratorio me apoyaron con el trabajo con los espermatozoides, en especial a José Luis.

A Nelly, por ayudarme con las compras y conseguir los apoyos que nos hacen la vida más fácil.

A la Sra. Juanita, por tantos y tantos medios.

A Pancho por su apoyo con el material.

Al Dr. Enrique Morett, por hacerme un espacio en su abarrotado laboratorio y permitirme conservarlo aún en contra de la corriente.

A CONACYT por el apoyo económico ofrecido a nuestro proyecto de investigación (Proyectos: Z-002 y 33352-N).

A DGAPA por el apoyo económico ofrecido a nuestro proyecto de investigación (Proyecto: IN-223399).

A DGEP, por la beca que me permitió tener el techo y los alimentos.

A mis amigos Viviana, Don Beto, Soni y El Vampiro por esos días de entretenimiento que ayudan a que uno agarre fuerzas para seguir con el trabajo.

Al flaco, Ernesto, Mine, Luiso y Zaida por ser de esos cubantitos de corazón.

A Consuelo, Lidia, Rivelino y Timo compañeros con los que compartí gran parte de mi trabajo de tesis.

A los que laboran en la unidad de secuencia y de síntesis apoyando todos y cada uno de los proyectos de investigación.

A Shirley, por tantos y tantos artículos salidos de los sitios más recónditos.

A los que laboran en la unidad de docencia y se ocupan de nuestros trámites.

A este país y en especial a la UNAM por darme esta oportunidad.

A todos los que me han ayudado durante todo este tiempo y ahora se me puedan olvidar, a todos muchas gracias.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

①

## ÍNDICE

<b>Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
Anticuerpos: estructura y características generales.....	4
Estructura de las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas.....	7
Relación entre la estructura y la función de las inmunoglobulinas.....	8
Relación entre la secuencia aminoacídica del L1 y la geometría del sitio de unión al antígeno.....	9
Uso de genes en las inmunoglobulinas.....	11
Despliegue en fagos.....	11
Ciclo de vida del fago M13.....	12
Fragmentos de anticuerpos.....	14
Expresión de anticuerpos por despliegue en fagos.....	14
<b>Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>16</b>
Cepas de <i>E. coli</i> .....	16
Plásmidos.....	16
Fago Helper.....	17
Medios de Cultivo.....	17
Selección de los antígenos.....	17
<i>Toxinas de alacrán</i> .....	18
<i>Toxinas de viuda negra</i> .....	19
Características generales de la reacción acrosomal.....	20
Ologonucleótidos.....	21
<b>Metodología.....</b>	<b>22</b>
Obtención de los ARNs.....	22
Transcripción Reversa.....	22
Amplificación por PCR.....	22
<i>Obtención de los genes variables</i> .....	22
<i>Obtención de los scFvs</i> .....	23
<i>Introducción de sitios para enzimas de restricción</i> .....	23
Digestión de los scFvs.....	24
Clonación de los scFvs en pSyn2.....	24
Transformación de las bibliotecas.....	25
Obtención del Fago Helper (M13/KO7).....	25
Rescate de las bibliotecas como fago-anticuerpos.....	25

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

W

Caracterización de las bibliotecas por "fingerprinting" y secuenciación.....	25
Selección.....	26
Estudio por ELISA de los anticuerpos seleccionados en cada ronda.....	27
<i>ELISAs policlonales.....</i>	<i>27</i>
<i>ELISAs monoclonales.....</i>	<i>28</i>
<i>ELISAs de reactividad cruzada.....</i>	<i>28</i>
Estudio del efecto de los fago-anticuerpos sobre la reacción acrosomal.....	29
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
Obtención de los ARNs.....	31
Amplificación de los segmentos variables.....	31
Ensamble de los scFvs.....	32
Digestión, Clonación y Transformación.....	33
Determinación de la variabilidad por "fingerprinting" y secuenciación.....	34
Selección.....	36
ELISAs policlonales.....	39
ELISAs monoclonales.....	40
<i>Resultados de los anticuerpos anti-Cn2.....</i>	<i>40</i>
<i>Resultados de los anticuerpos anti-CII1.....</i>	<i>41</i>
<i>Resultados de los anticuerpos anti-<math>\alpha</math>-NH<sub>2</sub>-latrotoxina.....</i>	<i>42</i>
Análisis por "fingerprinting" de las clonas positivas.....	43
Análisis de secuencia de las clonas positivas.....	44
<i>Anticuerpos contra Cn2.....</i>	<i>44</i>
<i>Anticuerpos contra CII1.....</i>	<i>46</i>
<i>Anticuerpos contra <math>\alpha</math>-NH<sub>2</sub>-latrotoxina.....</i>	<i>49</i>
ELISAs de reactividad cruzada.....	53
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

T

**RESUMEN**

El análisis de la estructura tridimensional de anticuerpos ha revelado que cinco de los seis lazos que conforman el sitio de unión para el antígeno poseen una estructura de cadena principal que se restringe a ciertos motivos estructurales (estructuras canónicas). Estos dependen de la conservación de ciertos patrones en la secuencia de aminoácidos. Además se conoce que en algunos casos la geometría de los sitios de unión correlaciona con el tipo de antígeno reconocido y que dicha geometría depende fundamentalmente, del primer lazo hipervariable de la cadena ligera de los anticuerpos. Con base en lo anterior y apoyándonos en una técnica que permite obtener anticuerpos desplegados en la superficie de un fago filamentoso ("Phage Display") nos hemos propuesto el diseño de dos bibliotecas de anticuerpos de origen humano para seleccionarlas contra antígenos de interés biomédico de tamaño variado (proteínas y péptidos). Cada una de las bibliotecas está formada por anticuerpos que poseen diferentes características geométricas en su sitios de reconocimiento. Estas diferencias se encuentran fundamentalmente en el largo del primer lazo hipervariable de la cadena ligera. En la construcción se empleó una única cadena ligera la cual pertenece a el gen más utilizado en los anticuerpos humanos maduros (A27) y una mezcla de cadenas pesadas. Como esta cadena ligera posee un L1 corto para la construcción de la segunda biblioteca se cambio este lazo por uno largo. Durante el desarrollo de este trabajo se han obtenido anticuerpos contra tres antígenos de importancia biomédica. Además se han aportado datos que apoyan la teoría del reconocimiento molecular mediado por anticuerpos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## ANTECEDENTES

Desde hace más de 50 años se describió la potencialidad de los anticuerpos como herramientas para la caracterización molecular, el diagnóstico clínico y las aplicaciones terapéuticas. En un inicio, estos se producían por inmunización de animales experimentales con el antígeno de interés. Este método producía una mezcla heterogénea de anticuerpos (anticuerpos policlonales), lo cual hacía casi imposible su caracterización (revisión en Edelman and Gall, 1969). Además el éxito de un esquema de inmunización dependía de la cantidad y calidad del antígeno y del sistema inmunológico del animal experimental y muy poco se podía hacer si no se obtenían los anticuerpos deseados.

En 1975 Kohler y Milstein publicaron un artículo que marcó una nueva etapa en la obtención de anticuerpos (Kohler and Milstein, 1975). En el mismo se describía como hacer anticuerpos monoclonales. A partir de entonces se comenzaron a obtener anticuerpos contra un sinnúmero de antígenos muchos de los cuales han sido de gran valor para el diagnóstico clínico. Al contar con preparaciones homogéneas (monoclonales) de anticuerpos, se avanzó rápidamente en la caracterización de esta familia de proteínas (Winter & Milstein, 1991). Sin embargo, este valioso descubrimiento no permitía prescindir del proceso de inmunización y esto obligaba a los investigadores a seguir sujetos a las reglas que dicta el sistema inmunológico del animal experimental.

En la última década del siglo pasado una nueva técnica revolucionó la forma de obtener anticuerpos. Esta técnica conocida con el nombre de *phage display* (Smith GP, 1985), ha permitido a los investigadores prescindir del proceso de inmunización. Ha sido entonces posible la obtención de anticuerpos contra prácticamente cualquier antígeno. Además partiendo de fuentes diversas que incluyen anticuerpos humanos, los cuales son de gran potencial en las aplicaciones terapéuticas (revisiones en Burton and Barbas, 1994; Winter et al., 1994). Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible determinar completamente la relación que existe entre la secuencia primaria de los anticuerpos y sus propiedades de reconocimiento. Este hecho ha limitado el diseño de repertorios de genes para obtener anticuerpos con las propiedades de reconocimiento deseadas.

Hacia finales de la década de los 1980s el análisis de la estructura tridimensional de los anticuerpos reveló que cinco de los seis lazos ("loops") que conforman el sitio de unión para el antígeno poseen una estructura de cadena principal que se restringe a ciertos motivos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

estructurales (Chothia et al., 1987, 1989). Se dedujo, entonces, que estos motivos estructurales dependían de la conservación de ciertos patrones en la secuencia de aminoácidos (a.a.). Al conjunto reducido de conformaciones que comúnmente tiende a adoptar la cadena principal de las regiones hipervariables se les llamó estructuras canónicas (Chothia et al., 1987). Este descubrimiento ha permitido predecir, partiendo sólo de la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional del sitio de unión para el antígeno. A partir de entonces comenzaron a surgir algunas evidencias que pretenden explicar la relación estructura-función de los anticuerpos.

Con base en el modelo de las estructuras canónicas se han venido estudiando las secuencias de los genes de línea germinal, pseudogenes y las secuencias rearregladas de anticuerpos (Almagro, et al., 1995, 1996, 1997, 1998, Vargas-Madrado et al., 1995; Lara-Ochoa et al., 1996). Se ha descrito que las combinaciones de conformaciones canónicas se reducen a un número sorprendentemente pequeño (Almagro, et al., 1995; Vargas-Madrado et al., 1995; Lara-Ochoa et al., 1996). De 300 posibles combinaciones de estructuras canónicas, sólo 10 describen aproximadamente el 90% de todas las secuencias conocidas. Ello redujo el espacio de conformaciones del sitio de unión para el antígeno a unas pocas variantes (Vargas-Madrado et al., 1995).

Además, se conoce que en algunos casos la geometría de los sitios de unión para el antígeno correlaciona con el tamaño del antígeno reconocido (Davies et al., 1990; Wilson et al., 1991; Webster et al., 1994; Wilson and Stanfield, 1993; Vargas-Madrado et al., 1995; Lara-Ochoa et al., 1996). Anticuerpos con sitios de unión relativamente planos tienden a reconocer proteínas, mientras que anticuerpos con sitios de unión cóncavos, preferentemente, reconocen moléculas pequeñas (Vargas-Madrado et al., 1995; Lara-Ochoa et al., 1996). Se conoce además que la diferencia entre estas geometrías se debe mayormente al largo del primer lazo hipervariable de la cadena ligera (L1) de los anticuerpos (Almagro, comunicación personal).

Por otra parte el conocimiento de los genes de línea germinal de humanos ha permitido observar que existe una expresión preferencial de ciertos genes (Griffiths et al., 1994). Dentro de los genes  $V\kappa$ , el gen A27, se expresa en uno de cada cuatro anticuerpos humanos (Griffiths et al., 1994). Además se ha observado que A27 se encuentra unido, preferencialmente, a los genes "joining" JK1. Estos antecedentes podrían sugerir que el gen A27 se utiliza en el reconocimiento de diversas moléculas. Este gen en la línea

germinal codifica para un L1 corto (12 a.a.) (Tomlinson et al., 1995), lo cual podría sugerir que anticuerpos que lo contengan reconocen, fundamentalmente, moléculas grandes. Mientras que la adición de 5 a.a. en el L1, agregados por la sustitución del L1 de A27 por el L1 de DPK24 (17 a.a.) podría cambiar las propiedades de reconocimiento y entonces interactuar con moléculas pequeñas.

## INTRODUCCIÓN

### **Anticuerpos: estructura y características generales.**

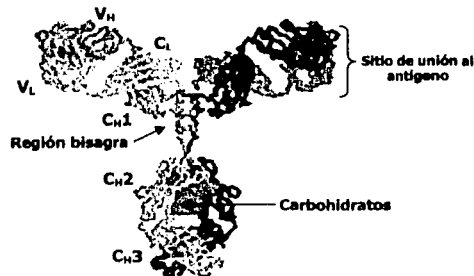
Los anticuerpos son moléculas de glicoproteínas (MW 150, 000) que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y que constituyen las moléculas efectoras de la respuesta inmune humoral. El nombre de inmunoglobulinas les fue dado por constituir la parte de la fracción  $\gamma$ -globulina que precipita en presencia de antígeno. Estos, fueron descubiertos por A. Tiselius y E.A. Kabat en 1939 y desde entonces han sido ampliamente estudiados.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. Estas difieren entre sí por su tamaño molecular, estructura, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos. Las diferentes clases de inmunoglobulinas están determinadas por el tipo de cadenas pesadas que las forman y que pueden ser:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ . Además, existen pequeñas diferencias dentro de la secuencia aminoacídica de las cadenas pesadas  $\alpha$  y  $\gamma$  lo cual guía a una clasificación más estricta de estos dos tipos de cadenas en subclases. De esta manera encontramos dos subclases para las cadenas pesadas  $\alpha$  (IgA1 e IgA2) y cuatro subclases para las cadenas pesadas  $\gamma$  (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

Por otra parte, se conoce que la distribución de las diferentes clases de inmunoglobulinas no es proporcional. La IgG (Figura 1) es la principal inmunoglobulina del suero humano y constituye, aproximadamente, el 80% del conjunto total de inmunoglobulinas. Esta clase es también la que se encuentra en mayor concentración sérica (aproximadamente 9mg/mL). Además, tampoco todas las subclases de IgG se encuentran igualmente representadas. Aproximadamente el 65% de las IgG sérica es IgG1. Después de las IgG las dos clases de inmunoglobulinas más representadas en el suero humano son las IgA y las IgM (5-15% y 5-10%, respectivamente). Las clases restantes (IgE e IgD) constituyen menos del 1% del total de inmunoglobulinas presentes en el suero.

Las moléculas de inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas entre sí. En algunos casos más de una molécula de inmunoglobulina pueden combinarse para formar anticuerpos multiméricos (IgA e IgM), pero en la mayoría de los casos se encuentran en forma de monómeros (IgG, IgE e IgD). Las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos:  $\kappa$  y  $\lambda$ . Estas se combinan al azar con cualquiera de los tipos de cadenas pesadas para formar una molécula de inmunoglobulina. En el caso de los anticuerpos humanos el 60% de las cadenas ligeras que conforman las

Inmunoglobulinas son de tipo  $\kappa$  y el 40% son de tipo  $\lambda$  (Klein et al, 1993; Tomlinson et al 1995; Willians et al, 1996); mientras que en el caso de los anticuerpos de ratón la relación es del 95% de cadenas ligeras  $\kappa$  contra un 5% de cadenas ligeras  $\lambda$  (Hood et al, 1967).



**Figura 1.** Representación de una IgG. En la figura se representa una IgG en la cual se destacan las partes fundamentales que conforman la misma. En tonos azules se representan las cadenas pesadas y en verde y amarillo se representan las cadenas ligeras. Se destaca la región bisagra y los sitios de unión al antígeno. En rosa oscuro se representan los carbohidratos. *Figura tomada de [www.xs4all.nl/~ednieuw/IgGsubclasses/background.jpg](http://www.xs4all.nl/~ednieuw/IgGsubclasses/background.jpg).*

Cada una de las cadenas que forman parte de los anticuerpos se encuentran divididas en dominios de 110 aminoácidos (a.a.) aproximadamente. Las cadenas pesadas poseen un dominio variable ( $V_H$ ) y entre tres y cuatro dominios constantes ( $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$  y  $C_H4$ ) dependiendo del tipo de anticuerpo. Las cadenas ligeras poseen un dominio variable ( $V_L$ ) y un dominio constante ( $C_L$ ) (Figura 1).

El análisis cristalográfico por rayos X ha revelado que los dominios de las inmunoglobulinas se encuentran formando parte de una estructura compacta característica conocida como "immunoglobulin fold". Esta estructura consiste en un "sandwich" de dos láminas  $\beta$  plegadas cada una formada por tres o cuatro cadenas  $\beta$  antiparalelas de aminoácidos. Cada una de las cadenas están conectadas por lazos de diferente longitud. Las cadenas  $\beta$  se caracterizan por tener a.a. hidrofóbicos e hidrofílicos alternos cuyas cadenas laterales se encuentran arregladas de manera perpendicular con respecto al plano de la lámina. Los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran orientados hacia el interior de la estructura mientras que los hidrofílicos se encuentran orientados hacia fuera. Ambas láminas  $\beta$  se

encuentran estabilizadas por interacciones hidrofóbicas entre ellas y por la presencia de puentes disulfuro conservados.

Aunque los dominios variables y constantes poseen una estructura similar, existen diferencias entre ellos. Los dominios variables son ligeramente más largos que los dominios constantes. Esto se debe a que los dominios variables poseen un par de cadenas  $\beta$  adicionales dentro de la estructura de lámina  $\beta$  y un segmento lazo adicional conectando dichas cadenas.

Entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$  de las cadenas pesadas tipo  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  existe una secuencia peptídica que no guarda homología con el resto de los dominios y se le conoce como región bisagra (Figura 1). Esta región es rica en prolinas, lo cual le confiere cierta flexibilidad a las IgG, IgA e IgD. El gran número de prolinas presentes en la región bisagra le confiere a esta zona una conformación polipeptídica extendida, lo cual la hace particularmente vulnerable a enzimas proteolíticas. Aunque las cadenas pesadas  $\mu$  y  $\epsilon$  no poseen región bisagra, ellas presentan un dominio  $C_{H2}$  adicional con propiedades parecidas a dicha región.

La comparación detallada de la secuencia de a.a. de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  ha revelado que la variabilidad de secuencia está concentrada en ciertas regiones conocidas como regiones hipervariables. Existen tres regiones hipervariables en las cadenas pesadas (H1, H2 y H3) y tres en las cadenas ligeras (L1, L2 y L3) tanto en humano como en ratón. Las regiones hipervariables constituyen entre el 15%-20% de cada uno de los dominios variables y conforman el sitio de unión al antígeno. Como estos sitios son complementarios a la estructura del epítoto las regiones hipervariables también son conocidas como regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). El 80%-85% restante de cada uno de los dominios variables presentan mucho menor variación. Estas regiones de menor variación son conocidas como regiones de armazón (FRs) (Davies and Metzger, 1983; Alzari PM et al, 1988).

Las regiones marco y las regiones hipervariables poseen diferentes localizaciones dentro del "immunoglobulin fold". Las regiones FRs generan la estructura de lámina  $\beta$  plegada dentro de los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , mientras que los CDRs están localizados en los lazos que conectan las cadenas  $\beta$  de estos dominios. De esta manera la estructura tridimensional de los dominios variables provee un marco rígido necesario para la función del anticuerpo y al

mismo tiempo una enorme diversidad de sitios de unión al antígeno por variación de la longitud de los lazos hipervariables.

### **Estructura de las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas.**

Desde la década de los 70 comenzaron a surgir evidencias de que existía una relación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura de las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas. A partir de entonces se han venido desarrollando trabajos que tratan de explicar dicha relación. Los primeros estudios revelaron que existían 13 sitios en las cadenas ligeras y 7 en las cadenas pesadas que se conservaban al comparar las secuencias de regiones hipervariables hasta entonces conocidas (Kabat et al, 1977; Kabat, 1978). A estos residuos conservados se les delegó un papel estructural más que en la especificidad. Un año después el análisis de las regiones hipervariables de cadenas ligeras reveló que existían residuos conservados dentro de las regiones hipervariables que coincidían con residuos conservados dentro de regiones hipervariables de estructuras conocidas (Padlan, 1979). Este hecho dejaba claro el papel estructural de ciertos residuos conservados dentro de la secuencia aminoacídica de las regiones variables de las inmunoglobulinas.

Paralelamente, el análisis de la estructura de Fab y proteínas de Bence-Jones demostraron, que en muchos casos, las regiones hipervariables de la misma talla, aun cuando tuviesen secuencias aminoacídicas diferentes, tenían la misma conformación de cadena principal (Padlan and Davies, 1975; Fehllhammer et al, 1975; Colman et al 1977; de la Paz 1986).

Con base en estos antecedentes y a través de estudios comparativos de Fab y dominios variables ligeros de secuencia y estructura conocida, se demostró que existe un repertorio limitado de conformaciones de cadena principal para cinco de los seis lazos que forman parte de las regiones hipervariables (H1, H2, L1, L2, L3) (Chothia and Lesk, 1987; Chotia et al., 1989; Tramontano et al., 1990). Al conjunto reducido de conformaciones que comúnmente tiende a adoptar la cadena principal de las regiones hipervariables de las inmunoglobulinas se les denominó "estructuras canónicas" (Chothia and Lesk, 1987; Chotia et al., 1989; Tramontano et al., 1990). Se demostró, además, que la conformación adoptada depende de los residuos conservados, antes descritos, los cuales poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno y de asumir valores inusuales de ángulos de torsión ( $\phi$ ,  $\omega$  o  $\psi$ )

(Chothia et al., 1987). Estos se encuentran en sitios específicos dentro de las regiones hipervariables y en ciertos lazos presentes en las regiones de armazón. Así, las regiones hipervariables que poseen conformaciones similares en diferentes inmunoglobulinas poseen los mismos residuos o residuos muy similares en estos sitios (Chothia et al., 1986). Además se ha descrito que las estructuras canónicas dependen, también, del largo de los lazos hipervariables (Chotia and Lesk, 1987; Chotia et al., 1989; Tramontano et al., 1990).

Teniendo en cuenta las reglas que relacionan la secuencia aminoacídica y la estructura tridimensional de los lazos hipervariables de los anticuerpos, desde la última década del siglo pasado, se han venido analizando los genes funcionales de línea germinal (Chotia et al., 1992; Willians and Winter, 1993; Cox et al., 1994), pseudogenes (Vargas-Madrado et al, 1995; Almagro et al., 1995) y secuencias maduras de aminoácidos (Chotia et al., 1989; Vargas-Madrado et al, 1995; Almagro et al., 1995). El análisis ha corroborado la existencia de estructuras canónicas en la mayoría de las secuencias de inmunoglobulinas.

### **Relación entre la estructura y la función de las inmunoglobulinas.**

Con el objetivo de encontrar una relación entre la estructura y las propiedades de reconocimiento de los anticuerpos y con base en el modelo de las estructuras canónicas, se han venido estudiando la secuencia de genes de línea germinal, pseudogenes y secuencias rearrregladas de anticuerpos. Se ha encontrado que existen ciertas características geométricas en los sitios de unión al antígeno que correlacionan con el tipo de antígeno reconocido (Davies et al., 1990; Wilson et al., 1991; Webster et al., 1994; Wilson and Stanfield, 1993; Almagro, et al., 1995, 1996, 1997, 1998, Vargas-Madrado et al., 1995; Lara-Ochoa et Lara-Ochoa et al., 1996; Soderlind et al., 2000). Anticuerpos con sitios de unión relativamente cóncavos tienden a reconocer moléculas pequeñas; mientras que anticuerpos con sitios de unión planos reconocen, fundamentalmente, moléculas grandes (Rees and de la Paz, 1986; Bolger and Sherman, 1991; Wilson et al., 1991; Webster et al., 1994; Vargas-Madrado et al, 1995; Lara-Ochoa et al, 1996; Soderlind et al, 2000).

Se ha descrito que en muchos de los anticuerpos de estructura conocida aparecen ciertas combinaciones de estructuras canónicas y que estas correlacionan con la geometría del sitio de unión y el tipo de antígeno reconocido (Vargas-Madrado et al., 1995). De las 300 posibles combinaciones de estructuras canónicas solo 10 describen, aproximadamente, el 90% de las estructuras de inmunoglobulinas conocidas (Vargas-Madrado et al, 1995). Este hecho



restringe el espacio de conformaciones del sitio de unión al antígeno a unas pocas variantes (Vargas-Madrado et al, 1995).

Dentro de las 10 clases de estructuras canónicas más frecuentes observadas dentro del repertorio de las inmunoglobulinas los lazos hipervariables H1, L2 y L3 siempre muestran el mismo tipo de estructura canónica (Vargas-Madrado et al, 1995). Este hecho sugiere que dichos lazos no contribuyen a la variación de la geometría del sitio de unión al antígeno y solamente los lazos hipervariables L1 y H2 juegan un papel en este aspecto (Vargas-Madrado et al, 1995). De esta manera una correlación entre la longitud de L1 y H2 y el tipo de antígeno reconocido indica que los anticuerpos que presentan un L1 y un H2 corto reconocen, preferentemente, moléculas grandes; mientras anticuerpos con L1 y H2 largos tienden a reconocer moléculas pequeñas (Vargas-Madrado et al, 1995). En los casos donde la forma del sitio de unión al antígeno no está determinada por la longitud de los lazos L1 y H2, ésta parece estar definida por el largo del lazo hipervariable H3 (Vargas-Madrado et al, 1995). En estos casos se mantiene la geometría del sitio de unión al antígeno pero ésta se define por variaciones en la conformación de H3 (Vargas-Madrado et al, 1995).

En el caso de la especificidad fina, son importantes otros factores tales como algunos residuos presentes en las cadenas laterales de los sitios de unión al antígeno (Alzari et al., 1990; Mian et al., 1991; Padlan et al., 1995), la disposición relativa de los dominios  $V_H/V_L$  (Davies and Metzger, 1983; Padlan, 1994) y rearreglos conformacionales de los anticuerpos en respuesta a la unión con sus ligandos (Colman et al., 1987; Wilson and Stanfield, 1993, 1994; Padlan, 1994).

### **Relación entre la secuencia de aminoácidos del L1 y la geometría del sitio de unión al antígeno.**

Existen fuertes evidencias de que la geometría del sitio de unión al antígeno depende, fundamentalmente, del largo de los lazos hipervariables L1 y H2 (Vargas-Madrado et al, 1995). Trabajos realizados por Almagro y colaboradores donde se comparan anticuerpos de estructura conocida, así como secuencias aminoacídicas de anticuerpos anti-péptidos y anti-proteínas, han revelado evidencias que destacan la importancia del L1 en la geometría del sitio de unión al antígeno (Ramírez-Benítez [tesis doctoral, 2001]).

En el caso de los anticuerpos anti-péptidos se han descrito 4 longitudes diferentes para el L1 (7, 11, 12 y 13 residuos) (Al-Lazikani et al, 1997). Se ha demostrado que la mayoría de los

anticuerpos anti-péptidos presentan longitudes en el L1 que oscilan entre 11-13 residuos (L1 largo), siendo la longitud de 12 residuos la mayormente representada.

La longitud de los lazos hipervariables L2 (3 residuos) y L3 (6 residuos) se encuentra conservada en este tipo de anticuerpos. Además, las longitudes de los lazos hipervariables H1 (7-8 residuos con 7 residuos predominantemente) y H2 (5-6 residuos con 6 residuos predominantemente), en este tipo de anticuerpos, se encuentran relativamente conservadas.

En contraste, se ha encontrado que los anticuerpos anti-proteínas presentan principalmente un L1 corto. Para estos anticuerpos se han descrito longitudes de 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 residuos en el L1; pero la gran mayoría de los mismos presentan entre 6-8 residuos en este lazo hipervariable predominando la longitud de 7 residuos. El resto de los lazos hipervariables en este tipo de anticuerpos poseen longitudes muy similares a las observadas en los anticuerpos anti-péptidos.

En el caso del lazo hipervariable H3 de ambos tipos de anticuerpos se observa una gran variedad de longitudes (5-17 residuos), se ha reportado que no existen diferencias significativas entre anticuerpos anti-péptidos y anticuerpos anti-proteínas al comparar las longitudes promedios de este lazo hipervariable (Almagro, comunicación personal).

Se han reportado unos pocos casos de anticuerpos anti-péptidos que poseen L1 corto. En estos casos, sin embargo, la estructura del sitio de unión al antígeno conserva una geometría cóncava. Este hecho está soportado por la presencia de un lazo hipervariable H3 con una longitud inusualmente larga (17 residuos). En el caso de los anticuerpos anti-proteínas también se han encontrado excepciones a la que parece la regla general. La presencia de un L1 largo en la estructura de un anticuerpo anti-proteína genera un sitio de unión al antígeno cóncavo. En estos casos al analizar como ocurre la interacción del antígeno con el anticuerpo se han encontrado dos fenómenos. En algunos casos la interacción no es complementaria, sino que el antígeno se coloca sobre la estructura del sitio de unión dejando vacía la cavidad formada por el L1 largo. En otros casos el antígeno presenta una protuberancia que se encaja en dicha cavidad y el resto de la proteína se acomoda sobre la superficie del sitio de unión.

Todas las evidencias anteriores sobre la importancia del largo del lazo hipervariable L1 en la geometría del sitio de unión al antígeno podrían ser un punto de partida en el diseño de anticuerpos con las propiedades de reconocimiento deseadas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Uso de genes en las inmunoglobulinas.

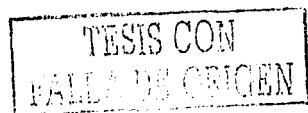
El conocimiento de los genes de línea germinal de humanos ha permitido observar que existe una expresión preferencial de ciertos genes (Griffiths et al., 1994). En el caso de los genes  $V_H$  se ha observado que existe un uso preferencial del gen DP47, tanto *in vivo* como *in vitro* (Griffiths et al., 1994). Dentro de los genes  $V_L$  se ha descrito que el gen  $V_k$  A27 se expresa en uno de cada cuatro anticuerpos humanos (Griffiths et al., 1994). Además se ha observado que A27 se encuentra unido, preferencialmente, a los genes "joining" JK1. Estos antecedentes podrían sugerir que el gen A27 se utiliza en el reconocimiento de diversas moléculas. Este gen en la línea germinal codifica para un L1 corto (12 a.a.) (Tomlinson et al., 1995), lo cual podría sugerir que anticuerpos que lo contengan deben reconocer, con preferencia, moléculas grandes.

El gen VL más utilizado *in vivo*, después de A27 y el DPK9, es el DPK24 (Griffiths et al., 1994). Este gen a diferencia de A27 y DPK9 posee un L1 largo (17 a.a.). Estas evidencias hacen a A27 y a DPK24 fuertes candidatos para llevar a cabo un estudio comparativo en cuanto a la relación entre las propiedades de unión de los anticuerpos y la conformación del sitio de interacción con el antígeno.

### Despliegue en fagos

Hace cerca de 15 años la producción de anticuerpos estaba limitada por laboriosos esquemas de inmunización y/o la generación de hibridomas. Las técnicas de ADN recombinante y amplificación de genes ha permitido la clonación de genes de anticuerpos en bacterias. Esta técnica de inmortalización acompañada de la introducción en 1985 de una técnica novedosa conocida como "Phage Display" (Smith GP, 1985), ha permitido a los investigadores contar con una metodología que no involucra el complejo trabajo con animales o hibridomas.

El despliegue de fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos por fusión a una proteína de la cápside del fago (pIII) (McCafferty et al., 1990; Barbas et al., 1991; Breitling et al., 1991; Garrard et al., 1991; Hoogenboom et al., 1991; Marks et al., 1991; Griffiths et al., 1994;) y la selección con el antígeno de los fagos que llevan anticuerpos específicos, constituye un poderoso método para obtener anticuerpos con especificidad de unión predeterminada (Winter et al., 1994). Para la obtención de dichos anticuerpos se puede partir de genes variables de inmunoglobulinas (Winter et al., 1991) de animales inmunizados contra un antígeno específico, no inmunizados (Marks et al.,



1991; Hoogenboom and Winter, 1992), genes sintéticos (Soderlind et al., 2000) o sus combinaciones (Rojas G et al., 2002). De esta manera se pueden obtener fragmentos de anticuerpos de alta (Clackson et al., 1991) o mediana afinidad y con actividad neutralizante contra virus (Barbas et al., 1992 a y b; Moulard M et al., 2002), toxinas (Gómez et al., 2001), entre muchas otras opciones.

El despliegue de anticuerpos sobre la superficie de un fago y la selección de los mismos contra un antígeno determinado, imita las características de selección y diversidad del sistema inmune. A través de este método se pueden obtener, utilizando un mismo repertorio, fragmentos de anticuerpo con diferentes especificidades de unión (Soderlind et al., 2000), incluyendo aquellos anticuerpos difíciles de obtener por inmunización como son los autoanticuerpos (Griffiths et al., 1993; Marks et al., 1993; Farilla L et al., 2002).

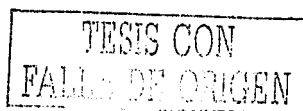
La posibilidad que ofrece esta metodología para construir bibliotecas de gran diversidad molecular y seleccionar moléculas con propiedades determinadas la han hecho de amplia aplicación. Al mismo tiempo, es posible reemplazar la inmunización de animales y el desarrollo de hibridomas por un sistema en bacterias las cuales pueden ser capaces de sintetizar y expresar cantidades ilimitadas de anticuerpo prácticamente contra cualquier antígeno.

#### **Ciclo de vida del fago M13.**

Los bacteriofagos son virus capaces de infectar una gran variedad de bacterias Gram-negativas utilizando el pilus como receptor. De estos fagos uno de los mejores caracterizados hasta el momento es el fago M13 el cual infecta cepas de *Escherichia Coli* (*E. Coli*). A diferencia de otros fagos, M13 no provoca una infección lítica a *E. coli*. Este induce un estado en la célula infectada durante el cual la misma produce y secreta partículas de fago sin que ocurra la lisis celular.

El fago filamentoso M13 tiene aproximadamente 895nm de largo y 9nm de diámetro. Contiene un genoma de DNA simple cadena de 6407 bases las cuales codifican para 10 proteínas diferentes. El DNA está envuelto por una cubierta protéica que contiene aproximadamente 2700 copias del producto del gen 8 (pVIII). Un fago viable además expresa entre tres y cinco copias del producto del gen 3 (pIII) que codifica para una proteína de la cápside que se encuentra en la punta del fago.

La infección se inicia cuando el fago se une al pilus de una *E. coli* macho proceso mediado por la proteína 3 del fago (pIII). Cuando el fago entra a la célula las proteínas de la

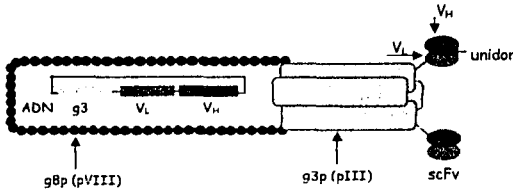


cápside son removidas y depositadas en la membrana interna. Al mismo tiempo la maquinaria de replicación de la bacteria convierte la cadena sencilla de ADN parental del fago en doble cadena (FR). Después de ser replicada, la doble cadena de ADN vuelve a convertirse en cadena sencilla la cual se empaqueta en una nueva partícula de fago. El péptido señal de las proteínas pIII y pVIII dirigen a las mismas hacia la membrana interna de la bacteria. La partícula de fago madura es extruida a través de la membrana interna sin que se afecte el crecimiento de la célula. La producción de fagos continua hasta que eventualmente la célula muere por la acumulación de componentes tóxicos del fago (pIII) o productos de desecho de la célula. En la figura 2 se muestra un dibujo esquemático de un fago filamentoso expresando un anticuerpo en formato de fragmento variable de cadena sencilla (scFV).

Las proteínas pIII y pVIII están directamente involucradas en la clonación y expresión de anticuerpos como proteínas de fusión (Hoess RH, 2001; Rodi and Makowski, 1999; Vaughan et al, 1998; Griffiths and Duncan, 1998; Zwick et al, 1998; Dall'Acqua and Carter, 1998; Raag and Withlow, 1995; Winter et al, 1994). Muchos péptidos cortos y una gran variedad de proteínas han sido desplegadas en la región amino terminal de la proteína pIII madura. En cambio la proteína pVIII parece tolerar solamente insertos cortos (5-6 a.a.) (Greenwood et al., 1991). Además se ha reportado el uso de la proteína pIX del fago para desplegar, eficientemente, anticuerpos procedentes de una biblioteca no inmune de humano, acoplados a la región amino terminal (Gao et al, 2002).

Para poder ser recuperados como fago-anticuerpos, los scFvs son clonados en vectores fagémidos. Estos vectores llevan dos orígenes de replicación, uno para fago M13 y otro para *E. coli*. Esto permite que los mismos puedan ser crecidos como plásmidos o, alternativamente, empacados como fagos recombinantes con la ayuda de un fago ayudador ("helper") tal como el M13/KO7.

El uso de un vector fagémido permite el despliegue monovalente de los anticuerpos. Esto es posible gracias a que existe una competencia entre la pIII salvaje ("wild type") y la pIII fusionada al fragmento de anticuerpo por la incorporación en el fago. Esto hace que por cada fago se exprese, solamente, una copia del anticuerpo fusionado. Incluso en la mayoría de los casos no se logra expresar ni siquiera una copia de este último. De esta manera se pueden obtener de una forma más eficiente anticuerpos de alta afinidad al evitar el fenómeno de avidéz (O'Connell et al, 2002).



**Figura 2.** Representación esquemática de un fago desplegando un anticuerpo en formato de scFV. El fago consiste de ADN circular rodeado de proteínas de cubierta. La g8p (pVIII) es la proteína principal, mientras que g3p (pIII) se localiza en la punta del fago y es la proteína menos representada. Los genes que codifican para los scFvs se encuentran fusionados a pIII y están presentes en el genoma del fago.

### Fragmentos de anticuerpos

Las moléculas de anticuerpos contienen dominios de proteínas que pueden ser separados por digestión con proteasas o producidos por tecnología recombinante. Dos tipos de fragmentos de unión a antígeno denominados como Fab y Fv han sido clonados y expresados sobre la superficie de fagos filamentosos. Los Fab consisten de segmentos  $V_H$ - $C_{H1}$  y  $V_L$ - $C_L$  unidos por puentes disulfuro. Existen además los Fv, los cuales están compuestos solamente de regiones  $V_H$  y  $V_L$ . La versión recombinante de los Fv es conocida como scFv (fragmento variable de cadena sencilla). Las dos regiones variables en los scFv son unidas por un péptido sintético compuesto de serinas y glicinas repetidas  $(SGly_4)_3$  y expresadas como una cadena polipeptídica. El péptido unidor permite la asociación de los  $V_H$  y los  $V_L$  para formar un sitio de unión a antígeno (revisado en Asan ME et al, 2002).

### Expresión de Anticuerpos por Despliegue en Fagos

La expresión del anticuerpo unido a la proteína pIII está controlada por un promotor inducible *lac* presente en el vector pSyn 2. Este promotor está regulado por el represor de *lac* (*lac I<sup>q</sup>*). Bajo determinadas condiciones la transcripción del promotor *lac* por la ARN polimerasa de *E. coli* está bloqueada por el represor *lac* y la proteína de fusión pIII no se expresa. Como la acumulación de la proteína pIII es tóxica para la célula antes de la infección con M13/KO7 es importante que la expresión de pIII se encuentre inhibida. La inhibición se logra por adición de glucosa al medio de cultivo. Una vez que las células son infectadas con el fago ayudador se induce la expresión del scFv y la proteína pIII por medio de la eliminación de la glucosa y la adición de IPTG.

12010  
FALLA DE ORIGEN

## **HIPÓTESIS**

- Existe una correlación entre la geometría de los sitios de unión para el antígeno y el tamaño del antígeno reconocido (Vargas-Madrado et al., 1995; Lara-Ochoa et al., 1996). Anticuerpos con sitios de unión relativamente planos tienden a reconocer proteínas; mientras que anticuerpos con sitios de unión cóncavos, preferentemente, reconocen moléculas pequeñas.
- La utilización del gen variable ligero A27 debe producir repertorios que reconozcan diversos antígenos.
- La construcción de un repertorio que contenga al gen variable A27 debe reconocer moléculas grandes, mientras que un repertorio que contenga al gen variable A27 modificado (cambio del L1 por el de el gen DPK24) debe reconocer moléculas pequeñas.

## **OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta todos los antecedentes que existen sobre el tema, nos hemos propuesto como objetivo general de nuestro proyecto, demostrar que existen reglas que gobiernan el reconocimiento molecular mediado por anticuerpos y que estas reglas permiten diseñar e implementar repertorios de anticuerpos con preferencia para unir ciertos tipos de moléculas. Estos repertorios están basados en diseño y son diferentes, desde el punto de vista conceptual, a cualquiera de los repertorios hasta la fecha conocidos.

Como objetivos específicos de nuestro trabajo nos hemos propuesto:

- Diseñar y construir dos bibliotecas de anticuerpos desplegados en fagos con características de reconocimiento preferenciales.
- Caracterizar dichas bibliotecas.
- Seleccionar ambas bibliotecas contra un panel de antígenos de interés biomédico y que incluya moléculas de diferente tamaño.
- Seleccionar anticuerpos específicos contra cada uno de los antígenos en cuestión.
- Caracterizar los anticuerpos seleccionados atendiendo a su secuencia y especificidad.

## MATERIALES

### Cepas de *E. coli*

Durante el desarrollo de los experimentos fueron empleadas dos cepas de *E. coli*. Para expresar los fragmentos de anticuerpos como fagos y durante toda la etapa de selección se empleó la cepa de *E. coli* XL1blue. Esta cepa tiene resistencia a tetraciclina lo cual permitió su selección. Es F<sup>+</sup> lo cual permitió la expresión de los scFv como fago-anticuerpos. Además es Rec A<sup>-</sup> lo que es importante para evitar recombinación y con ello la introducción de mutaciones en las construcciones durante el proceso de selección.

Para la producción de anticuerpos solubles se utilizó la cepa de *E. coli* TG1. Esta cepa no presenta resistencia a ningún antibiótico, es RecA<sup>+</sup> y expresa buenas cantidades de anticuerpos solubles. Ambas cepas son parcialmente supresoras, lo cual le permite leer el codón de terminación ámbar como una glutamina.

### Plásmidos

X4-A27 : Vector pCANTAB 5B que en su sitio de clonación múltiple posee un scFv formado por un gen de la familia V<sub>H</sub>3 de humano (DP47) y el gen V<sub>L</sub> de humano (A27). Ambos genes se encuentran ensamblados a través de un fragmento unidor compuesto de una serina (S) y cuatro glicinas (G) repetidas tres veces (SG<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. Este plásmido fue utilizado como molde para amplificar el gen variable ligero A27 y el unidor (construido por Almagro y colaboradores).

X4-A27mod : Este plásmido es una variante del X4-A27 que posee el L1 del gen variable ligero DPK24. Este gen posee un L1 largo (13 residuos) en lugar del L1 corto (8 residuos) del gen A27. Fue utilizado para amplificar el gen A27mod (construido por Almagro y colaboradores).

PSyn1 : Es un vector de expresión derivado del vector pHEN 1. Posee un péptido señal que permite que el fragmento clonado en el sitio de clonación múltiple pase del citoplasma de la célula hacia el espacio periplásmico. Presenta sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Sfi I y Not I. No posee proteína pIII y permite expresar los scFv en forma de anticuerpo soluble. Tiene resistencia a ampicilina lo cual permite la selección de colonias transformadas con el plásmido. Además, a continuación del sitio de clonación, presenta una cola de histidinas (H<sub>6</sub>) que permite que el fragmento de anticuerpo clonado sea purificado a través de una columna de níquel. Fue empleado para subclonar los fragmentos de anticuerpos específicos contra cada uno de los antígenos.



*pSyn2* : Es un vector fagémido derivado del vector pHEN 1. Este presenta un sitio de clonación múltiple seguido de un tag de c-myc que permite el reconocimiento por ELISA del fragmento de anticuerpo. A continuación se encuentra un codón de paro ámbar al que sigue la proteína de la cápside del fago filamentoso M13 pIII. Esta disposición permite que el fragmento de anticuerpo clonado pueda ser expresado como fago-anticuerpo en la superficie del fago M13 asociado a la pIII. Al igual que el pSyn1 posee un gen que le confiere resistencia a ampicilina y un péptido señal que permite el paso de la fusión del citoplasma al periplasma celular. Además presenta un origen de replicación para *E. coli* y otro para M13.

### **Fago Helper**

Para el rescate de las bibliotecas en forma de fago-anticuerpo se empleó el fago filamentoso M13/KO7. Este fago posee la capacidad de proveerle a un vector fagémido las proteínas que necesita para empaquetarse en forma de partícula infectiva. Este fago contiene todos los genes que codifican para las proteínas de la cápside pero son deficientes en la replicación.

En todos los experimentos el rescate de las bibliotecas como fago-anticuerpos se llevó a cabo con una concentración entre  $10^{12}$ - $10^{13}$ UFP/L de cultivo celular.

### **Medios de cultivo**

*YT2X*: bacto triptona (16g/L), bacto extracto de levaduras (10g/L) y NaCl (5g/L); pH 7.0.

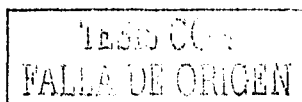
*SB*: bacto triptona (32g/L), extracto de levaduras (20g/L) y NaCl (5g/L); pH 7.5.

*LB*: bacto triptona (10g/L), extracto de levaduras (5g/L) y NaCl (10g/L); pH 7.0.

### **Selección de los Antígenos**

Para la selección de los antígenos se tuvo en cuenta como primer criterio que fuera un panel con características tales que nos permitiera probar nuestra hipótesis de trabajo. El segundo factor a tener en cuenta fue la disponibilidad de los mismos. Además se trataron de elegir antígenos que tuvieran alguna importancia desde el punto de vista biomédico o biotecnológico.

Teniendo en cuenta estos tres criterios se seleccionaron dos toxinas de alacrán, la principal toxina presente en el veneno de la araña viuda negra y espermatozoides murinos.



A continuación se describen algunas de las características principales de los antígenos elegidos.

### **Toxinas de alacrán**

En el mundo existen, aproximadamente, 1500 especies diferentes de alacrán (Possani et al., 1999), pero solo las pertenecientes a la familia *Buthidae* son consideradas peligrosas para el hombre (Granier C, et al., 1989). Estas especies pueden ser encontradas en África del Norte (*Androctonus* y *Buthus*), Libia (*Leiurus*), México y el sur de los Estados Unidos (*Centruroides*) y Brasil (*Tityus*) (Granier C, et al., 1989; Possani et al., 1999).

El veneno contenido en las glándulas venenosas de los alacranes está constituido por una gran variedad de componentes activos biológicamente: enzimas, péptidos, nucleótidos, lípidos, mucoproteínas y aminas biogénicas entre otros (Possani et al., 1999). De todos estos los más estudiados son los polipéptidos que reconocen canales iónicos y receptores en membranas de células excitables (Catterall WA, 1980; Garcia ML et al, 1997; Valdivia HH et al, 1992; Gordon D et al, 1998) y los cuales son peligrosos para muchos organismos incluyendo el hombre (Miranda F et al, 1970; Zlotkin E et al, 1978; Possani LD, 1984). Hasta el momento han sido descritas cuatro familias de toxinas que interactúan con canales iónicos: toxinas que se unen a canales de  $\text{Na}^+$  (Catterall WA, 1980; Rochat H et al, 1979), toxinas que se unen a canales de  $\text{K}^+$  (Carbone E et al, 1982; Possani LD et al, 1982; Miller et al 1985), toxinas que se unen a canales de  $\text{Cl}^-$  (Debin JA et al, 1993) y toxinas que se unen a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Valdivia H and Possani, 1998).

Todas las toxinas específicas para canales de  $\text{Na}^+$  poseen entre 60-76 residuos de aminoácidos y están estabilizadas por cuatro puentes disulfuro (Possani LD, 1984; Gordon D et al, 1998; Rochat H et al, 1979; Lebreton F et al, 1994; Becerril B et al, 1995). Entre estas se encuentran incluidas las toxinas Cn2 (*Centruroides noxius*) y CII1 (*Centruroides limpidus limpidus*), las cuales serán objeto de estudio durante este trabajo por su importancia médica en México.

En México los únicos alacranes que representan un riesgo para los seres humanos son los del género *Centruroides* (Dahesa-Dávila and Possani, 1994). Dentro de este género una de las especies más peligrosas es *Centruroides limpidus* la cual es responsable del mayor número de accidentes por envenenamiento en este país (Dehesa-Dávila M, 1989). Sin embargo, el más tóxico de todos los alacranes mexicanos es el *Centruroides noxius* (Dent

MAR, et al., 1980), pero es menos importante desde el punto de vista médico porque no co-habita con los seres humanos. Las toxinas de alacrán provenientes de una de las subespecies de *Centruroides Limpidus*: *Centruroides limpidus limpidus* representan las más peligrosas para humanos en México ya que más del 50% de las picaduras de alacrán en este país ocurren por dicha sub-especie.

Cada año se registran cientos de miles de casos de picadura de alacrán y de estos ocurren cientos de muertes (Granier C, et al., 1989). Hasta el momento el único tratamiento específico contra envenenamiento por picadura de alacrán es el uso de sueros anti-alacrán. Estos son obtenidos a partir de caballos inmunizados con glándulas de veneno maceradas. Las inmunoglobulinas del caballo son digeridas con pepsina y los F(ab')<sub>2</sub> son purificados y usados como antivenenos. Estos productos contienen F(ab')<sub>2</sub> irrelevantes lo cual provoca que se necesite aplicar altas dosis del antiveneno para neutralizar el efecto del veneno. Es por ello que sería ventajoso obtener anticuerpos dirigidos específicamente contra los epitopes responsables del efecto del veneno para así producir una antiveneno más específico y eficiente.

*Cn2* es una de las toxinas que afectan canales de Na<sup>+</sup> más potentes presentes en el veneno de *Centruroides noxius*; además de constituir el componente más abundante (Zamudio et al, 1992). Se conoce que anticuerpos policlonales generados contra *Cn2* son capaces de proteger contra el envenenamiento causado por el veneno completo (Calderon-Aranda et al, 1993). Se ha reportado además un anticuerpo monoclonal (BCF2) capaz de reconocer y neutralizar el efecto toxico de la toxina *Cn2* pura (Zamudio et al, 1992); así como el veneno soluble (Licea AF et al,1996).

### ***Toxinas de Viuda Negra***

El veneno de viuda negra contiene varias toxinas protéicas que afectan específicamente vertebrados, insectos y crustáceos (Frontali et al.,1976). Entre estas toxinas la única proteína tóxica para vertebrados es la  $\alpha$ -latrotoxina (LTX) (Frontali et al.,1976). La masa molecular de la toxina madura es de aproximadamente, 131 kDa (Frontali et al., 1976; Volynski et al., 1999).

*In vivo*, las células blanco de la LTX son las neuronas sensoriales y motoras. Como consecuencia de la acción de esta toxina sobre sus células blanco ocurre una potente descarga de neurotransmisores desde las terminales nerviosas, ya que la LTX estimula la

LEBIS CON  
FALLA DE ORIGEN

exocitosis de pequeñas vesículas sinápticas que contienen varios neurotransmisores (acetilcolina, glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (Rosenthal and Meldolesi, 1989; De Potter et al, 1997; Barnett et al., 1996; Tse and Tse, 1999). Hasta el momento, han sido descritos dos receptores para la LTX: la neurexina y la latrofilina, los cuales no están relacionados desde el punto de vista estructural o funcional (Ushkaryov et al., 1992; Lelianova et al., 1997). Por otra parte, uno de los principales efectos de la LTX es la formación de poros selectivos a cationes en la membrana plasmática de sus células blanco (Rosenthal and Meldolesi, 1989).

Se conoce además que la LTX es un dímero estable que puede formar tetrámeros (Orlova et al., 2000). Cada monómero posee tres dominios diferentes unidos consecutivamente. Existen datos preliminares, obtenidos en el Instituto de Biotecnología, que sugieren que anticuerpos policlonales generados contra la región amino de la  $\alpha$ -latrotoxina (residuos del 1-450, aproximadamente), neutralizan la acción tóxica de la toxina completa (solicitud de patente No. PCT/MX00/00048). Con base en estos antecedentes, en nuestro trabajo, fue utilizada esta región para seleccionar anticuerpos humanos a partir de cada una de las bibliotecas.

### **Características generales de la Reacción Acrosomal.**

Uno de los eventos indispensables para que ocurra la fecundación es la reacción acrosomal (RA). El acrosoma es una vesícula secretoria derivada del aparato de Golgi, la cual se encuentra ubicada en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide. Esta contiene las enzimas necesarias para que ocurra la penetración del espermatozoide a través de la capa externa del óvulo (Knobil et al, 1994).

La RA es un evento de exocitosis que consiste en la fusión de la membrana acrosomal y la celular en múltiples sitios de la cabeza del espermatozoide, seguido de lo cual ocurre la liberación de las enzimas líticas presentes en el acrosoma.

Además, durante la RA el espermatozoide expone nuevos elementos membranales que se requieren para la penetración de la capa externa del óvulo y la fusión de ambos gametos (revisado en López González [tesis doctoral, 2002]).



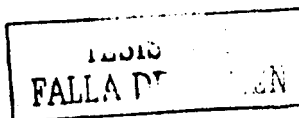
**Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos utilizados se listan en la Tabla 1.

**Tabla 1**

Gen amplificado	Secuencia del oligonucleótido empleado
Regiones VH <sup>a</sup>	HuVH1aBACK 5'-CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'
	HuVH2aBACK 5'-CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG-3'
	HuVH3aBACK 5'-GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3'
	HuVH4aBACK 5'-CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG-3'
	HuVH5aBACK 5'-GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'
	HuVH6aBACK 5'-CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'
Regiones JH <sup>a</sup>	HuJH1-2FOR 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC 3'
	HuJH3 FOR 5'-TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC-3'
	HuJH4-5FOR 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC-3'
	HuJH6 FOR 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3'
Unidor <sup>a</sup>	RHuJH1-2 5'-GCA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G-3'
	RHuJH3 5'-GGA CAA TGG TCA CCG TCT CTT CAG GTG G-3'
	RHuJH4-5 5'-GAA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G-3'
	RHuJH6 5'-GGA CCA CGG TCA CCG TCT CCT CAG GTG G-3'
	RHuV43aBACKFv 5'-GGA GAC TGC GTC AAC ACA ATT TCC GAT CCG CC-3'
A27/A27mod	HuV43aBACK 5'-GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC-3'
	A27-18 5'-TTT GAT TTT CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CGT 3'
	A27-12 5'-AGG TTT CTG CTG GTA CCA GGC TAA GTA GTT CTT ATT GTT GGA GCT GTA TAA AAC ACT CTG GCT GGA CCT GCA GGA GAG GGT GGC TT
ScFv Sfi I/Not I <sup>a</sup>	HuVH1aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'
	HuVH2aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG-3'
	HuVH3aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3'
	HuVH4aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG-3'
	HuVH5aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'
	HuVH6aBACKSfi 5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'
HuJk1aBACKNot 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC AGG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC-3'	
scFv/pSyn2	Lmb 3 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' pCANTAB5-S6 5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3'

a) Marks et al., 1991



## **METODOLOGÍA**

### **Obtención de los ARNs.**

El ARN se aisló mediante el método descrito por Chomczynski (Chomczynski P and Sacchi N., 1987). Las células provenientes de sangre periférica de 5 individuos sanos fueron resuspendidas en solución desnaturalizante (solución D), la cual contiene 4M tiocianato de guanidino, 5M citrato de sodio pH 7.0, 0.5% sarcosil y 100mM 2-mercaptoetanol, y se pasaron por una jeringa con aguja 23G. Luego se efectuó la extracción y purificación con fenol-cloroformo. La fase acuosa se sometió a dos precipitaciones sucesivas con isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una hora. El ARN precipitado fue lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua con dietil-pirocarbonato (DEPC). La concentración de ARN total se determinó por absorbancia a 260nm considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Transcripción Reversa.**

Los ARN obtenidos fueron utilizados para la síntesis de ADN complementarios (ADNc) por transcripción reversa. Para la obtención de los ADNc se utilizó un juego de reactivos para transcripción reversa de BOEHRINGER MANNHEIM (1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR AMV). Se preparó una mezcla de 20 $\mu\text{L}$  por reacción que contenía 5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1X de solución amortiguadora (100 mM de Tris, 500mM de KCl; pH 8.3), 1mM de una mezcla de dNTPs, 50U de inhibidor de ARNasa, 20U de la enzima Reverso Transcriptasa (AMV) y 3.2 $\mu\text{g}$  de oligonucleótidos hexámeros al azar ( $\text{N}_6$ ). La síntesis del ADNc se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) y las condiciones de reacción fueron las siguientes: 10min. a  $25^{\circ}\text{C}$ , para el alineamiento de los hexámeros a los moldes de ARN; 45min. a  $42^{\circ}\text{C}$ , para la síntesis del ADNc y 5min. a  $99^{\circ}\text{C}$  para inactivar la reverso transcriptasa. El producto obtenido fue utilizado para realizar la síntesis de la segunda hebra de ADN como se explica en la siguiente sección.

### **Amplificación por PCR**

#### ***Obtención de los genes variables.***

La amplificación de los genes variables y el unidor se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para realizar la reacción de PCR se preparó una mezcla de 20 $\mu\text{L}$  por reacción que contenía 1X de solución amortiguadora para Vent ADN polimerasa (10mM de KCl, 10mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20mM de Tris-HCl pH 8.8, 2mM de  $\text{MgSO}_4$ , 0.1% de Triton X-100), 2.5mM de una mezcla de nucleótidos trifosfatos (dNTP) y 0.8U de enzima Vent ADN polimerasa (NEB) la cual es una polimerasa de alta fidelidad. A la mezcla se

le añadieron 10pmol/reacción de oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada gen. En la tabla 1 se describen las secuencias de los oligonucleótidos y el gen amplificado en cada caso. Las condiciones de la reacción en el caso de la amplificación de los genes variables pesados fueron las siguientes: 4min. a 94°C; 25 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. a 57°C y 1min. a 72°C; 10min. a 72°C.

Para la amplificación de los genes variables ligeros A27 y A27mod se tomaron como templado los plásmidos X4-A27 y X4-A27mod respectivamente. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 4min. a 94°C; 25 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. a 56°C y 1min. a 72°C; 10min. a 72°C.

Además se sintetizó un unidor compuesto de una serina (S) y cuatro glicinas (G) y repetidas tres veces (SG<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. En este caso se utilizó como templado el plásmido X4-A27 y las condiciones de reacción fueron las siguientes: 4min. a 94°C; 25 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. a 50°C y 1min. a 72°C; 10min. a 72°C.

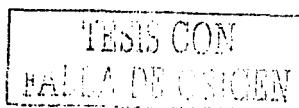
En todos los experimentos se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el ADN molde. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa 2% para verificar su tamaño y concentración.

#### ***Obtención de los scFvs***

Los fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs) fueron obtenidos por PCR sobrelapado a partir de los genes variables y el unidor. Para la reacción de PCR se preparó una mezcla de ADN que contenía: 175ng de los genes V<sub>H</sub>S, 150ng de los genes V<sub>L</sub> y 60ng del unidor. A la mezcla de ADN se adicionó 1X de solución tamponada para PCR con Vent ADN polimerasa, 2.5mM de dNTP y 0.8U de Vent ADN polimerasa. El volumen de la mezcla final fue de 25μL. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 8 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. a 64°C y 1min. a 72°C; 25 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. a 55°C y 1min. a 72°C y 1 ciclo de 10min. a 72°C. Los oligonucleótidos fueron añadidos después de los 8 primeros ciclos y sus secuencias son listadas en la tabla 1.

#### ***Introducción de sitios para enzimas de restricción.***

Con el objetivo de introducir sitios para las enzimas de restricción Sfi I y Not I, los scFv fueron sometidos a una reacción de PCR. Para realizar la reacción de PCR se preparó una mezcla de 25μL que contenía: 1X de solución amortiguadora para PCR, 2.5mM de dNTPs, 0.8U de Vent ADN polimerasa y 10pmol de cada uno de los oligonucleótidos conteniendo sitios



para las enzimas de restricción Sfi I y Not I (ver secuencias en la tabla 1). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 25 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. a 55°C y 1min. a 72°C y 1 ciclo de 10min. a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa 1.6% para comprobar su tamaño y concentración.

Los productos de PCR en cada caso fueron purificados por medio de un juego para purificación de la compañía Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit, No. Cat. 28706).

En la Figura 6 se muestra un esquema representativo de la construcción de los scFv en cada caso.

### **Digestión de los scFvs**

Los scFv fueron digeridos con las enzimas de restricción Sfi I y Not I para su posterior clonación en el vector fagémido pSyn2 el cual fue digerido, previamente, con las mismas enzimas.

Para la reacción de digestión con la enzima Not I se preparó una mezcla de 200µL que contenía: 1X de solución amortiguadora para la enzima Not I (NEB buffer 3: 100mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 7.9, 10mM de MgCl<sub>2</sub> y 1mM de DTT), 10U de enzima Not I (NEB), 1X de BSA y el ADN correspondiente. La digestión se llevó a cabo por 4h. a 37°C. El producto digerido con la enzima fue purificado (QIAquick Gel Extraction Kit, No. Cat. 28706) y digerido con la enzima Sfi I (NEB). Para la digestión con la enzima Sfi I se preparó una mezcla de 200µL que contenía: 1X de solución amortiguadora para enzima Sfi I (NEB buffer 2: 100mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 7.9, 10mM de MgCl<sub>2</sub> y 1mM de DTT), 10U de enzima Sfi I (NEB), 1X de BSA y el ADN correspondiente. La digestión se llevó a cabo por 4h a 50°C. El producto digerido con ambas enzimas se purificó (QIAquick Gel Extraction Kit, No. Cat. 28706). El producto purificado se separó en un gel de agarosa 1.6% para verificar su concentración y calidad. Las condiciones para la digestión del vector fueron similares. En la Figura 7 se muestra un esquema representativo de la obtención de fago-anticuerpos el cual incluye el paso de digestión.

### **Clonación de los scFv en pSyn2.**

Los scFv digeridos fueron clonados en el vector pSyn2 (Figura 7). Para la reacción de ligación se preparó una mezcla de 1mL que contenía: 1X de solución amortiguadora (50mM de Tris-HCl pH 7.5, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de DTT, 1mM de ATP y 25µg/mL de BSA) y 100U de enzima ligasa (NEB). A la mezcla se añadió ADN del vector y los scFv en una relación molar



de 1:3 (250ng de vector/150ng de cada scFv). La mezcla se incubó por 4h a TA. El producto ligado fue purificado (QIAquick Gel Extraction Kit, No. Cat. 28706) y utilizado para los experimentos de transformación.

#### **Transformación de las bibliotecas.**

Las construcciones fueron transformadas por electroporación en la cepa de *E. coli* XL-1blue (Figura 7). Se realizaron un total de 10 electroporaciones en cubetas para electroporar de 0.1 mm de separación entre las placas (Biorad). En cada electroporación se mezclaron 50 $\mu$ L de células mas 10 $\mu$ L de ADN. La eficiencia de transformación, así como, el tamaño de las bibliotecas se determinó por titulación (número total de colonias independientes).

#### **Obtención del Fago Helper (M13/KO7).**

Para la preparación del fago helper se utilizaron células XL1Blue. En un primer paso las células fueron crecidas en medio SB (triptona, extracto de levadura y NaCl pH 7.5) e infectadas con fago helper M13/KO7 comercial (Pharmacia Biotech). Después de la infección el cultivo fue crecido toda la noche. A continuación se precipitaron las células por centrifugación y el sobrenadante conteniendo los fagos fue sometido a dos precipitaciones con PEG/NaCl (20%/2.5M). Los fagos precipitados fueron resuspendidos en TBS1X (150mM de NaCl y 50mM de Tris pH) y calentados a 70°C para eliminar los restos de células. Los fagos fueron almacenados en 15% de glicerol a -20°C.

Una vez purificado el fago helper M13/KO7 fue titulado por infección de un cultivo celular (XL1Blue) saturado. El título obtenido fue de 1x10<sup>11</sup> UFP/mL.

#### **Rescate de las bibliotecas como fago-anticuerpos**

El fago M13/KO7 fue utilizado para la infección de un cultivo celular de XL1 Blue previamente transformado con cada una de las bibliotecas. Se empleó una relación final de 10<sup>13</sup> UFC de M13/KO7/mL de cultivo (D.O.<sub>600nm</sub> 0.7-0.9). Los fagos fueron sometidos a dos precipitaciones con 20%/2.5M de PEG/NaCl. Los fagos precipitados fueron utilizados para las rondas de selección. El protocolo se repitió para cada una de las rondas de selección (4).

#### **Caracterización de las bibliotecas por "fingerprinting" y secuenciación.**

La calidad de los repertorios se determinó por "fingerprinting" y secuenciación de un conjunto de clonas seleccionadas al azar. Los oligonucleótidos utilizados para secuenciar se describen en la tabla 1. Para el ensayo de "fingerprinting" se amplificaron por PCR los scFvs de clonas seleccionadas al azar de cada una de las bibliotecas originales y de las clonas

TESIS CON  
TALLA DE ORIGEN

positivas después de la cuarta ronda de selección. Los fragmentos obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción de corte frecuente BstN I. De esta manera se puede obtener un patrón de corte de ADN para cada una de las secuencias diferentes y tener idea de la diversidad de cada una de las bibliotecas.

De cada una de las bibliotecas se seleccionaron 30 clonas para llevar a cabo un análisis de las mismas por secuenciación.

### **Selección.**

Los fago-anticuerpos correspondientes a cada una de las bibliotecas fueron utilizados para realizar rondas de tamizado contra diferentes antígenos de interés biomédico. Se emplearon 4 ligandos diferentes, dos de ellos son toxinas de alacrán y el tercero es una toxina de viuda negra. Además se utilizaron espermatozoides murinos. En todos los casos se efectuaron cuatro rondas de selección con el objetivo de encontrar dentro de nuestras bibliotecas anticuerpos específicos contra los diferentes antígenos.

Entre las toxinas de alacrán utilizadas se encuentran la Cn2 de *Centruroides noxius* y la toxina de *Centruroides limpidus limpidus* CII1. Esta última constituye la especie más peligrosa de México ya que aun cuando no es la más tóxica co-habita con los seres humanos.

Además se utilizó la región amino (primeros 450 a.a.) de la toxina de viuda negra  $\alpha$ -latrotoxina (LTX). Se utilizó solo esta región porque se ha reportado que anticuerpos contra esta región son capaces de neutralizar, al menos parcialmente, la acción tóxica del veneno completo (solicitud de patente No. PCT/MX00/00048).

Para el caso de las toxinas, la selección se realizó como sigue. En inmunotubos de 4 mL se incubaron las toxinas a temperatura ambiente (TA) toda la noche en una solución amortiguadora de 50mM de bicarbonato de sodio pH 9.6. Al día siguiente los tubos fueron incubados por 2h con leche descremada 2% en PBS 1X (MPBS 2%) para bloquear los espacios no cubiertos por las toxinas. A continuación se realizó una incubación de 1h a 37°C con  $10^{13}$  partículas de fago conteniendo los fragmentos de anticuerpos desplegados en su superficie (fago-anticuerpos). Los fago-anticuerpos unidos al antígeno fueron eluidos con 100mM de Trietilamina (TEA) y utilizados para rondas sucesivas de selección (4). En cada ronda la concentración de antígeno fue disminuida a la mitad para así seleccionar aquellos fago-anticuerpos con mayor afinidad por cada uno de los antígenos (Tabla 3).

Para el caso de los espermatozoides murinos seguimos un esquema de selección diferente. El objetivo, en este caso, era seleccionar anticuerpos que reconocieran moléculas que se expresan después de la capacitación de los espermatozoides. La selección se realizó como sigue: los espermatozoides fueron extraídos del epidídimo de ratones BALB/c y antes de su capacitación fueron incubados por 1h con  $10^{12}$ - $10^{13}$  fago-anticuerpos procedentes de cada una de las bibliotecas. Los fago-anticuerpos unidos a espermatozoides no capacitados fueron eliminados por centrifugación a 4 000 rpm por 10min.. Los fago-anticuerpos libres en el sobrenadante se utilizaron para una segunda incubación durante 1h a TA en presencia de espermatozoides murinos capacitados. Los fago-anticuerpos unidos a los espermatozoides capacitados fueron eluidos con 100mM de TEA y utilizados para rondas sucesivas de selección (4). El número de células utilizadas para cada ronda de selección en el caso de los espermatozoides estuvo entre  $10^6$ - $10^8$ . Los resultados de la selección contra los espermatozoides son mostrados en la tabla 4.

En todos los casos, al final de cada ronda de selección los fagos recuperados fueron titulados por infección de un cultivo de células XL1Blue crecidas en su fase exponencial.

#### **Estudio por ELISA de los anticuerpos seleccionados en cada ronda.**

Con el objetivo de analizar el comportamiento de la especificidad, los anticuerpos policlonales obtenidos después de cada ronda de selección fueron analizados por su capacidad de unión al antígeno contra el cual fueron seleccionados.

Para seleccionar anticuerpos monoclonales con especificidad contra cada uno de los antígenos, se ensayaron los anticuerpos producidos por clones independientes provenientes de la cuarta ronda de selección.

En ambos casos los anticuerpos fueron ensayados como fago-anticuerpos y como anticuerpos solubles. Los ensayos de ELISA fueron llevados a cabo como se explica a continuación.

#### ***ELISAs policlonales.***

Los ELISAs policlonales se llevaron a cabo como anticuerpos solubles y fago-anticuerpos. En ambos casos placas de ELISA (Nunc) de 96 pozos fueron cubiertas con  $5\mu\text{g/mL}$  de antígeno en 50mM de bicarbonato de sodio pH 9.6 e incubadas toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Al día siguiente las placas fueron lavadas y bloqueadas con 0.5% de gelatina (BIORAD) en PBS 1X + 0.2% de tween 20 durante 2h a  $37^\circ\text{C}$ . A las placas bloqueadas se les añadieron  $10^{10}$

fago-anticuerpos precipitados con PEG/NaCl (20%/2.5M) o sobrenadante de cultivo conteniendo anticuerpos solubles. Las placas fueron incubadas por 1h a 37°C en ambos casos. Las placas conteniendo fago-anticuerpos fueron incubadas entonces con anticuerpo anti-M13 conjugado con la enzima peroxidasa (anti-M13-HRP). Las placas con anticuerpos solubles fueron incubadas con el anticuerpo de ratón anti-c-myc, seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa (anti-mouse-HRP). En ambos casos se utilizó como sustrato para la enzima el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y como aceptor de electrones la ortofenilendiamina (OPD). La reacción fue detenida con HCl 6N y las placas leídas en lector para placas de ELISA a una longitud de onda de 492nm.

Para la obtención de los anticuerpos solubles un cultivo celular de XL1 Blue fue infectado con fago-anticuerpos provenientes de cada una de las rondas de selección. Las placas crecidas después de la infección fueron incubadas en medio de cultivo YT2X en presencia de antibióticos (ampicilina 200 µg/mL y tetraciclina 10 µg/mL) y glucosa (2%) hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.9. Los cultivos fueron inducidos entonces toda la noche con IPTG 1mM. Los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación (conteniendo anticuerpos solubles) fueron utilizados para el ELISA. Los resultados de los ELISAs policlonales se muestran en la Figura 10.

#### ***ELISAs monoclonales.***

Los ELISAs monoclonales fueron realizados con las mismas condiciones que los policlonales pero tomando clonas independientes. Estas fueron crecidas en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc) e infectadas con fago helper M13/KO7 para producir partículas de fago-anticuerpos o inducidas con IPTG 1M para producir anticuerpos solubles.

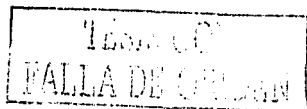
En las figuras 11,12 y 13 se muestran los resultados de los ELISAs monoclonales.

#### ***ELISAs de reactividad cruzada.***

Las clonas positivas fueron sometidas a un ELISA contra diferentes antígenos para determinar su especificidad. Para el ensayo fueron empleados los siguientes antígenos: gelatina, leche descremada, albúmina de suero bovino (BSA), tripsinógeno, CII1, CII2, Cn2 y α-NH2-latrotoxina. Todos los antígenos fueron empleados a una concentración de 5µg/mL y los ELISAs fueron realizados como se explica anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 12.

**Estudio del efecto de los fago-anticuerpos sobre la reacción acrosomal.**

Para determinar el efecto de los scFv seleccionados contra espermatozoides murinos capacitados sobre la reacción acrosomal, fago-anticuerpos policlonales procedentes de 1<sup>ra</sup> y 4<sup>ta</sup> ronda de selección contra espermatozoides fueron adicionados al medio de capacitación conteniendo espermatozoides. Después de 30 minutos los espermatozoides fueron fijados para el conteo de aquellos que sufrieron reacción acrosomal. Los resultados se muestran en la tabla 4.



## **RESULTADOS**

Según los objetivos, el trabajo se dividió en cuatro etapas:

### **1. Diseño y construcción de las bibliotecas.**

El diseño de las bibliotecas se llevó a cabo teniendo en cuenta nuestra hipótesis de trabajo. Se construyeron dos bibliotecas en formato de fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Ambas bibliotecas poseen una mezcla de los genes que codifican para las cadenas variables pesadas de humano. Una de ellas posee la cadena ligera kappa A27 y la otra posee una variante de A27 donde se sustituye el L1 por el del gen variable ligero kappa DPK24. Las bibliotecas fueron posteriormente clonadas en un vector fagémido y expresadas en la superficie del fago M13/KO7 asociadas a la proteína pIII como proteína de fusión. En las figuras 6 y 7 se muestran dos esquemas que resumen las estrategias generales utilizadas para la construcción de las bibliotecas y para el despliegue en fago de las mismas, respectivamente.

### **2. Caracterización de las bibliotecas por "fingerprinting" y secuenciación.**

La diversidad de las bibliotecas originales y de las clonas seleccionadas después de la cuarta ronda de selección fue analizada por "fingerprinting". Para este fin se amplificaron por PCR los scFv de clonas seleccionadas al azar de cada una de las bibliotecas originales y de las clonas positivas después de la cuarta ronda de selección. Los fragmentos obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción de corte frecuente BstN I. De esta manera se puede obtener una huella de ADN para cada una de las secuencias diferentes y tener idea de la diversidad de cada una de las bibliotecas. Además se puede determinar de las clonas positivas cuales son diferentes.

De cada una de las bibliotecas originales se seleccionaron 30 clonas para llevar a cabo un análisis de las mismas por secuenciación. Las clonas que dieron positivas por ELISA fueron analizadas por "fingerprinting" y secuenciación.

### **3. Selección de anticuerpos contra antígenos variados.**

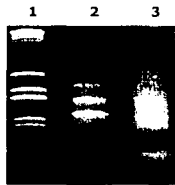
Los fago-anticuerpos obtenidos en cada caso fueron sometidos a varias rondas de selección con 4 antígenos diferentes. La selección de los antígenos se realizó teniendo en cuenta que fuesen de interés biomédico y estuviesen disponibles. La selección se llevó a cabo en inmunotubos con cada uno de los antígenos adheridos a su superficie. En todos los casos partimos de una concentración de antígeno de 100µg y la misma fue reducida en cada ronda de selección a la mitad para así obtener, cada vez, anticuerpos con mayor afinidad.

#### 4. Caracterización de los anticuerpos.

De las clonas obtenidas después de la cuarta ronda de selección se escogieron algunas clonas al azar para producir anticuerpos solubles y fago-anticuerpo los cuales fueron evaluados por ELISA para determinar su capacidad de reconocimiento. Los anticuerpos positivos en cada caso fueron utilizados para realizar un ensayo de reactividad cruzada y así determinar su especificidad.

#### Obtención de los ARNs.

El ARN fue obtenido a partir de células de sangre periférica de cinco individuos sanos como se explica en la sección de Metodología. En cada caso los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa 0.6% para verificar la integridad del ARN. En la Figura 3 se muestra el resultado de un gel representativo. En el primer carril se puede ver el marcador de peso molecular. En el carril 2 se muestra un ARN sintético utilizado como control positivo. En el carril 3 se muestra un resultado típico de los ARN obtenidos por el método de aislamiento descrito en la sección de metodología.

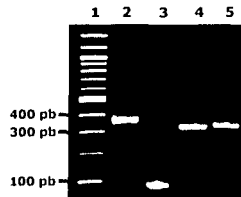


**Figura 3.** Aislamiento y purificación de los ARNs. En la figura se muestra el producto obtenido después de la purificación de los ARNs. 1. marcador 1kb plus (para ADN), 2. ARN sintético control y 3. ARN de trabajo. Se utilizó un marcador de ADN para tener una idea de cómo migra el ARN. El ARN debe migrar a 1600 pb pero migra ligeramente más abajo. Esto es esperado ya que es simple cadena.

#### Amplificación de los segmentos variables.

Los genes variable pesados fueron amplificados por RT-PCR a partir del ARN. La transcripción reversa de los ARNs se llevó a cabo como se explica en la sección de Metodología. Los genes variables ligeros A27 y A27mod fueron obtenidos por PCR a partir de los plásmidos X4-A27 y X4-A27mod como se explica en la sección de Metodología. El péptido unidor fue obtenido por PCR a partir del plásmido X4-A27 como se explica en la sección de Metodología. En cada caso los productos amplificados y purificados fueron separados en un gel de agarosa 2% para comprobar su talla y calidad. En la Figura 4 se

muestra el resultado del gel. En el carril 1 se encuentra el marcador 100 pb (NEB). En el carril 2 se puede observar el producto de la mezcla de genes  $V_H$ . En el carril 3 se observa el péptido unidor. En el carril 4 y 5 se puede observar los genes  $V_L$  A27 y A27mod respectivamente. Todos los productos obtenidos poseen el tamaño esperado. Entre los genes A27 y A27mod se observa la diferencia esperada en cuanto al tamaño, teniendo en cuenta que el gen A27mod es 15 pb más grande que el gen A27.



**Figura 4.** Amplificación de los genes variables por PCR. En la figura se muestran los productos de los genes variables y del péptido unidor. Se puede apreciar el tamaño de cada gen la cual concuerda con la esperada. 1. Marcador de peso molecular (100 pb), 2. Mezcla de genes  $V_H$ , 3. Péptido unidor, 4. Gen  $V_L$  A27 y 5. Gen  $V_L$  A27mod.

### Ensamble de los scFvs

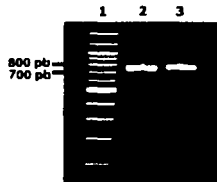
Una vez amplificados los genes variables fueron ensamblados por PCR sobrelapado para obtener dos mezclas de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). Uno de ellas va a tener el gen ligero A27 mientras la otra va a tener el A27mod. En ambos casos el gen ligero se puede combinar con cualquiera de los genes  $V_H$  contenidos en la mezcla. De esta manera se obtuvieron dos bibliotecas. En cada una de ellas el péptido unidor (SGly<sub>4</sub>)<sub>3</sub> se encuentra separando los genes  $V_H$  de los  $V_L$ .

Una vez ensamblados los scFv fueron utilizados como templado para un PCR donde se introdujeron los sitios para las enzimas de restricción Sfi I y Not I. Los protocolos utilizados se describen en la sección de Metodología.

En la Figura 5 se muestran los scFv ensamblados y con sitios para enzimas de restricción Sfi I y Not I. La talla de los productos corresponde con la esperada. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 100 pb (NEB). En el carril 2 se muestra la mezcla de scFv que contiene el gen ligero A27 ( $V_H$ -A27) y en el carril 3 el correspondiente al A27mod ( $V_H$ -A27mod).

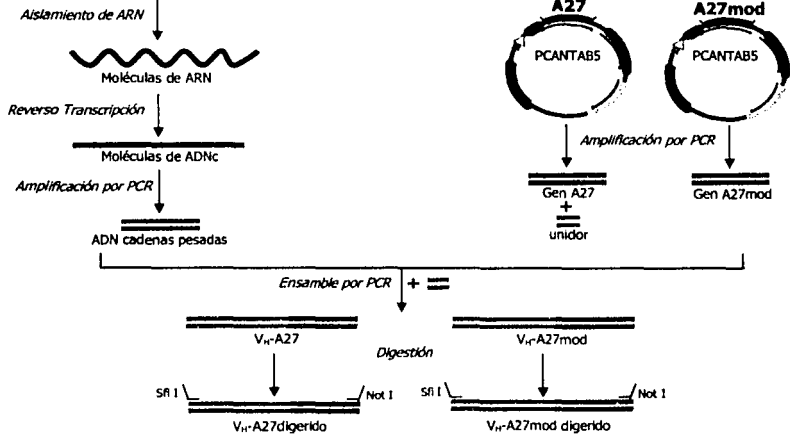


El proceso completo de obtención de los scFv con sitios para enzimas de restricción se esquematiza en la figura 6. Se señalan cada uno de los pasos seguidos cuyos protocolos se detallan en la sección de Metodología.



**Figura 5. Ensamble de los scFv.** En la figura se muestran los productos de ensamble ( $V_H$ -A27 y  $V_H$ -A27mod). Se puede apreciar tamaño de cada scFv el cual concuerda con la esperada. 1. Marcador de peso molecular (100 pb), 2.  $V_H$ -A27 y 3.  $V_H$ -A27mod.

**Células de Sangre periférica de individuos sanos**



**Figura 6. Construcción de los scFv.** En el esquema se representa el proceso de obtención de los scFv para la construcción de las bibliotecas.

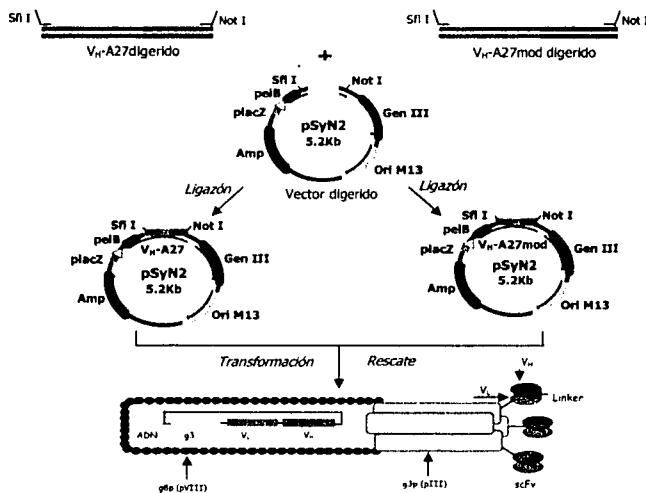
**Digestión, Clonación y Transformación.**

Los scFv fueron digeridos con las enzimas de restricción Not I y Sfi I para su posterior

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

clonación en el vector fagémido pSyn2 el cual fue digerido previamente con las mismas enzimas. En la Figura 7 se muestra un resumen de la estrategia empleada la cual se detalla en la sección de Metodología. La figura muestra algunos de los componentes principales del vector.

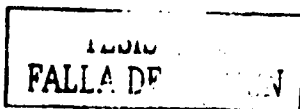
Cada una de las construcciones fue utilizada para transformar células electrocompetentes XL-1Blue las cuales presentaron una eficiencia de transformación de  $1.0 \times 10^9$  UFP/10ng de pUC18. El tamaño de las bibliotecas fue determinado por titulación en placas de cultivo conteniendo YT2X + ampicilina 200 $\mu$ g/mL + Tetraciclina 12.5 $\mu$ g/mL + Glucosa 2%. En el caso de la biblioteca  $V_H$ -A27mod se obtuvieron  $6 \times 10^7$  UFC y en el caso de la biblioteca  $V_H$ -A27 se obtuvieron  $1.0 \times 10^8$  UFC. En ambos casos se utilizó una preparación de vector que posee menos de 1% de vector simple digerido.



**Figura 7. Construcción de las bibliotecas.** En la figura se muestra una representación de los pasos desde la clonación hasta la expresión de los scFv como fago-anticuerpos.

#### Determinación de la variabilidad por "fingerprinting" y secuenciación.

Una vez que las construcciones fueron transformadas en XL1 Blue se seleccionaron 50 clones



al azar para llevar a cabo un análisis de la variabilidad. Para esto se amplificaron los scFv de 50 clonas de cada biblioteca elegidas al azar por PCR.

En el caso de la biblioteca  $V_H$ -A27 48/50 clonas presentaron un inserto de la talla correcta. Las dos clonas restantes dieron un fragmento con una talla correspondiente al inserto original del vector (4%) (Tabla 2). De los 48 scFv de talla correcta se seleccionaron 30 para realizar un análisis de digestión con la enzima de restricción BstN I. De las 30 clonas analizadas se obtuvieron 17 patrones de digestión diferentes. Hay un patrón de digestión que se repite 7 veces (23%), un segundo patrón que se repite 3 veces (10%), un tercer patrón que se repite 4 veces (13%) y un cuarto patrón que se repite 3 veces (10%). El análisis por secuencia de las 30 clonas confirmó la presencia de 21 scFvs diferentes. Se determinó que solo 5 de las clonas con el patrón reiterativo eran idénticas (16%) y que pertenecen a la familia  $V_H1$ ; mientras que las otras dos son diferentes. Del patrón que se repite 4 veces, solo dos clonas son iguales. Las otras dos también son diferentes.

En el caso de la biblioteca  $V_H$ -A27mod 49/50 clonas presentaron un inserto de la talla correcta. La clona restante posee un fragmento con una talla correspondiente al inserto original del vector (2%) (Tabla 2). De los 49 scFv de talla correcta se seleccionaron 30 para realizar un análisis de digestión con la enzima de restricción BstN I. De las 30 clonas analizadas se distinguen 28 patrones de digestión diferentes. Solo hay un par de clonas que presentan el mismo patrón. El análisis por secuencia de estas clonas confirmó el resultado anterior. Las dos clonas con el mismo patrón tienen la misma secuencia y también pertenecen a la familia  $V_H1$ .

En la tabla 2 se resumen los resultados del "fingerprinting" y el análisis de secuencia.

Biblioteca	No de Clonas analizadas PCR	No de Clonas analizadas Restricción	No de Clonas con inserto	Clonas Diferentes por Restricción	Clonas Diferentes por secuencia
$V_H$ -A27	50	30	48	17	21
$V_H$ -A27mod	50	30	49	28	28

**Tabla 2.** Resumen de los resultados del análisis de las bibliotecas por "fingerprinting" y secuenciación. En la tabla se resumen los resultados obtenidos después del análisis de las bibliotecas por "fingerprinting" y secuenciación. Se señalan el número de clonas analizadas por cada uno de los métodos así como el número de clonas diferentes.

Además, el análisis de secuencia reveló que en ambas bibliotecas el péptido unidor y el gen ligero poseen una secuencia correcta (Figura 8). También aparecen los sitios para enzimas de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## restricción introducidos por PCR.

```

S G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P G T
TCAGGTGGAGGGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCAC
→                péptido unidor                ←→                gen A27mod

L S L S P G E R A T L S C R S S Q S V L Y S S N N K
CCTGTCTTTGTCCACCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGTCACGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAAACAATAA
                                CDR1

N Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T
GAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGCCAC
                                CDR2

G I P N R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F
TGGCATCCAAACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT
A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K R A
TTGCAGTGTATTACTGTCCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGGACGTTGGCCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGT GC
                                CDR3
A A E Q K L I S E E D L N G A A *
GGCCGC AGAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGCGCCGA TAG
Not I          c-myc tag          codón ámbar

```

**Figura 8.** Secuencia del péptido unidor y del gen A27mod. En la figura se observa la secuencia del péptido unidor formada por una secuencia de una serina (S) y cuatro glicinas (G) repetidas cuatro veces. Además se puede apreciar la secuencia del gen A27mod. Los CDRs aparecen subrayados. El CDR1 pertenece al gen VK DPK24, el cual es el segundo más expresado después de A27 "in vivo" (Griffiths et al., 1994). En el caso del gen A27 la secuencia sería idéntica a la mostrada en la figura con excepción del CDR1 que tendría la siguiente secuencia de aminoácidos: **RASQSVSSSYLA**.

**Selección.**

Las células transformadas fueron crecidas y posteriormente rescatadas con el fago M13/KO7. De esta manera los scFv fueron desplegados sobre la superficie del fago M13 como fago-anticuerpos. Los fago-anticuerpos fueron utilizados para realizar cuatro rondas de selección contra diferentes antígenos.

Los antígenos se escogieron siguiendo tres criterios: i) que tengan características tales que permitan probar nuestra hipótesis de trabajo, ii) su importancia desde el punto de vista biomédico y iii) la disponibilidad de los mismos. Dentro de los antígenos empleados para la selección se encuentran 3 toxinas. Dos de estas son toxinas de alacrán y la tercera es una toxina de la araña viuda negra ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina). Dentro de las toxinas de alacrán se encuentran: *Centruroides noxius* (Cn2) y *Centruroides limpidud-limpidus 1* (Cl1). En el caso de viuda negra fue empleada la región amino de la  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina ya que se ha descrito que esta región es la responsable de la toxicidad del veneno.

Ambas bibliotecas fueron retadas contra todos los antígenos. En la Tabla 3 se muestran los resultados de cada una de las rondas de selección contra las diferentes toxinas. En la tabla se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

destacan los fagos de inicio y finales así como la concentración de antígeno empleada. En cada ronda se fue reduciendo a la mitad la cantidad de antígeno para así recuperar anticuerpos de mayor afinidad cada vez.

En la tabla 3 se observa que no en todos los casos el número de clonas aumentó con la ronda de selección. Este resultado podría estar dado porque en cada ronda de selección se redujo a la mitad la concentración de antígeno.

Además, las bibliotecas fueron retadas contra espermatozoides murinos capacitados con el fin de encontrar anticuerpos capaces de inhibir la reacción acrosomal. En la Tabla 4 se muestran los resultados de este experimento. El protocolo seguido para la selección se detalla en la sección de Metodología.

Los fago-anticuerpos obtenidos después de la 1<sup>ra</sup> y 4<sup>ta</sup> ronda fueron utilizados para determinar su efecto sobre la reacción acrosomal de espermatozoides murinos como se explica en la sección de Metodología. Como se observa en la tabla 4 no hay inhibición de la reacción acrosomal en ningún caso. Existe una diferencia en cuanto a la inducción de la reacción acrosomal de entre 8-9% entre la 1<sup>ra</sup> y la 4<sup>ta</sup> ronda. Sin embargo, no es una diferencia significativa. En todo caso tenemos el fenómeno inverso: a medida que aumenta la ronda de selección mayor es la inducción de la reacción acrosomal.

Aun cuando no se obtuvo el efecto esperado sobre la reacción acrosomal, de este experimento se pudo sacar un resultado interesante. La incubación de los espermatozoides con los fago-anticuerpos provoca una pérdida de la motilidad de los mismos. Esta, es dependiente del tiempo de incubación y ocurre en más de un 90%. El por ciento de inhibición se conserva aun cuando se utilizan proporciones de fago-anticuerpo/espermatozoides de 1:1. Para determinar si la inmovilización de los espermatozoides era un fenómeno que estaba mediado por alguna proteína del fago o por el anticuerpo desplegado en la superficie del mismo se llevó a cabo un segundo experimento. En este caso se realizaron incubaciones con el fago ayudador M13/KO7 y se obtuvo el mismo resultado. Aun en una relación 1:1 de fago/espermatozoides ocurre una inmovilización de más del 90% de estos últimos.

Biblioteca	Ronda	Fagos de inicio	Fagos finales	Antígeno ( $\mu\text{g}$ )
<i>Anti-Cr2</i>				
$V_H$ -A27mod	1	$4.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$7.5 \times 10^5$ UFC/mL	100
	2	$5.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1.1 \times 10^5$ UFC/mL	50
	3	$8.2 \times 10^{12}$ UFC/mL	$2.3 \times 10^4$ UFC/mL	25
	4	$5.8 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1.2 \times 10^4$ UFC/mL	12.5
$V_H$ -A27	1	$2.0 \times 10^{13}$ UFC/mL	$1.2 \times 10^6$ UFC/mL	100
	2	$6.8 \times 10^{10}$ UFC/mL	$3.6 \times 10^4$ UFC/mL	50
	3	$4.7 \times 10^{11}$ UFC/mL	$6.6 \times 10^5$ UFC/mL	25
	4	$2.5 \times 10^{12}$ UFC/mL	$6.4 \times 10^4$ UFC/mL	12.5
<i>Anti-CII1</i>				
$V_H$ -A27mod	1	$4.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$4.9 \times 10^5$ UFC/mL	50
	2	$7.1 \times 10^{12}$ UFC/mL	$5.0 \times 10^5$ UFC/mL	25
	3	$1.0 \times 10^{13}$ UFC/mL	$6.6 \times 10^5$ UFC/mL	12.5
	4	$7.1 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1.1 \times 10^5$ UFC/mL	7
$V_H$ -A27	1	$2.0 \times 10^{13}$ UFC/mL	$2.0 \times 10^7$ UFC/mL	50
	2	$1.0 \times 10^{11}$ UFC/mL	$2.6 \times 10^5$ UFC/mL	25
	3	$2.7 \times 10^{11}$ UFC/mL	$2.8 \times 10^4$ UFC/mL	12.5
	4	$2.2 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1.3 \times 10^5$ UFC/mL	7
<i>Anti-<math>\alpha</math>-NH2 latrotoxina</i>				
$V_H$ -A27mod	1	$4.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$3.2 \times 10^4$ UFC/mL	100
	2	$5.8 \times 10^{12}$ UFC/mL	$4.0 \times 10^5$ UFC/mL	50
	3	$5.8 \times 10^{12}$ UFC/mL	$3.7 \times 10^6$ UFC/mL	25
	4	$7.5 \times 10^{12}$ UFC/mL	$5.8 \times 10^6$ UFC/mL	12.5
$V_H$ -A27	1	$2.0 \times 10^{13}$ UFC/mL	$9.4 \times 10^6$ UFC/mL	100
	2	$5.6 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1.7 \times 10^7$ UFC/mL	50
	3	$7.8 \times 10^{12}$ UFC/mL	$2.0 \times 10^6$ UFC/mL	25
	4	$4.8 \times 10^{12}$ UFC/mL	$4.2 \times 10^6$ UFC/mL	12.5

UFC: unidades formadoras de colonias

**Tabla 3.** Rondas de selección de ambas bibliotecas contra las diferentes toxinas. En la tabla se muestran los datos de cada una de las rondas de selección contra las diferentes toxinas para cada biblioteca. Se destacan los fagos de inicio y los fagos finales en cada ronda así como la concentración de antígeno empleada en cada caso.

Biblioteca	Ronda	Fagos de inicio	Fagos finales	% Reacción Acrosomal
<i>Anti-espermatozoides</i>				
$V_H$ -A27mod	1	$4.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$3.0 \times 10^5$ UFC/mL	86
	2	$6.8 \times 10^{12}$ UFC/mL	$4.5 \times 10^6$ UFC/mL	-
	3	$6.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$7.5 \times 10^6$ UFC/mL	-
	4	$4.5 \times 10^{12}$ UFC/mL	$3.0 \times 10^5$ UFC/mL	95
$V_H$ -A27	1	$2.0 \times 10^{13}$ UFC/mL	$3.0 \times 10^5$ UFC/mL	89
	2	$3.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$2.1 \times 10^5$ UFC/mL	-
	3	$5.2 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1.2 \times 10^6$ UFC/mL	-
	4	$4.0 \times 10^{12}$ UFC/mL	$8.8 \times 10^6$ UFC/mL	97

UFC: unidades formadoras de colonias

**Tabla 4.** Rondas de selección de ambas bibliotecas contra espermatozoides murinos. En la tabla se muestran los datos de cada una de las rondas de selección contra espermatozoides murinos para cada biblioteca. Se destacan los fagos de inicio y los fagos finales en cada ronda así como el por ciento de espermatozoides que sufren reacción acrosomal en presencia de los anticuerpos.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

### **ELISAS policlonales.**

Para demostrar el enriquecimiento de anticuerpos específicos recuperados después de cada ronda de selección, se llevaron a cabo ELISAs de las preparaciones policlonales. Los ELISAs se realizaron como fago-anticuerpos y como anticuerpos solubles. La metodología empleada en cada caso se detalla en la sección de Metodología. Los resultados de los ELISA como anticuerpos solubles para cada caso se muestran en la figura 9.

En el panel A se muestran los resultados del ELISA contra Cn2. En el panel B se representan los resultados del ELISA contra CII1. En el panel C se muestran los resultados del ELISA contra la  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina. En el lado izquierdo de la figura se muestran los valores para la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod y en el lado derecho los de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27. Las barras en violeta pertenecen a los controles negativos y las barras en rojo a las muestras analizadas. Los resultados representan la media de al menos tres experimentos independientes.

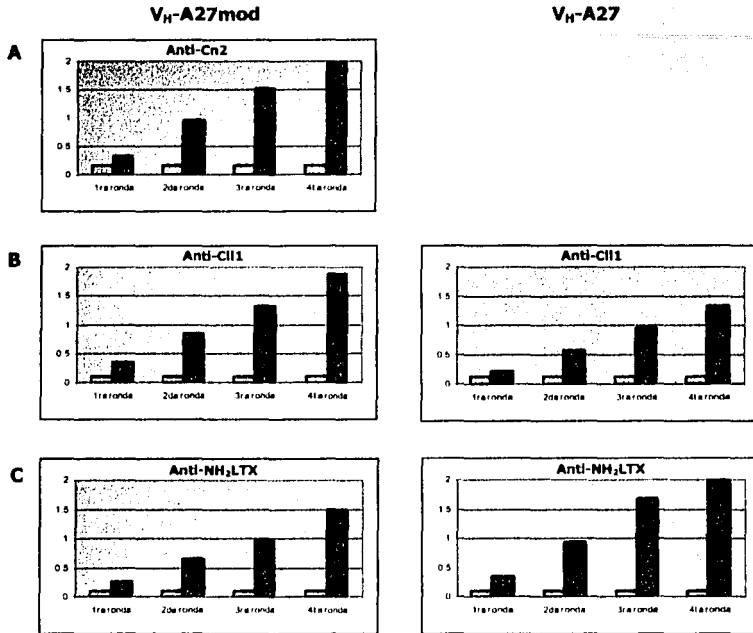
Como se observa en la Figura 9, a medida que aumenta la ronda de selección, se observa una mejor señal de ELISA. Además, aunque para ambas bibliotecas se seleccionaron anticuerpos contra CII1 y  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina, se observan diferencias en los valores de D.O.<sub>492nm</sub>. Para CII1 los anticuerpos policlonales seleccionados a partir de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod muestran mayores valores de D.O.<sub>492nm</sub> que los anticuerpos policlonales seleccionados a partir de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 (panel B). Sin embargo, los anticuerpos seleccionados contra la  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina a partir de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 muestran mayores valores de D.O.<sub>492nm</sub> que los seleccionados a partir de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod (panel C). En el caso de Cn2 solo se obtuvieron anticuerpos a partir de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod (panel A) ya que en el caso de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 hubo una contaminación que no permitió seleccionar ningún anticuerpo interesante.

### **ELISAS Monoclonales**

#### ***Resultados de los anticuerpos anti-Cn2***

De las colonias recuperadas después de la infección de un cultivo de células TG1 con los fagos anti-Cn2 eluidos de cuarta ronda de ambas bibliotecas, se utilizaron 72 para producir anticuerpos solubles y analizarlos por ELISA. De las 72 clonas analizadas de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod se obtuvieron 12 clonas positivas. Este resultado es una media de los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes. De ellas, solo 4 clonas fueron diferentes por "fingerprinting" y secuenciación.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION



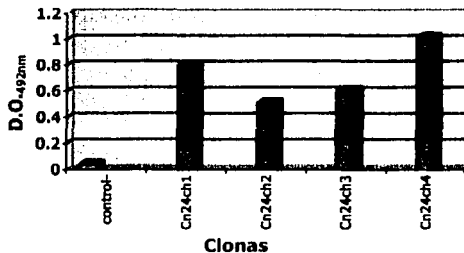
**Figura 9. ELISAs policlonales.** En la figura se muestran los resultados de los ELISAs policlonales. Se puede observar que en todos los casos a medida que aumentan las rondas de selección aumenta la señal de ELISA. Para los antígenos CII1 y Vn4 se obtuvieron anticuerpos a partir de ambas bibliotecas, pero se observan mayores valores de D.O.<sub>492nm</sub> para los anticuerpos provenientes de la biblioteca que posee el  $V_L$  modificado (panel B) en el caso de CII1 que para los anticuerpos policlonales provenientes de la biblioteca con el  $V_L$  A27. En el caso de los anticuerpos contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina (panel C) se observa lo contrario. El panel A corresponde a los anticuerpos anti-CN2, en este caso se observan anticuerpos provenientes de la biblioteca con el  $V_L$  modificado. En todos los casos se representan los resultados obtenidos con los scFv expresados como anticuerpos solubles. Los ELISAs fueron realizados por paneles en la misma placa. En todos los casos se pusieron controles negativos y positivos.

En el caso de la selección de la biblioteca  $V_H$ -A27 contra Cn2 no se obtuvo ningún anticuerpo positivo. En este punto ocurrió un error experimental (contaminación) que no permitió



seleccionar anticuerpos positivos. Es por ello que no se puede concluir nada al respecto.

En la Figura 10 se grafican los resultados del ELISA. Solo se representan en la figura las clonas diferentes. Las cantidades de antígeno utilizado así como el procedimiento seguido para realizar el ensayo se describen en la sección de Metodología. Con una barra azul se representa la media de los valores de D.O.<sub>492nm</sub> obtenidos para los controles negativos (sobrenadante de cultivo de la cepa sin transformar). En rojo se representan los resultados de las clonas positivas las cuales se enumeran en el eje de las abscisas.



**Figura 10.** ELISA monoclonal de anticuerpos solubles provenientes de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod contra Cn2. En la figura se grafican los valores de D.O.<sub>492nm</sub> de los anticuerpos solubles producidos de las 4 clonas diferentes que dieron señal positiva. Las 4 clonas poseen valores de D.O.<sub>492nm</sub> tres veces mayor que el valor medio de los controles negativos (0.04) más la desviación estándar (0.01). Los resultados que se muestran son la media de cuatro experimentos independientes.

#### **Resultados de los anticuerpos anti-CII1.**

A partir de las clonas provenientes de la cuarta ronda de selección contra la toxina de alacrán CII1, se seleccionaron 40 clonas de cada una de las bibliotecas. Los ensayos se realizaron por triplicado y las condiciones utilizadas se reportan en la sección de Metodología.

Se obtuvieron 25 clonas positivas de las cuales solo 7 fueron diferentes. De ellas 6 provienen de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod y solo una de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27. En la Figura 11 se representan los resultados del ELISA. Solo están representados los valores de las clonas diferentes ("fingerprinting" y secuenciación).

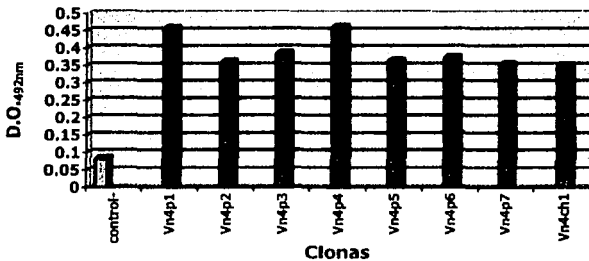
Fueron tomados como valores positivos todos aquellos que fuesen al menos tres veces el control negativo (0.058) más la desviación estándar (0.008).



**Figura 11.** ELISAs monoclonales contra ClI1. En la figura se muestran los resultados de los ELISAs monoclonales de anticuerpos provenientes de ambas bibliotecas contra la toxina de alacrán ClI1. Solo se representan las clonas que producen anticuerpos diferentes.

**Resultados de los anticuerpos anti- $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina.**

A partir de 35 clonas al azar de cada biblioteca se realizaron ELISAs monoclonales. Los resultados se muestran en la Figura 12.



**Figura 12.** ELISAs monoclonales contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina. En la figura se muestran los resultados de los ELISAs monoclonales de anticuerpos provenientes de ambas bibliotecas contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina. En la figura se muestran las clonas Vn4p1 y Vn4p4 como clonas diferentes ya que se obtienen patrones de restricción distintos para estas dos clonas, pero el análisis de secuencia demostró que eran iguales.

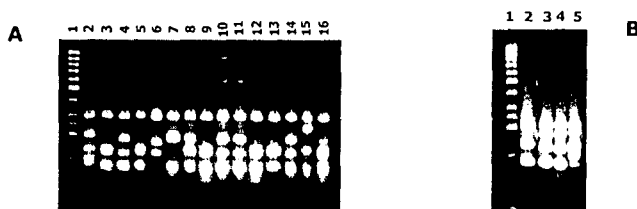
Se obtuvieron 15 clonas positivas, de ellas se observan 6 patrones de digestión diferentes. El análisis de secuencia revela que hay 7 diferentes. De las clonas positivas 6 provienen de

la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 y solo una de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod. Este resultado indica que existe una preferencia de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 para unir a esta proteína (PM). Fueron tomados como valores positivos todos aquellos que fuesen al menos tres veces el control negativo (0.084) más la desviación estándar(0.009). Los ensayos se realizaron por triplicado y las condiciones utilizadas se reportan en la sección de Metodología. En la figura se representan solo aquellas clonas que son diferentes por "fingerprinting" aunque después dieran la misma secuencia; y aquellos que aunque dieron el mismo patrón de digestión revelaron una secuencia diferentes después de la secuenciación.

#### **Análisis por "fingerprinting" de las clonas positivas.**

A partir de las clonas que producen anticuerpos que reconocen por ELISA a las diferentes toxinas se purificó plásmido. Los plásmidos purificados fueron separados en un gel de agarosa 0.6% para comprobar su calidad y concentración.

Para saber exactamente con cuantas clonas diferentes contábamos los plásmidos purificados fueron utilizados como templado en una reacción de PCR para amplificar los scFv. Los productos de PCR fueron digeridos a continuación con la enzima de restricción BstN I. En la Figura 13 se muestran los patrones de restricción obtenidos en cada caso. En la figura se muestran solo aquellas clonas con patrones de restricción diferentes y solo algunos casos donde los patrones son iguales pero el análisis de secuencia revela que son clonas diferentes.



**Figura 13.** Purificación y análisis por restricción de plásmidos conteniendo anticuerpos de interés.

En el panel A se muestran los patrones de restricción obtenidos para las clonas positivas contra CII1 y latrotoxina. 1. marcador de peso molecular (50pb), 2. CII1ch2, 3.CII1ch4, 4. CII1ch5, 5. CII1ch6, 6.CII1p1, 7. vn4p1, 8. vn4p2, 9. vn4p3, 10. vn4p4, 11. vn4p5, 12. vn4p6, 13. vn4ch1, 14. CII1ch1, 15. CII1ch3, 16. vn4p7. En el panel B se muestran los patrones de restricción obtenidos para las clonas positivas contra Cn2. 1 patrón de peso molecular (50pb), 2. Cn24ch1, 3. Cn24ch2, 4. Cn24ch3, 5. Cn2ch4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En el caso de las clonas positivas contra Cn2 se pueden observar 4 patrones diferentes. En el caso de las clonas positivas contra CII1 se observan 6 patrones diferentes de 7 clonas totales. Los patrones de CII1ch3 y CII1ch6 son iguales. Sin embargo, se representan ambos porque hay diferencias en cuanto a su secuencia. En el caso de las clonas positivas contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina se observan 6 patrones diferentes de 8 clonas totales. Las clonas vn4p3 y vn4p6 presentan el mismo patrón de restricción; así como las clonas vn4p4 y vn4p5. Estas clonas fueron representadas porque el análisis de secuencia de las misma reveló que eran diferentes. En contraste con esto, las clonas Vn4p1 y Vn4p4 mostraron una secuencia 99% idénticas con solo una mutación en la secuencia de nucleótidos. Este cambio puede haber generado la diferencia en los patrones de restricción.

### **Análisis de Secuencia.**

Los plásmidos conteniendo scFvs específicos contra cada una de las toxinas fueron analizados por secuenciación con la pareja de oligonucleótidos Lmb3 y pCANTAB5B-S6 los cuales se describen en la sección de Materiales. La delimitación de los CDRs se realizó según Chotia and Lesk, 1987.

### **Anticuerpos contra Cn2**

En la figura 14 se muestran las secuencias del gen V<sub>H</sub> de cada una de las clonas diferentes obtenidas contra Cn2. En las secuencias se puede identificar que existen los patrones esperados para una región V<sub>H</sub> de humano en todos los casos. Aparecen los aminoácidos conservados, los sitios de clonación que fueron introducidos, así como los diferentes CDRs. Se señalan cada una de las combinaciones de oligonucleótidos que generaron el gen V<sub>H</sub> en cada uno de los scFv, así como cada uno de los CDRs.

Se puede apreciar que en los cuatro casos se obtiene una talla para el CDR1 de 7 residuos. El largo del CDR2 también se encuentra muy conservado (6 residuos), solo la clona Cn24ch4 posee una talla de 7 residuos. La talla de los CDR3 oscilan entre 12-13 residuos. En cuanto a secuencia todos los CDR1 y CDR2 son diferentes; mientras que se repite el mismo CDR3 en las clonas Cn24ch2 y Cn24ch3.

```

      L A C K F Y F K E T V I N K Y L L P T A A A G L
Cn24ch1 CTTGCATGCAAAATTCATATTC AAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT
      L L L A A Q P A M A Q V N L R E S G G G L V K P G
GTTATTACTFCG GGCACAGCCGCG CATGGCCAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGGAGGCCCTGGTCAAGCCTGGG
      ↓
      VH2
  
```

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

G S L R L S C A A S G F T F T A Y P M N W V R Q P P  
 GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCACTGCCTATCCCATGAAC TGGGTCGGCAGCCTCCA  
 CDR1  
 G K G L E W V A V I S Y D G S K K Y A D S V K G R  
 GGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATCATATGATGGAAGTAAAAGTATATATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGA  
 CDR2  
 F T L S R D N S E N T L Y L E H N S L R A E D T A V  
 TTCACCCCTCTCCAGAGACAATTCGAGAAACACCCCTGTATCTGGAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAGGACACGGCTGTG  
 Y Y C A R D M M T Y F G D Y S F D S W G Q G T L V T  
 TATTACTGTGCAAGAGATATGATGACTTACTTCGGTGACTACTCTTTTGACTCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC  
 CDR3

V S  
 GTCTCC

← J<sub>H</sub>4-5

T V I M K Y L L P T A A A G L L L L L A A Q P A Sfi I  
**Cn24ch2** ASACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTTACTCGC GGCCAGCCGGC  
 M A E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S  
 CATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCCTCAGTGAAGTCTCTGCAAGCCTT  
 V<sub>H</sub>3 →  
 G F S F T T Y G F N W V R Q A P G Q G L E W M G W S  
 CTGGTTTCAGCTTTACCACCTATGGTTTCAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC  
 CDR1

A Y S G N T N Y A O K F Q G R V A M T M D T S P T T  
 AGCGCTTACAGTGGTAACACAAACTATGCACAGAGTCTCCAGGGCAGAGTCCCATGACCATGGACTCCGCGACCACA  
 CDR2

V Y L E L W G L T F D D T A V Y Y C A R P Y N W N L  
 GTATACCTGGAGCTGTGGGGCCTGACTTTTGACGACACGGCCGTGATTACTGCGGAGACCCTATAACTGGAACCTG  
 A V A F D L W G Q G T M V T V S  
 GCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT  
 CDR3 ← J<sub>H</sub>3

A C C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**Cn24ch3** GCTTGTGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT  
 Sfi I  
 L L L A A Q P A M A Q V Q L Q E S G P G L V K P S  
 GTTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG

V<sub>H</sub>4 →

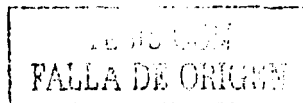
G T L S L T C A V S G G S I S S S N W W S W V R E P  
 GGGACCTGTCCCTCACCTGCGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCGAGGCC  
 CDR1

P G K G L E W I G E I Y H S G S T N Y N P S L K S R  
 CCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTTGGGAAATCTATCATAGTGGGAGCACCACTACAACCCGCTCCCTCAAGAGTCCA  
 CDR2

V T I S V D T S K N Q F S L K L R S V T A A D T A V Y  
 GTCACCATATCAGTAGACAGTCCAAGAACCAGTCTCCCTGAAGCTGAGATCTGTGACCCGCGAGACAGCCGCTGTG  
 Y C A R P Y N W N L A V A F D L W G Q G T M V T V S  
 TTACTGCGGAGACCCTATAACTTGAAGCTTGGCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT  
 CDR3

J<sub>H</sub>1-2

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**Cn24ch4** CPTGCATGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGAT



Sfi I

L L L L A A Q P A M A E V Q L V E S G S E L K K P G A  
 TGTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGCTGAGTTGAAGAAGCCCTGGG

V<sub>H</sub>3

S V K V S C K A S G Y T L T D Y F I H W V R Q A P G  
 CCTCAGTGAAGGTCCTGCAAGGCTCTGGATACACATGACTGACTTTTATACACTGGGTGGGACAGCCCTGGA

CDR1

Q R P E W M G W I N P N S G G T N Y A Q N F Q A R V S  
 CAAGACCTGAGTGGATGGATGGATCAACCCCAACAGTGGTGGCACAAATTATGCACAGAATTTTCAGGCCAGGCTCTC

CDR2

M T R D T S I N A V Y M E L S S L T S D D T A V Y Y C  
 CATGACCAGGGACCGTCCATCAATGCTGTGTACATGGAGCTGAGCAGTCTTACATCTGAGGACACGGCCGTGATTATT

A S R P P S S T P Y G V F D Y W G Q Q T L V T V S  
 GTGGAGCAGACCCCGAGTTCCACACCTTATGGCGTATTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGCTCACCTCTCT

CDR3

J<sub>H</sub>1-2

**Figura 14.** Secuencias de las regiones V<sub>H</sub> de los scFv positivos contra Cn2. En la figura se muestra la secuencia de los genes V<sub>H</sub> de cada uno de los scFv positivos contra Cn2. En las secuencias se destacan los CDRs así como el sitio de restricción para la enzima Sfi I. Además se muestran las combinaciones V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> que fue utilizada para amplificar cada gen. La secuencia fue corroborada en ambos sentidos.

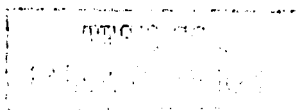
#### **Anticuerpos contra CII1**

En la figura 15 se muestran las secuencias del gen V<sub>H</sub> de cada una de las clonas diferentes obtenidas contra CII1. En las secuencias se puede identificar que existen los patrones esperados para una región V<sub>H</sub> de humano en todos los casos. Aparecen los aminoácidos conservados, los sitios de clonación que fueron introducidos, así como los diferentes CDRs. Se señalan cada una de las combinaciones de oligonucleótidos que generaron el gen V<sub>H</sub> en cada uno de los scFv, así como cada uno de los CDRs.

En la mayoría de los casos se conserva el largo del CDR1 (7 residuos), solo en las clonas CII1ch2 y CII1p1 se observa un CDR1 de mayor talla (9 residuos). El largo del CDR2 varía entre 6-10 residuos. El largo predominante es 7 residuos y solo se encontró un largo de 10 residuos en el CII1p1. Las tallas de los CDR3 oscilaron entre 7-12 residuos. Los CDR3 más pequeños se observan para las clonas CII1ch1 y CII1p1 (7 y 8 residuos respectivamente).

En cuanto a secuencia en 4/7 clonas el CDR1 esta conservado, las tres clonas restantes tienen secuencias diferentes en este lazo. El CDR2 no esta tan conservado. Se pueden ver dos parejas y el resto es diferente. Todos los que poseen un CDR3 de 12 residuos tienen la misma secuencia (3 clonas), el resto de las clonas tienen un CDR3 diferente.

I R Q A C M Q I L F Q G S T V I M K Y L L P T A  
 CII1ch1 ATACGCCAAGCTTGCATGCAAAATTCATTTCAAGGCAGCACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCCTACGG



Sfi I

A A G L L L L A A Q P A M A Q V Q L V E S G G T L  
 CAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGCCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAACT

V<sub>H</sub>1

V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y Y M S W  
 TGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTGACTACTACATGAGCTGG  
 CDR1

I R Q A P G K G L E W L A V I S F N G G D K Y Y A D  
 ATCCGCCAGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGCTGGCAGTATTTTCATTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCT

CDR2

S A R G R F T I S R D N S K N T L F L Q L S S L T T  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGT

E D T A V Y Y C A G P M V S F D Y W G R G T L V T V  
 GGCTGGCAGTATTTTCATTTAATGGAGCGATAAATACTACCGAGACTCCGGAGGGGGGATTCACATCTCCAGG  
 CDR3

S  
 ACA  
 ← J<sub>H</sub>1-2

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**C111ch2** CTTCATGCAAAATCTATTTCAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGGCTACGGCAGCCGCTGGAT

Sfi I

L L L A A Q P A M A Q V Q L Q E S G P G L V K P S  
 TGTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGCCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCCTC

V<sub>H</sub>4

Q T L S L T C T V S G G S I S S G G Y Y W S W I R Q  
 ACAGACCCCTGTCCCTCACCTGCAGCTGTCTCTGGTGGCTCCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCA  
 CDR1

H P G K G L E W I G Y I Y S G S T Y Y N P S L K S  
 GCACCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTACATCTATTAAGGGCCCTGGAGTGGATTGGTACATCTATTACAGT  
 CDR2

R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A  
 GGGAGCCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTGGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTCTAAGAACCAGTTCTCCCTG

V Y Y C A R G R V L M V Y L D Y W G Q G T L V T V S  
 AAGCTGAGCTCTGTGACTGCCCGGACACGGCCGTGATTTACTGTGCGAGGGGAGACAGTGGGAGCACCTATACAAC  
 CDR3

J<sub>H</sub>4-5

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**C111ch3** CTTCATGCAAAATCTATTTCAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGGCTACGGCAGCCGCTGGAT

Sfi I

L L L A A Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V K E P G  
 TGTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGCCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGGAGCCCTGG

V<sub>H</sub>1

A S V K V S C Q A S G Y T F S N Y G I S W V R Q A P  
 GGCCPCAGTGAAGTCTCCTGCCAGGCTTCTGGGTACACCTTTAGTAACTATGGAAATCAGCTGGTGGGACAGCCGCC

CDR1

G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y A Q K L Q G R  
 TGGACAAGCCCTGAATGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGAC

CDR2

V T N T T D T S T A Y M E L S S L T S D D M A V  
 AGTACCAGTGAACACAGCATCCAGAGCACAGCCTACATGGAAGTGGAGCTGAGACTGACATCTGACGACATGGCCCT

Y Y C A R D R T D Y G R M D F W G Q G T M V T V S  
 GTATTACTGTGCGAGAGTCCGGACTACTCGGCCGGATGGATTTCTGGGGCCAAAGGACAATGGTCCACCGCTCC  
 CDR3

J<sub>H</sub>3

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**C111ch4** CTTCATGCAAAATCTATTTCAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGGCTACGGCAGCCGCTGGAT

Sfi I

L L L L A A Q P A M A Q V Q L V Q S G P E V K K P G  
 TGTATTACTCGC GCGCCAGCCGGC CATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGACCAGAGGTGAAGAAGCCTGG

V<sub>H1</sub> →

A S V K V S C K A S G F S F T T Y G F N W V R Q A P  
 GGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTTCAGCTTTACCACCTATGGTTTCAACTGGGTGCGACAGGCCCC

CDR1

G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y A Q K L Q G R  
 TGGACAAGGSCCTTGAGTGGATGGGATGGATACGGCTTACAAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAG

CDR2

V T M T T D T S T T T V Y L E L W G L F T D D T A V  
 AGTCACCATGACCACAGACACATCCAGACCACAGTATACCTGGAGCTGTGGGGCTGACTTTTGACGACACGGCCGT

Y Y C A R F Y N W N L A V A F D L W G Q G T M V T V  
 GTATTACTGCGCGAGACCCTATACTGGAACCTGGCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT

CDR3

S  
 CTCT  
 ← J<sub>H3</sub>

T V I M K Y L L P T A A A G L L L L L A A Q P A  
**C11ch5** AGACAGTCAATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGC GCGCCAGCCGGC  
 M A E V Q L V E S G A E V K K P G A S V K V S C K A S  
 CATGGCCCAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGAAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGCCTT

V<sub>H3</sub> →

G F S F T T Y G F N W V R Q A P G Q G L E W M G W S  
 CTGGTTTCAGCTTTACCACCTATGGTTTCAACTGGGTGCGACAGGCCCTCGACAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC

CDR1

A Y S G N T N Y A Q K F Q G R V A M T M D T S P T T  
 AGCGCTTACAGTGGTAAACAACCTATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTGCCTATGACCATGGACTCCCGCAGCCACA

CDR2

V Y L E L W G L T F D D T A V Y Y C A R P Y N W N L  
 GTATACCTGGAGCTGTGGGGCTGACTTTTGACGACACGGCCGTGATTAAGTGCAGGAGACCCTATAACTGGAACCTG

A V A F D L W G Q G T M V T V S  
 GCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCT

CDR3

← J<sub>H3</sub>

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**C11ch6** CTGTCATGCAAAATCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGAT

Sfi I

L L L L A A Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G  
 TGTATTACTCGC GCGCCAGCCGGC CATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG

V<sub>H1</sub> →

S S V K V S C K A S G F S F T T Y G F N W V R Q A P  
 GCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTTCAGCTTTACCACCTATGGTTTCAACTGGGTGCGACAGGCCCC

CDR1

G Q G L E W M G W I S A Y S G N T N Y A Q K F Q G R  
 ACATGGAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATACGGCTTACAGTGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTCCAGGGCAG

CDR2

V A M T M D T S T T T V Y L E L W G L T F D D T A V  
 AGTCGCCATGACCACAGATCCAGCACCACAGTATACCTGGAGCTGTGGGGCTGACTTTTGACGACACGGCCGT

Y Y C A G P Y N W N L A V A F D L W G Q G T M V T V  
 GTATTACTGCGCGGAGCCCTATACTGGAACCTGGCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT

CDR3

S  
 CTCT  
 ← J<sub>H3</sub>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



```

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L
C111p1 CTTGCATGCAAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCATCGGCAGCCGCTGGATT
      Sfi I
L L L A A Q P A M A E V Q L V E S G P G L V K P S
GTTATTACTCGC GGCCACGCCGGC CATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCG
      VH3
Q T L S L T C A I S G D S V S S N S A G W S W I R R
CAGACCCCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTTAGCAACAGTGTCTGGTTGGAGCTGGATCAGGGCG
      CDR1
S P S R G L E W L G R T Y Y P S K W Y N D Y A P S V
TCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCACCATCTGTG
      CDR2
K C R I T I N P D T S K N Q F S L Q L N S V T P E D
AAATGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCTAAGAATCAGTTCTCCCTGGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAAGAC
T A V Y Y C A R S P W S Y F D Y W G Q G T T V T V S
ACGGCCGTATATTACTGTGGAGATCGCCCTGGAGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGACCACGGTACCCGTCGCC
      CDR3
      JH6

```

**Figura 15.** Secuencias de las regiones  $V_H$  de los scFv positivos contra C111. En la figura se muestra la secuencia de los genes  $V_H$  de cada uno de los scFv positivos contra C111. En las secuencias se destacan los CDRs así como el sitio de restricción para la enzima Sfi I. Además se muestran las combinaciones  $V_H$ - $J_H$  que fue utilizada para amplificar cada gen. La secuencia fue verificada en ambos sentidos.

Cuando se comparan las clonas obtenidas contra las toxinas de alacrán se pueden observar muchos detalles importantes. De las clonas obtenidas contra C111 existen dos que poseen un anticuerpo cuya secuencia en los CDRs es idéntica (C111ch4 y C111ch6). Estos dos anticuerpos solo difieren en unos pocos residuos (4-8) fuera de los CDRs, por lo cual se podría considerar que tienen las mismas propiedades de reconocimiento. Además existe una clona de las seleccionadas contra Cn2 cuya secuencia es idéntica a C111ch5 por lo que se espera que estas dos clonas reconozcan a ambos antígenos.

#### **Anticuerpos contra $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina**

En la Figura 16 se muestran las secuencias del gen  $V_H$  de cada una de las clonas diferentes obtenidas contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina. En las secuencias se puede identificar que existen los patrones esperados para una región  $V_H$  de humano en todos los casos. Aparecen los aminoácidos conservados, los sitios de clonación que fueron introducidos, así como los diferentes CDRs. Se señalan cada una de las combinaciones de oligonucleótidos que generaron el gen  $V_H$  en cada uno de los scFv, así como cada uno de los CDRs.

El largo de los CDR1 en todas las clonas se encuentra conservado (7 residuos). La talla de los CDR2 también es muy conservada en todas las clonas (7 residuos). Para el CDR3 se obtuvieron solo dos longitudes diferentes 12 y 18 residuos. La mayoría de las clonas tienen

una longitud de 12 residuos solo las clonas Vn4p2 y Vn4ch1 poseen un CDR3 de 18 residuos.

En cuanto a secuencia el CDR1 es igual en la mayoría de los casos. Solo varía en las clonas Vn4p5 y Vn4ch1. El CDR2 es idéntico para la mayoría de las clonas solo varía la secuencia en la clona Vn4ch1. La secuencia de los CDR3 de las clonas de 18 residuos es la misma; así como los CDR3 de las clonas restantes.

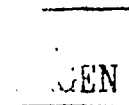
Las clonas Vn4p1, Vn4p3, Vn4p6 y Vn4p7 poseen los mismos CDRs y solo difieren en unos cuantos residuos en las regiones marco. La secuencia de los CDRs es la misma que la repetitiva en las clonas contra CII1. En este caso solo varía la secuencia del L1.

Podría ser que esta secuencia diera un anticuerpo pegajoso, lo cual vamos a comprobar por ensayo de reactividad cruzada.

```

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L
Vn4p1/4 CTTCATGCAAAATTCATATTC AAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGAT
      Sfi I
L L L L A A Q P A M A E V Q L V Q S G A E V K K P G
TGTATTACTCGC GCGCAGCGCGC CATGSCCGAGGTPCCAGTTGGTGCAGTCTGAGCTGAGGTGAAGAGCGCTGG
      VH3
A S V K V S C K A S G F S F T T Y G F N W V R Q A P
GGCCTCAGTGAAGGTCCTCGAAGGCTTCTGGTTTCAGCTTACCACCTATGGTTTCAACTGGTGCCGACAGGCCCC
      CDR1
G Q G L E W M G W I S A Y S G N T N Y A Q K F Q G R
TSGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAGTGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTCCAGGGCAG
      CDR2
V A M T M D T S T T T V Y L E L W G L T F D D T A V
AGTCGCCATGACCATGGACACATCCACGACCACAGTATACCTGGAGCTGTGGGGCCCTGACTTTTGACGACAGCGCCGT
Y Y C A R P Y N W N L A V A F D L W G Q G T M V T V
GTATTACTGTCCGAGACCTATAACTGGAACTTGGCGGTTCGATTGATCTCTGGGGCC AAGGACAATGTCCACCGT
      CDR3
S
CTCC
← JH3
F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L L L L A
Vn4p2 TTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCG
      Sfi I
A Q P A M A E V Q L V E S G A E V K E P G A S V K V
GCCCAGCCGGC CATGCCCAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGGAGCCCTGGGGCCCTCAGTGAAGGT
      VH3
S C K A S G F S F T T Y G F N W V R Q A P G Q G L K
TTCTCGAAGGCTTCTGGTTTCAGCTTACCACCTATGGTTTCAACTGGTGCCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTAA
      CDR1
W M G W I S A Y S G N T N Y A Q K F Q D R V T M T T
GTGGATGGATGGATCAGCGCTTACAGTGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTCCAGGACAGAGTCAACCATGACCAC
      CDR2
D T S T S T A Y M E L R S L K S D D T A V Y Y C A R
AGCACATCCACGACACAGCTACATGGAAATGAGGAGCCCTGAAATCTGACGACACGGCCCGTATTACTGCGCAG
S N Q G Y S A T W E L L F A A F D I W D Q G T T V T
GTCAAACC AAGGTTATAGCGCCACTGGGAATTA CTTCGGCAGCTTTTGATATCTGGGACC AAGGGACCAGGTCAC
      CDR3

```



V S  
CGTCTCC  
←  
J<sub>H</sub>6

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**Vn4p3** CTTGCATGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCCCTGGATTG  
sfi 1  
L L L A A Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G A  
TTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGGG

V<sub>H</sub>1  
S V K V S C K A S G F S F T T Y G F N W V R Q A P G  
CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTTCAGCTTTACCACCTATGTTTCAACTGGGTGCGACAGGCCCTCG  
CDR1  
Q G L E W M G W I S A Y S G N T N Y A Q K F Q G R V  
GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAGTGGTAACACAAAATATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAG  
CDR2

A M T M D T S T T T V Y L E L W G L T F D D T A V Y  
TCGCCATGACCATGGACACATCCACGACCACAGTATACCTGGAGCTGTGGGGCCTGACTTTTGACGACACGGCCGTGT  
CDR3  
Y C A R P Y N W N L A V A F D L W G Q G T T V T V S  
ATTACTGCGCAGACCCCTATAACTGGAACCTGGCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT

CC  
←  
J<sub>H</sub>6

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**Vn4p5** CTTGCATGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCCCTGGATTG  
sfi 1  
L L L A A Q P A M A E V Q L V Q S G A E V K K P G A  
TTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGGG

V<sub>H</sub>3  
S V K V S C K A S G Y T F S N Y G F N W V R Q A P G  
CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGGTACACCTTTAGCAACTATGGTTTCAACTGGGTGCGACAGGCCCTCG  
CDR1  
Q G L E W M G W I S A Y S G N T N Y A Q K F Q G R V  
GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAGTGGTAACACAAAATATGCACAGAAGTTCAGGCAAACT  
CDR2

A M T M D T S T T T V Y L E L W G L T F D D T A V Y  
TCGCCATGACCATGGACACATCCACGACCACAGTATACCTGGAGCTGTGGGGCCTGACTTTTGACGACACGGCCGTGT  
CDR3  
Y C A R P Y N W N L A V A F D L W G Q G T T V T V S  
ATTACTGCGCAGACCCCTATAACTGGAACCTGGCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGGCCACGGTCACCGTCT

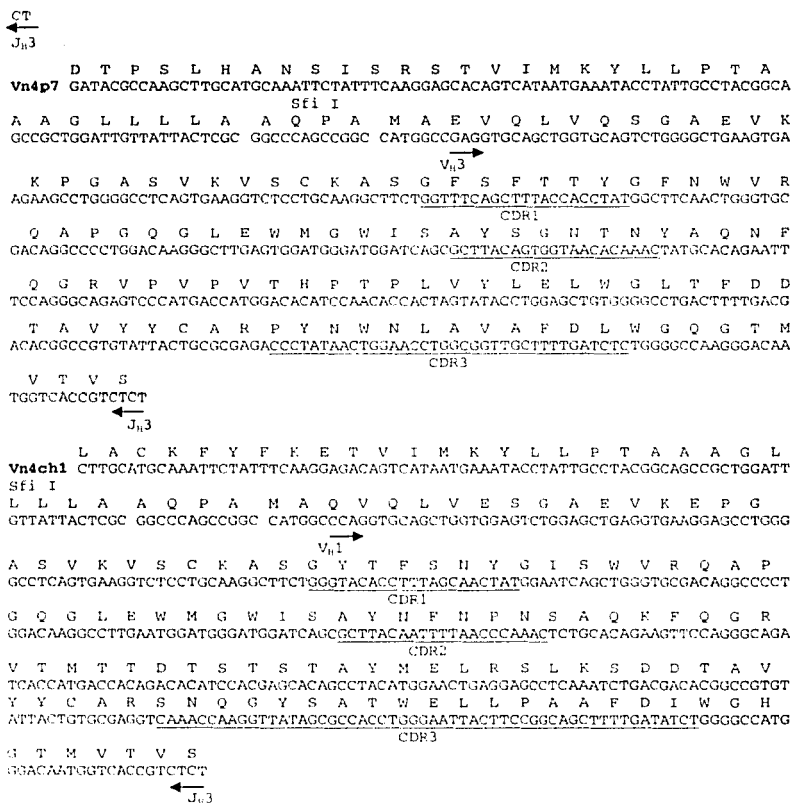
CT  
←  
J<sub>H</sub>6

L A C K F Y F K E T V I M K Y L L P T A A A G L  
**Vn4p6** CTTGCATGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCCCTGGATTG  
L L L A A Q P A M A Q V Q L V Q S G A E V K E P F G A  
TTATTACTCGC GGCCAGCCGGC CATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGGAGCCCTGGGG

V<sub>H</sub>1  
S V K V S C K A S G F S F T T Y G F S W V R Q A P G  
CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTTCAGCTTTACCACCTATGTTTTCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTCG  
CDR1  
Q G L E W M G W I S A Y S G N T N Y A Q K F Q G R V  
GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAGTGGTAACACAAAATATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAG  
CDR2

A M T M D T S T T T V Y L E L W G L T F D D T A V Y  
TCGCCATGACCATGGACACATCCACGACCACAGTATACCTGGAGCTGTGGGGCCTGACTTTTGACGACACGGCCGTGT  
CDR3  
Y C A R P Y N W N L A V A F D L W G Q G T T V T V S  
ATTACTGCGCAGACCCCTATAACTGGAACCTGGCGGTTGCTTTTGATCTCTGGGGCCAAGGGCAATGGTCACCGTCT

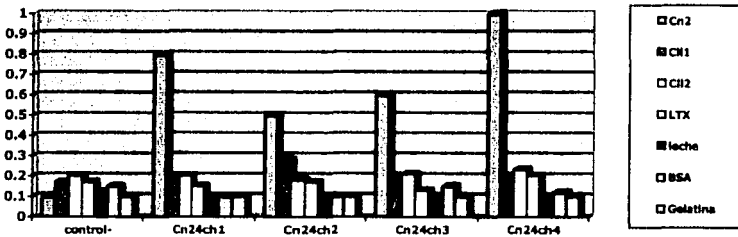
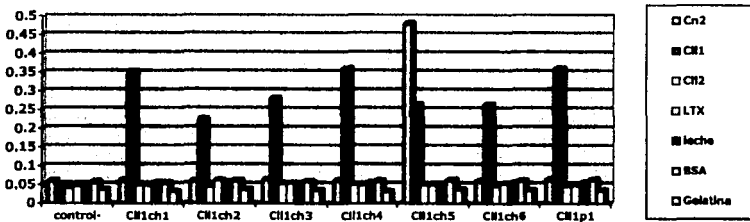
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

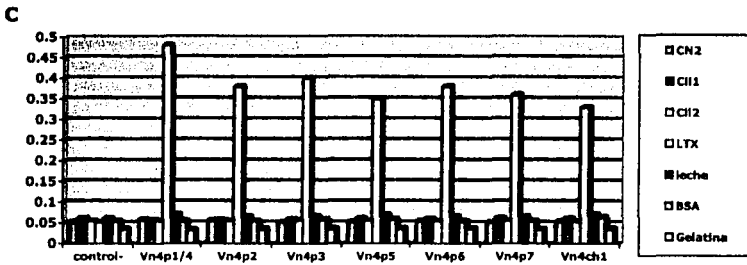


**Figura 16.** Secuencias de las regiones V<sub>H</sub> de los scFv positivos contra α-NH<sub>2</sub>-latrotoxina. En la figura se muestra la secuencia de los genes V<sub>H</sub> de cada uno de los scFv positivos contra α-NH<sub>2</sub>-latrotoxina. En las secuencias se destacan los CDRs así como el sitio de restricción para la enzima Sfi I. Además se muestran las combinaciones V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> que fue utilizada para amplificar cada gen. La secuencia fue corroborada en ambos sentidos. Las secuencias de las clonas Vn4p1 y Vn4p4 se muestran como una sola ya que son iguales. Las clonas Vn4p3 y Vn4p6 así como las clonas Vn4p4 y Vn4p5 aunque tienen el mismo patrón de restricción poseen diferente secuencia.

**ELISAs de reactividad cruzada.**

Después del "fingerprinting" y el análisis de secuencia de los anticuerpos positivos se analizaron estos contra cada uno de los antígenos para determinar su especificidad. Cada uno de los anticuerpos fue retado contra diferentes antígenos los cuales no están relacionados con el antígeno contra el cual fueron seleccionados. En la Figura 17A se muestran los resultados para los cuatro anticuerpos positivos contra Cn2. En la Figura 17B se muestran los resultados para los anticuerpos positivos contra CII1. En la Figura 17C se muestran los resultados para los anticuerpos positivos contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina. El único caso de reactividad cruzada es entre el anticuerpo Cn24ch2 y CII1ch5, los cuales son idénticos en secuencia. El resto de los anticuerpos repetitivos que poseen el A27mod no cruzan ni con LTX, ni con Cn2. En el caso de Cn2 se esperaría que cruzaran ya que los antígenos son de igual tamaño y las diferencias entre los anticuerpos es mínima. Sin embargo, en estos casos no se obtiene reacción cruzada. Los anticuerpos contra LTX que poseen el V<sub>H</sub> repetitivo tienen un L1 diferente lo cual podría explicar porque no reconocen a CII1 o Cn2.

**A****B**



**Figura 17. ELISA de reactividad cruzada.** En la figura se muestran los resultados de los ELISA de reactividad cruzadas los cuales fueron realizados para cada una de las clonas positivas contra los diferentes antígenos. El panel A corresponde a las clonas positivas contra Cn2. El panel B corresponde a las clonas positivas contra CII1. El panel C corresponde a las clonas positivas contra  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-latrotoxina. Los resultados mostrados son una media de al menos tres experimentos independientes.

TESI CON  
FALLA DE ORIGEN

## **DISCUSIÓN**

El rasgo distintivo de los anticuerpos es su capacidad para reconocer a cualquier otra molécula con gran especificidad y alta afinidad. Aunque mucho se ha avanzado en la comprensión de la relación entre la estructura y la función de los anticuerpos, aun se desconoce de que depende que un anticuerpo dado reconozca cierto ligando o grupo de ligandos dentro del vasto universo antigénico. Esto se demuestra en el hecho de que es imposible predecir la especificidad de un anticuerpo.

El objetivo principal de este trabajo fue demostrar que existen reglas que correlacionan la estructura de los anticuerpos con su especificidad. Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación (Ramírez-Benítez [tesis doctoral, 2001]) han revelado la importancia de la longitud de L1 para determinar la geometría del sitio de unión al antígeno de anticuerpos que reconocen moléculas relativamente pequeñas como péptidos y pequeñas proteínas (menos de 70 aminoácidos, aproximadamente 7kDa) y proteínas propiamente dichas (más de 70 aminoácidos). Las longitudes que se presentan en los anticuerpos conocidos de humano y ratón en L1 van desde 10 hasta 17 residuos (Ramírez-Benítez [tesis doctoral, 2001]). El 84% de los anticuerpos que reconocen péptidos presentan longitudes de L1 de más de 13 residuos (Ramírez-Benítez [tesis doctoral, 2001]). En contraste, los anticuerpos anti-proteínas presentan longitudes de menos de 13 residuos (Ramírez-Benítez [tesis doctoral, 2001]).

Basados en esta correlación, se diseñaron e implementaron dos repertorios de anticuerpos. Uno de ellos fue diseñado con el gen variable ligero de humano kappa A27, el cual esta presente en el 25% de los anticuerpos de humano reportados hasta la fecha (Griffiths et al., 1994). Este gen posee un L1 de 12 aminoácidos por lo cual es esperado tenga una tendencia a reconocer proteínas. El otro repertorio fue generado a partir de una modificación de este gen, la cual consiste en una sustitución del L1 del gen A27 por la región equivalente del gen DPK24. El gen DPK24 posee una longitud de 17 residuos y consecuentemente debe reconocer moléculas relativamente pequeñas. Cada uno de estos genes se combinaron con el repertorio de los genes que codifican para las cadenas variables pesadas de humano y se expresaron en formato de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) en la superficie del fago M13 como proteínas de fusión a la proteína PIII del fago. La biblioteca con el gene A27 se llamo V<sub>H</sub>-A27 y la biblioteca con el gene A27 modificado se llamo V<sub>H</sub>-A27mod.

El tamaño de la biblioteca  $V_H$ -A27 se estimó en  $1 \times 10^8$  variantes, mientras que la biblioteca  $V_H$ -A27mod rindió  $6 \times 10^7$  variantes. Este tamaño en el entorno de  $10^8$  variantes es comparable con el tamaño de bibliotecas de mediana talla reportadas en la literatura (O'Connell et al, 2002). Si se considera que el repertorio de anticuerpos de un ratón es  $10^8$  variantes, y que un ratón es perfectamente inmunocompetente, se puede asegurar que esta talla es suficiente para reconocer cualquier antígeno, al menos con una afinidad en el rango micromolar.

Tanto como el 96% y 98% de las secuencias analizadas por ensayo de restricción en las bibliotecas  $V_H$ -27 y  $V_H$ -27mod, respectivamente, mostraron la talla correcta. Esto indica que el tamaño efectivo de las bibliotecas (clonas con potencial para expresar anticuerpos) esta muy cerca de tamaño neto de las mismas (alrededor de  $10^8$  variantes). El análisis de la diversidad de cada una de las bibliotecas reveló, sin embargo, que en el caso de  $V_H$ -A27, solo 15 de 30 secuencias analizadas fueron diferentes (Tabla 2), lo cual indica un sesgo hacia la familia  $V_{H1}$ , de donde provienen las secuencias repetidas (análisis de secuencias). En la biblioteca  $V_H$ -A27mod, el sesgo fue menor. Solo 2 secuencias de 30 analizadas fueron idénticas. No obstante, las dos secuencias idénticas pertenecen a la familia  $V_{H1}$ . Este sesgo pudiera haberse introducido durante el proceso de amplificación del repertorio de genes  $V_H$ , posiblemente por un desbalance en los oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

Aun con este sesgo, se consideraron ambas bibliotecas como útiles y se procedió a su selección. Al utilizar estas bibliotecas para seleccionar anticuerpos contra moléculas de diferente tamaño, Cn2 y CII1 de aproximadamente 7 kDa y LTX de aproximadamente 30 kDa, se observó, que la biblioteca  $V_H$ -A27 mostró una mayor señal de  $DO_{492nm}$  contra la LTX (Figura 9), si se compara con la señal de ELISA obtenida para las dos proteínas (menor tamaño). Por el contrario, la biblioteca  $V_H$ -A27mod, dio una mayor señal de ELISA contra las proteínas relativamente pequeñas (Figura 9). Esta tendencia se confirmó al analizar la expresión de scFvs libre en un número de colonias tomadas al azar después de la cuarta ronda de selección para ambas bibliotecas (Figuras de la 10-12).

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos después de la selección de ambas bibliotecas contra la  $NH_2$ -LTX y CII1. En el análisis no se incluyen los resultados obtenidos para Cn2 pues no se pueden comparar ambas bibliotecas ya que para la biblioteca  $V_H$ -A27 no se obtuvieron resultados confiables. En este último caso se produjo



una contaminación con una clona no deseada lo cual impidió, aparentemente, la selección de anticuerpos de interés.

Antígeno	Frecuencia (%) de clonas positivas <sup>a</sup>		Frecuencia (%) de scFv únicos <sup>b</sup>	
	VH-A27	VH-A27mod	VH-A27	VH-A27mod
CI1	12.5	50.0	2.5	17.5
LTX	34.3	0.9	20.0	2.9

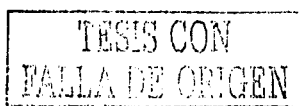
Tabla 5. Frecuencia de clonas positivas y únicas (por "fingerprinting" y secuenciación) seleccionadas de las bibliotecas. a. La frecuencia de clonas específicas se calculó como el número de clonas positivas entre el número total de clonas seleccionadas de la ronda cuatro para cada biblioteca (72, 40 y 35 para Cn2, CI1 y NH<sub>2</sub>-LTX en ambas bibliotecas, respectivamente). b. La frecuencia de clonas únicas se calculó como el número de clonas positivas y que por secuenciación resultaron secuencias únicas entre el número total de clonas seleccionadas de la ronda cuatro para cada biblioteca (72, 40 y 35 para Cn2, CI1 y NH<sub>2</sub>-LTX en ambas bibliotecas, respectivamente).

Como se observa en la Tabla 5, cuando se utilizó la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 (un L1 corto) para seleccionar anticuerpos contra la CI1 (molécula pequeña), el número de clonas positivas fue del 12.5%. Esta frecuencia de éxitos (clonas positivas/total analizado) aumentó a 50 % (4 veces) al utilizar V<sub>H</sub>-A27mod (L1 largo).

Por otra parte, al utilizar V<sub>H</sub>-A27mod (L1 largo) para seleccionar anticuerpos contra la NH<sub>2</sub>-LTX (molécula grande), la frecuencia de éxitos es menor del 1%. En contraste, al utilizar V<sub>H</sub>-A27 (un L1 corto) y LTX (molécula grande) la frecuencia de éxitos fue de 34.3%. Esta frecuencia disminuyó a 0.9% cuando se utiliza la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod (L1 largo) con la NH<sub>2</sub>-LTX. Es decir la frecuencia de éxitos disminuyó 38 veces.

Esto no solo se cumple para el número de clonas positivas, sino también para el número de clonas únicas. Es decir, las bibliotecas no solo respondieron de manera diferencial ante el tipo de antígeno, sino también que lo hicieron con respuestas diversas, variantes de diferente afinidad o anticuerpos contra diferentes epítopes. Esto, a pesar del sesgo de las bibliotecas, lo cual lo hace el resultado aun más relevante.

El análisis por secuencia de la clonas únicas también reveló resultados muy interesantes que pueden ser explicados dentro del marco de la hipótesis básica del proyecto. La mayoría de los anticuerpos independientemente de la biblioteca de que procedan y contra que antígeno se hayan generado poseen un H1 de 7 residuos. Además para la mayoría de los anticuerpos positivos contra cualquiera de los antígenos se observa un H2 conservado (7 residuos



mayormente) y en mucho de los casos conservados en cuanto a secuencia. Solo en el caso del anticuerpo CII1p1 se obtuvo un H2 más largo de lo común (10 residuos), lo cual podría ser una explicación de porque reconoce a un antígeno pequeño.

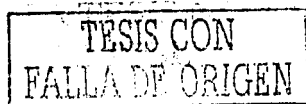
Por otra parte se han reportado unos pocos casos de anticuerpos anti-péptidos que poseen L1 corto. En estos casos, sin embargo, la estructura del sitio de unión al antígeno conserva una geometría cóncava. Este hecho esta soportado por la presencia de un lazo hipervariable H3 con una longitud inusualmente larga (17 residuos) (Almagro, comunicación personal). En el caso de las clonas positivas contra CII1 una clona de las 7 proviene de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 (L1=7, por tanto corto). En este caso no se observa un H3 particularmente largo sino por el contrario; sin embargo este anticuerpo posee la talla de H2 más larga (10 residuos) observada para los anticuerpos positivos contra CII1. Esta podría ser una explicación de porque reconoce este antígeno o quizás solo este reconociendo un epítope lineal sobre el antígeno.

Para los anticuerpos anti-proteínas también se han encontrado excepciones a la que parece la regla general. La presencia de un L1 largo en la estructura de un anticuerpo anti-proteína genera un sitio de unión al antígeno cóncavo. En estos casos al analizar como ocurre la interacción del antígeno con el anticuerpo se han encontrado dos fenómenos. En algunos casos la interacción no es complementaria, sino que el antígeno se coloca sobre la estructura del sitio de unión dejando vacía la cavidad formada por el L1 largo. En otros casos el antígeno presenta una protuberancia que se encaja en dicha cavidad y el resto de la proteína se acomoda sobre la superficie del sitio de unión (Almagro, comunicación personal). En el caso de las clonas positivas contra NH<sub>2</sub>-LTX una clona de las 7 proviene de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod. Este resultado podría estar dado por el hecho de que este reconociendo algún epítope protuberante sobre la proteína. Esta especulación se puede hacer sobre la base de que esta clona posee un anticuerpo con un H3 muy largo (18 residuos), 6 residuos más largo que la mayoría de las clonas positivas contra este antígeno. Además este H3 es idéntico a otro encontrado en una de las clonas procedentes de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27 (Vn4ch2), por lo que se puede decir que ambos anticuerpos pueden estar reconociendo el mismo epítope. En la tabla 6 se resumen las secuencias de los CDRs para cada una de las clonas positivas para hacer un poco más fácil el análisis.

scFv	CDR1	CDR2	CDR3
Cn24ch1	GFTFTAY	SYDGSK	DMMTYFGDYSDLS
Cn24ch2/ CII1ch5	GFSFTTY	YSGNTN	PYNWNLAVAFDL
Cn24ch3	GGSISSS	HSGSTN	PYNWNLAVAFDL
Cn24ch4	GYTLTDY	PNSGGTN	RPPSSTPYGVFDY
CII1ch1	GFTFSDY	FNGGDKYY	PMVSFDY
CII1ch2	GGSISSGGY	YSGSTYYN	GRVLMVYLDY
CII1ch3	GYTFSNY	AYNGNTN	DRTDYGRMDF
CII1ch4	GFSFTTY	AYNGNTN	PYNWNLAVAFDL
CII1ch6	GFSFTTY		PYNWNLAVAFDL
CII1p1	GDSVSSNSA	TYRSKWYND	SPWSYFDY
Vn4p1/Vn4p4	GFSFTTY		PYNWNLAVAFDL
Vn4p2	GFSFTTY		SNQGYSATWELLPAAFDI
Vn4p3	GFSFTTY		PYNWNLAVAFDL
Vn4p5	GYTFSNY		PYNWNLAVAFDL
Vn4p6	GFSFTTY		PYNWNLAVAFDL
Vn4p7	GFSFTTY		PYNWNLAVAFDL
Vn4ch1	GYTFSNY	AYNFNPN	SNQGYSATWELLPAAFDI

Tabla 6. Comparación de la secuencia de los CDRs en las donas positivas. En la tabla se puede observar que existe un sesgo hacia el uso de ciertos tipos de CDRs. Para el caso del CDR1 el 53% (secuencias en verde) de las donas poseen la misma secuencia. En el caso del CDR2 el 47% de las donas posee la misma secuencia y el mayor por ciento se encuentra en las donas que reconocen a LTX (secuencias en naranja). En el caso del CDR3 un 53% de las donas posee la misma secuencia (secuencias en azul). Este sesgo podría ser una consecuencia del sesgo original pues nótese que la mayor parte del mismo se encuentra concentrado en las donas que proviene de la biblioteca V<sub>H</sub>-A27. En rojo se señalan los CDR3 de las dos donas que reconocen a LTX aunque provienen de diferentes bibliotecas.

Por último el análisis de la especificidad reveló que existen dos anticuerpos que tienen reactividad cruzada contra Cn2 y CII1. El análisis de secuencia reveló que estos dos anticuerpos poseen la misma secuencia o sea son un solo anticuerpo (CII1ch5 y Cn24ch2). El resto de las donas son específicas aun cuando algunas de ellas son muy parecidas en secuencia. Esto último reafirma la importancia del L1 en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.



## **CONCLUSIONES**

- La biblioteca V<sub>H</sub>-A27mod que lleva como gen variable ligero un A27 cuyo L1 (12 residuos) ha sido sustituido por el L1 del gen variable ligero DPK24 (17 residuos) reconoce, preferentemente, a CII1 y Cn2.
- La biblioteca V<sub>H</sub>-A27 que lleva como gen variable ligero a A27 (L1=12 residuos) reconoce, preferentemente, a la NH<sub>2</sub>-LTX.
- Se obtuvo más de un anticuerpo contra cada antígeno.
- La variabilidad de las bibliotecas fue suficiente para seleccionar anticuerpos contra diferentes antígenos.

## **PERSPECTIVAS**

- Determinar la afinidad de los anticuerpos seleccionados contra los antígenos utilizados en este trabajo.
- Determinar si dichos anticuerpos son capaces de afectar la toxicidad "in vivo" de las toxinas contra las cuales fueron seleccionadas.

Con estos dos puntos se redondearía el trabajo que abarca esta tesis y se tendrían datos suficientes para escribir una publicación en una revista internacional.

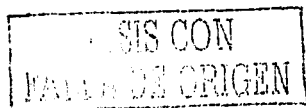
Además las bibliotecas de anticuerpos humanos que aquí se describen son de gran utilidad para trabajos futuros ya que como se ha descrito en la bibliografía y se demostró en este trabajo las mismas podrían utilizarse en la selección de anticuerpos nuevos contra cualquier tipo de antígeno que fuera de interés. Así surgen un sinnúmero de perspectivas nuevas tales como:

- Utilizar un panel de antígenos nuevo y de mayor tamaño que incluyan moléculas de diferentes tamaños, lo cual podría ayudar a confirmar nuestra hipótesis original.
- Estos antígenos podrían ser elegidos atendiendo a alguna característica interesante de modo tal que los anticuerpos obtenidos tengan alguna relevancia.

PLAS CON  
FALLA DE ORIGEN

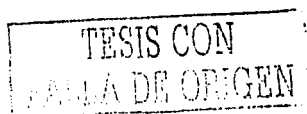
## REFERENCIAS

- Al-Lazikani B, Lesk AM and Chotia C. *J. Mol. Biol.* 273: 927-948.
- Almagro J. C., Hernandez I., Ramirez-Benitez M. C. et al. *Immunogenetics.* 47: 355-363. 1998.
- Almagro J. C., Hernandez I., Ramirez-Benitez M. C. and Vargas-Madrado E. *Mol. Immunol.* 34: 1199-1214. 1997.
- Almagro J.C., Lara-Ochoa F. and Vargas-Madrado E. *Immunogenetics.* 43: 92-96. 1996
- Almagro J.C., Vargas-Madrado E., Zenteno-Cuevas R. et al *Biosystems* 35:25-32. 1995.
- Alzari PM, Lascombe MB & Poljak R. J. *A. Rev. Immun.* 6: 555-580. 1988.
- Alzari PM, Spinelli S, Mariuzza RA, Boulot G, Poljak RJ, Jarvis JM and Milstein C. *Embo J* 9: 3807-14.1990.
- Asan ME and Highsmith WE. *Clinical Biochemistry* 35: 425-445. 2002.
- Asensio J.L., Canada F.J., Bruix M. et al. *Glycobiology* 8:569-77. 1998.
- Barbas CF 3rd, Kang AS, Lerner RA and Benkovic SJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7978-7982. 1991.
- Barbas CF 3rd, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones TM, Zebede SL, Persson MA, Nara PL, Norrby E and et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9339-43. 1992.
- Barbas CF 3rd, Bain JD, Hoekstra DM and Lerner RA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4457-61. 1992.
- Barnett DW, Liu J, Mister S. *Pflugers Arch.* 432: 1039. 1996.
- Becerril B, Corona M, Garcia C, Bolivar F and Possani LD. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 14: 339-357. 1995.
- Becerril B, Vazquez A, Garcia C, Corona M, Bolivar F and Possani LD. *Gene* 128: 165-171. 1993.
- Bolger MB and Sherman MA. *Methods Enzymol* 203: 21-45. 1991.
- Breitling F, Dubel S, Seehaus T, Klewinghaus I and Little M. *Gene* 104: 147-153. 1991.
- Burton D.R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 16;94(19):10018-23. 1997.
- Burton D.R. and Barbas C.F. III. *Advan. Immunol.* 57: 191-280. 1994.
- Calderon-Aranda ES, Hozbor D and Possani LD. *Toxicon* 31: 327-337. 1993.
- Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD and Maelicke A. *Nature* 296: 90-91. 1982.
- Catterall WA. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 15-43. 1980.
- Chiswell DJ and McCafferty J. Phage antibodies; will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies?. *Trens Biotechnol.* 10: 80-84. 1992.
- Chomczynski P and Sacchi N. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
- Chothia C at al *Science* 233, 755-758. 1986.
- Chothia C. and Lesk A.M. *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. 1987.
- Chothia C., Lesk A.M., Tramontano A. et al. *Nature* 342: 877-883. 1989.
- Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB and Winter G. *J Mol Biol* 227: 799-817. 1992.
- Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD and Winter G. *Nature* 352: 624-628. 1991.
- Dall'Acqua W and Carte P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 443-450. 1998.
- Davies DR and Metzger H. *J. A. Rev. Immun.* 1: 87-117. 1983.
- Davies DR, Padlan EA and Sheriff S. *Annu Rev Biochem* 59: 439-473. 1990.
- de la Paz P, Sutton BJ, Darsley MJ & Rees AR. *EMBO J* 5: 415-425. 1986.
- De Potter WP, Partoens P, Schoups A, Llona I, Coen EP. *Synapse* 25: 44. 1997.
- Debin JA, Maggio JE and Strichartz GR. *Am. J. Physiol.* 264: C361-C369. 1993.



- Dent MAR, Possani LD, Ramirez GA and Fletcher PL Jr. *Toxicon* 18: 343-350. 1980.
- Dehesa-Dávila M. *Toxicon* 27: 281-284. 1989.
- Dehesa-Dávila M and Possani LD. *Toxicon* 32, 1015-8. 1994.
- Edelman GM and Gall WE *Ann Rev Biochem* 38, 415-66. 1969.
- Farilla L, Tiberti C, Luzzago A, Yu L, Eisenbarth GS, Cortese R, Dotta F and Di Mario U. *Eur J Immunol* 32: 1420-7. 2002.
- Fehlhammer H, Schiffer M, Epp O, Colman PM, Lattman EE, Schwager P, Steigemann W and Schramm HJ. *Biophys Struct Mech* 1, 139-46. 1975.
- Frontali N, Ceccarelli B, Gorio A, Mauro A, Siekevitz P, Tzeng MC, Hurlbut WP. *J. Cell Biol.* 68:462. 1976.
- Gao G, Mao S, Kaufmann G, Wirsching P, Lerner RA and Janda KD. *PNAS* 99: 12612-12616. 2002.
- García ML, Hanner M, Knaus HG, Koch R, Schmalhofer W, Slaughter RS and Kaczorowski GJ. *Adv. Pharmacol.* 39: 425-471.1997.
- Garrard LJ, Yang M, O'Connell MP, Kelley RF and Henner DJ. *Biotechnology (N Y)* 9: 1373-1377. 1991.
- Gomez,I. Oltean,D.I. Gill,S. Bravo,A. Soberon,M. *J.Biol.Chem.* 276 28906-28912. 2001.
- Gordon D, Savarin P, Gurevitz M and Zinn-Justin S. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17: 131-159. 1998.
- Granier C, Novotny J, Fontecilla-Camps JC, Fourquet P, El Ayeb M and Bahraoui E. *Molecular Immunology* 26 (6): 503-513. 1989.
- Griffiths AD and Duncan AR. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 102-108. 1998.
- Griffiths A.D., Williams S.C., Hartley O. et al. *EMBO J.* 13: 3245-3260. 1994.
- Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorlick BD, Hughes-Jones NC and et al. *Embo J* 12: 725-734. 1993.
- Hoess RH. *Chem. Rev.* 101: 3205-3218. 2001.
- Hood L, Gray WR, Sanders BG and Dreyer WJ. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 32: 133. 1967.
- Hoogenboom HR and Winter G. *J Mol Biol* 227: 381-388. 1992.
- Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P and Winter G. *Nucleic Acids Res* 19: 4133-4137. 1991.
- Kabat EA *Adv Protein Chem* 32: 1-75. 1978.
- Kabat EA, Wu TT and Bilofsky H. *J Biol Chem* 252: 6609-6616. 1977.
- Klein R, Jaenichen R and Zachau HG. *Eur J. Immunol.* 23: 3248-3271.1993.
- Knobil E and Neill JD. *Raven Press New York, USA.* 2001.
- Kohler G and Milstein C. *Nature* 256, 495-497. 1975.
- Lara-Ochoa F., Almagro J.C., Vargas-Madrado E. et al *J. Mol. Evol.* 43: 678-684. 1996.
- Lebreton F, Delepierre M, Ramirez AN, Balderas C and Possani LD. *Biochemistry* 33: 11135-11149. 1994.
- Lelianova VG, Davletov BA, Sterling A, Arman MA, Grishin EV, Totty NF and Ushkaryov YA. *J. Biol. Chem.* 272: 21504. 1997.
- Licca AF, Becerril B and Possani LD. *Toxicon* 34: 843-847. 1996.
- MacCallum RM, Martin AC and Thornton JM. *J. Mol Biol.* 262: 732-745. 1996.
- Marks JD, Hoogenboom HR, et al. By-passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage. *J. Mol. Biol* 222: 581-597. 1991.

- Marks JD, Ouwehand WH, Bye JM, Finnern R, Gorick BD, Voak D, Thorpe SJ, Hughes-Jones NC and Winter G. *Biotechnology (N Y)* 11: 1145-1149. 1993.
- McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G. And Chiswell D.J. *Nature* 348: 552-554. 1990.
- Mian IS, Bradwell AR and Olson AJ. *J Mol Biol* 217: 133-151. 1991.
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R and Phillips M. *Nature* 313: 316-318. 1985.
- Miranda F, Kopeyan C, Rochat C and Lissitzky S. *Eur. J. Biochem.* 16: 514-523. 1970.
- Moulard, M., Phogat, S. K., Shu, Y., Labrijn, A. F., Xiao, X., Binley, J. M., Zhang, M. Y., Sidorov, I. A., Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR and Dimitrov DS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6913-6918. 2002.
- O'Connell D, Becerril B, Roy-Burman A, Mike Daws and Marks JD. *J. Mol. Biol.* 321: 49-56. 2002.
- Orlova EV, Rahman MA, Gowen B, Volynski KE, Ashton AC, Manser C, van Heel M and Ushkaryov YA. *Nat Struct Biol* 7: 48-53. 2000.
- Padlan EA and Davies DR. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 819-823. 1975.
- Padlan EA, Abergel C and Tipper JP. *Faseb J* 9: 133-139. 1995.
- Padlan EA *Mol Immunol* 31: 169-217. 1994.
- Possani LD, Becerril B, Delepierre M and Tytgat J. *Eur. J. Biochem.* 264: 287-300. 1999.
- Possani LD, Martin B and Svendsen I. *Carlsberg Res. Comm.* 47: 285-289. 1982.
- Possani LD. In *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T., ed.) 2: 513-550. Marcel Dekker, Inc., New York. 1984.
- Raag R and Withlow M. *FASEB J.* 9: 73-80. 1995.
- Rochat H, Bernard P and Couraud F. *Advances in Cytopharmacology* 3: 325-334. 1979.
- Rodi DJ and Makowski L. *Curr. Opin Biotechnol.* 10: 87-93. 1999.
- Rojas G, Almagro JC, Acevedo B and Gavilondo JV *J Biotechnol* 94: 287-298. 2002.
- Rosenthal L and Meldolesi J. *Pharmacol. Ther.* 42: 115. 1989.
- Smith GP. *Science* 228: 1315-1317. 1985.
- Soderlind E, Strandberg L, Jirholt P, Kobayashi N et al.. *Nature Biotechnology.* 18: 852-856. 2000.
- Thayer M.M., Olender E.H., Arvai A.S., et al *J. Mol. Biol.* 291:329-45. 1999.
- Tomlinson I.A., Cox J.P., Gherardi E. et al *EMBO J.* 14:4628-4638. 1995.
- Tramontano A, Chothia C and Lesk AM. *J Mol Biol* 215: 175-82. 1990.
- Tse FW and Tse A. *Endocrinology* 140: 3025. 1999.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M and Sudhof TC. *Science* 257: 50. 1992.
- Valdivia H and Possani LD. *Trends Cardiovascular Med.* 8: 111-118. 1998.
- Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ and Coronado R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12185-12189. 1992.
- Valdivia HH, Martin BM, Ramirez AN, Fletcher PL Jr and Possani LD. *J. Biochem.* 116: 1383-1391. 1994.
- Vargas-Madrado E., Lara-Ochoa F. and Almagro J.C. *J. Mol. Biol.* 254: 497-504. 1995.
- Vaughan TJ, Osbourn JK and Tempest PR. *Nat. Biotechnol.* 16: 535-539. 1998.
- Volynski KE, Nosyryeva ED, Ushkaryov YA and Grishin EV. *FEBS Lett* 442: 25. 1999.
- Webster DM, Henry AH and Rees AR. *Curr. Op. Struct. Biol.* 4: 123-129. 1994.
- Williams SC, Frippiat JP, Tomlinson IA, Ignatovich O, Lefranc MP and Winter G. *J. Mol. Biol.* 264: 220-232. 1996.
- Wilson IA, Rini JM, Fremont DH, Feiser GG and Sture EA. *Meth. Enzymol.* 203: 153-176. 1991.





- Wilson IA and Stanfield RL. *Curr Opin Struct Biol* 4: 857-67. 1994.
- Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E. and Hoogenboom HR. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455. 1994.
- Winter G and Milstein C. *Nature* 349, 293-9. 1991.
- Zamudio F, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P and Possani LD. *Eur. J. Biochem.* 204: 281-292. 1992.
- Zlotkin E, Miranda F and Rochat H. *Handbook of experimental Physiology* 48: 317-369. 1978.
- Zwick MB, Shen J and Scott JK. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 427-436. 1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN