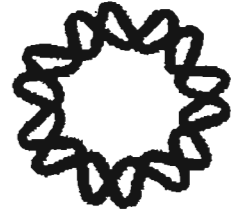
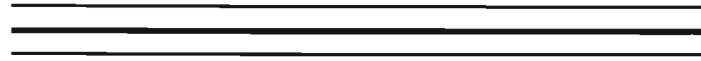


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

**GENERACION DE VARIANTES DEL FRAGMENTO VARIABLE DE CADENA SENCILLA
DEL ANTICUERPO BCF2 CON MAYOR AFINIDAD CONTRA LA TOXINA Cn2 POR
EVOLUCION DIRIGIDA.**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

M. en C. VICTOR RIVELINO JUAREZ GONZALEZ

TUTOR:

DR. BALTAZAR BECERRIL LUJAN.

CUERNAVACA, MORELOS

2005

M: 349622



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mi esposa y A mi familia

Gracias Vero por transformar mi vida a cada instante, por hacer de mi un hombre feliz, por llenar los espacios vacíos que en mi existían, por amarme tanto y de esa manera, por apoyarme en todo de una forma incondicional. TE AMO MI REINA, a tu lado no le temo a nada y en la oscuridad mi lánguida luz resplandece descomunadamente.

A ti te dedico este trabajo del cual me siento infinitamente orgulloso y satisfecho.

Gracias por los viajes a los mares y albercas, a las montañas y a Real de catorce (continuaremos caminando siempre y conociendo aquí y allá y hasta por allá y el más allá), recuerda que somos uno y eso nos hace más dignos y fuertes.

A mi familia: Los quiero y los amo mucho, me es grato decirles que son un gran ejemplo a seguir.

A mi mamá Eloisa González Sánchez por tenerme, quererme y apoyarme en todo momento.

A Juanita, Lupita, Mario y a Rafa.

A mi familia completa y fuerte: Juárez-González-Quintero-Hernández-Melendez-Mendez-Lara-Roman-Ramirez-Guapo-Sanchez. Aquí van todos:

Juana Juárez (Juanita-comadre), Emmanuel Ramírez (compadre), Ingrid Jocelyn (Jocelyn-ahijada), Alfonso Ramírez (Alfonso), Josefina Guapo (José); Guadalupe Juárez (Lupita), Arturo Lara Román (Panther), Aldair (Yir-Ahijado); Mario Alberto Juárez (Toro), Gloria Meléndez (Gloria), Valeria Mariel (Vale), Vanesa Michel (Vane), Encarnación Meléndez (Chon); Rafael Juárez (Rafa), Olivia Sánchez (Olivia), Brenda Olivia (Brenda), Cynthia Liv (Cynthia); Victor Rivelino Juárez Gozález (Rive, Gult, Caballo, Coconete, Riverpool, River Plate, Rivel, Catalina y Vic), Verónica Quintero (Vero), Gabriel Quintero (Don Gabi), Cecilia Hernández (Suegrita), Gabriel Quintero (compadre), Paulina (Comadre), Hannya Sahorí (Hanisu-ahijada), Alina Quintero (Alina), Mario Rivera (Maruco-Marucho), Gabriela Rivera (Gabrielita), Daniel Quintero (Dany), Sandy (Chu-Chu), Daniela Quintero (Danielita), Aldair Quintero (Pizito Jr.), Ismael Quintero (Isma), Mary, Briseida.

Gracias o todos ustedes por todo lo que me han enseñado, por abrirme las puertas de su confianza y por creer en mí. Los respeto y los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Baltazar Becerril por permitirme utilizar el despliegue en fagos como una herramienta de frontera y creer en la evolución dirigida como una herramienta de cambio y éxito; por que me permitió ser una semilla en su línea de investigación y por todo el apoyo que me brindo para realizar mis estudios. Gracias de antemano por tus valiosos consejos y críticas.

Al Dr. Lourival Posanni. Gracias por dejarme conocer al alacrán *Centruroides noxius* y a la toxina Cn2, gracias por sus excelentes comentarios e invaluable ayuda durante mis estudios.

A mi comité tutorial: Dr. Joel Osuna, Dra. Goar Gevorkian, Dr. Lourival Posanni y Dr Baltazar Becerril por su orientación y sus valiosos comentarios.

A los integrantes del jurado: Dr. Mario Soberón, Dr. David Romero, Dr. Guillermo Gosset, Dr. Edmundo Calva, Dr. Lorenzo Segovia, Dr. Gabriel del Rio y Dr. Baltazar Becerril, por la revisión y discusión de la tesis y por su valiosa critica y puntos de vista.

A las Dras. Verónica Quintero y Lidia Riaño, que estuvieron de principio a fin es este trabajo y sobre todo en los momentos más duros, por su apoyo incondicional en los experimentos de la Evolución dirigida, el despliegue en fagos y en las pruebas de neutralización.

A Mauricio Ortiz por la determinación de las constantes de afinidad, de los anticuerpos por la toxina Cn2, en el BIACORE.

A Timoteo Olamendi, Cipriano Balderas y Fredy Coronas por su apoyo técnico e incondicional para realizar este trabajo.

Al Dr. Ernesto Ortiz por su apoyo en la interpretación de la relación estructura-función, con los modelos de las mutantes y la toxina.

A Linda Espinosa por su constante apoyo, de igual manera a Marisol Cheves y María Canela por todos los tramites realizados.

A los integrantes del Laboratorio Posanni–Becerril:

Georgina Gurrola (Gina), Fernando Zamudio (Zam), Fredy Coronas (Fredy), Ricardo de la Vega (Richard), Cipriano Balderas (Chano del Piero), Pavel Espino (Mapi), Blanca Inés, Christian Carreño (Cristiano Ronaldo), Marisol Chevez (Marisol), María Canela (Mari), Erica Chavira, Jacqueline Barona, Juana María (Juanita), Georgina Estrada (Gina E), Linda Solaris (Ronaldiña), Rita Restano (Rita), Martha Ramírez (Martuchis), Jesús García (Chucho), Joacir (el loco de Curitiba), Ernesto Prado (Neto), Gerardo Corzo (Corzo), Cesar Batista, Patricia Salas (Paty), Sergio Agustín, Oscar Villa, Elisa Encarnación.

Verónica Quintero (Vero), Timoteo Olamendi (Timotín zidan de Oliveira Portugal), Lidia Riaño (Umbarila), Rosalba Sánchez (Ross), Bernardo Cortina (Chuper Bernardo), America Rivera (Chiquiti Pau), Alma Ruth (Chisti dina), Consuelo García (Con), Martha Pedraza, Israel Alcántara (Isra). Itzel Amaro, Ernesto Ortiz (Ernes), Brenda Linda (Pollo), Luis Del Pozo y Santos Ramírez.

Por todo el apoyo, colaboración y la gran amistad que me brindaron siempre.

Al apoyo económico de CONACyT (113972) y al Instituto Bioclon de los laboratorios Silanes (proyecto P–156).

A la unidad de Síntesis: Dr. Paúl Gaytan, Eugenio López y Santiago Becerra, por su eficiencia, así como por la síntesis de los oligos y la entrega puntual de los mismos.

Al personal del Bioterio: Dra. Elizabeth Mata, Bárbara Mondragón, Sergio González, Rubén Blancas, Miguel Ángel Trujillo y Ricardo Mondragón, por el mantenimiento, cuidado de los ratones CD1 y su constante apoyo en la entrega de los mismos, así como su invaluable ayuda.

A la unidad de computo: Bsc. Alma Martínez, M en C. Jérôme Verleyen, Ing. Arturo Ocadiz Ramírez, y al M en C. José Ricardo Ciria, por su asistencia computacional.

Al personal administrativo por mantener las instalaciones del Instituto de Biotecnología de primer nivel: Al ingeniero Acosta y compañía.

DEDICATORIAS

A mis amigos y amigas que siempre están en las buenas y en las malas: A Lidia (Umbarila) y a Linda solaris (Ronaldinha).

A Ricardo Cano (Torito), Renato León (Rena), Aristides III Sampieri (Muñeco-Aris), Martín Peralta (Martillo), Rodrigo Cuervo (Ruso), Filiberto Sánchez (Fili) y Adrián (Romario).

A los que me fui encontrando en el camino y me mostraron su gran amistad: Raúl Noguez (Chaparrin) y Alfredo Morales (José Feliciano).

Al equipo de fútbol sideroforos (equipo longevo y multi campeón), actuales monarcas del IBT (Torneo perfecto y limpio): a Martín (Martillo), Aristides (Aris), Romualdo (Romi), Alberto (Bebeto), Wualdo, Luis (Luizhao), Alberto (Beto), Bruno (Tronco), Agustín (Agus), Israel (Isra, venado), Raúl Huertas (el español) y Aportela, gracias por todas las finales jugadas tan intensamente y por todos los trofeos ganados, pero sobre todo por la gran amistad que formamos. También a todos los sideroforos que ya se fueron.

Al equipo de Volley ball los Enzimosos (Jérôme y compañía), gracias por todas las finales jugadas tan intensamente y por todos los trofeos ganados, pero sobre todo por la amistad que formamos.

A toda la banda de los Institutos de Biotecnología y Física, así como a los del centro de Ciencias geonómicas y CRIM.

A México lindo y querido.

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

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Baltazar Becerril Luján.

A medida que nos demos cuenta de que nuestro breve paso por la vida es muy importante y si en esta defendemos la verdad constantemente, la humanidad y nuestros seres queridos nos lo agradecerán infinitamente.

VICTOR RIVELINO

Si la intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre.

ALBERT EINSTEIN

INDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	13
1.- RESUMEN.....	14
2.- SUMMARY.....	14
3.- INTRODUCCION.....	15
Alacranismo.....	15
Antivenenos.....	15
Toxina Cn2.....	17
Anticuerpos.....	18
Despliegue en fagos (Phage display)	20
Características del fago M13 y ciclo de infección.....	21
Expresión de proteínas en el fago filamentoso M13.....	22
La evolución dirigida.....	24
ANTECEDENTES.....	25
Anticuerpos monoclonales y scFvs generados contra toxinas de alacrán.....	25
4.- JUSTIFICACION.....	26
5.- HIPOTESIS.....	26
6.- OBJETIVOS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
7.- MATERIALES Y METODOS NO PUBLICADOS.....	27
A) Análisis de la expresión del scFv de BCF2 por SDS-PAGE.....	27
B) Elección del sistema para la recuperación de los fago-anticuerpos.....	27

C) ELISA de fago-anticuerpos de cuarta ronda de tamizado.....	27
D) Caracterización de las variantes seleccionadas como fago-anticuerpos.....	27
1) Pruebas de reconocimiento a Cn2 en ELISA.....	27
2) Estabilidad funcional.....	28
E) Pruebas de neutralización en la relación molecular 1:1 (toxina/scFv dimérico).....	28
F) Ensayos de desplazamiento en BIACORE.....	28
8.- RESULTADOS PUBLICADOS.....	29
ARTICULO 1.....	30
9.- RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	41
A) Análisis de la expresión del scFv de BCF2 por SDS-PAGE.....	41
B) Elección del sistema para la recuperación de los fago-anticuerpos.....	41
C) ELISA de fago-anticuerpos de cuarta ronda de tamizado.....	42
D) Caracterización de las variantes seleccionadas como fago-anticuerpos.....	43
1) Pruebas de reconocimiento a Cn2 en ELISA.....	43
2) Estabilidad funcional.....	44
E) Pruebas de neutralización en la relación molecular 1:1 (toxina/scFv dimérico).....	45
F) Ensayos de desplazamiento en BIACORE.....	46
10.- DISCUSION.....	50
11.- CONCLUSIONES.....	56
12.- PERSPECTIVAS.....	56
13.- BIBLIOGRAFIA.....	57
14.- ANEXOS.....	61
Anexo 1.- Fotografía del alacrán <i>Centruroides noxius</i>	61
Anexo 2.- Mapa del plásmido pSyn2.....	62

Anexo 3.- Mapa del plásmido pSyn1.....	63
Anexo 4.- Cromatogramas de exclusión molecular de los scFvs.....	63
Anexo 5.- Comparación de las disociaciones evaluadas en BIACORE.....	65
Anexo 6.- ARTICULO 2.....	66

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Digestión del anticuerpo con las proteasas pepsina y papaína.....	10
Figura 2.- Estructura primaria y terciaria de la toxina Cn2.....	11
Figura 3.- Esquemas de un anticuerpo completo tipo IgG y un scFv.....	12
Figura 4.- Gel de SDS-PAGE del scFv de BCF2.....	44
Figura 5.- ELISA de fago-anticuerpos de cuarta ronda de selección contra la toxina Cn2.....	46
Figura 6.- ELISA de reconocimiento hacia Cn2, usando diferentes concentraciones de fago-anticuerpos (1×10^7 - 1×10^{12} fagos/ml).....	47
Figura 7.- ELISA de estabilidad funcional de los fago-anticuerpos, con diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio.....	48
Figura 8.- Desplazamiento en el BIACORE del BCF2, triple mutante y 6009F.....	50
Figura 9.- Desplazamiento en el BIACORE de la triple mutante, BCF2 y 6009F.....	51
Figura 10.- Desplazamiento en solución en el BIACORE del scFv triple mutante y el BCF2.....	52

INDICE DE TABLAS.

	Página
Tabla 1.- Principales especies del genero <i>Centruroides</i> en México.....	8
Tabla 2.- Genes del fago filamentoso M13 y su función.....	14
Tabla 3.- Moléculas desplegadas en el fago filamentoso M13.....	15
Tabla 4.- Liberación de los fago-anticuerpos del scFv de BCF2 ante diferentes tratamientos.....	45
Tabla 5.- Experimentos de neutralización de los scFvs diméricos, derivados del scFv de BCF2, con una relación molecular 1:1 (toxina : anticuerpo).....	49

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Å	Angstrom
ADN	Acido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
BSA	álbumina de suero bovino
csADN	Acido desoxirribonucleico de cadena sencilla
Da	Dalton
Fab	Fragmento de anticuerpo (V_H-C_{H1} y V_L-C_L)
Gluc	Glucosa
Kb	Kilobase (mil pares de bases)
kDa	Kilodalton
K_D	constante de afinidad
k_{on}	constante cinética de asociación
k_{off}	constante cinética de disociación
M	concentración molar
Mg^{2+}	ión magnesio
Mn^{2+}	ión manganeso
n	nano (10^{-9})
NMR	resonancia magnética nuclear
p	pico (10^{-12})
RU	Unidades de resonancia
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla
TEA	Trietilamina
α	alfa
β	beta
μ l	microlitro (10^{-6} litro)
μ m	micrometro (10^{-6} metro)

Toxinas que afectan canales de sodio de mamífero

Cn2
ClI1
ClI2
Pg8
FII (Fracción toxica II)

Especie

<i>Centruroides noxius</i>
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>
<i>Parabutus granulatus</i>
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>

1. RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo la construcción, la expresión y la caracterización funcional del fragmento variable de cadena sencilla del anticuerpo monoclonal BCF2 (scFv de BCF2). Los resultados de la caracterización del scFv indicaron que dicha construcción mantiene la capacidad de reconocer específicamente a la toxina Cn2, pero no neutraliza sus efectos. Por esta razón, se empleó la evolución dirigida para obtener un scFv con capacidad neutralizante. Se generaron 3 bancos del scFv de BCF2 con diferente tasa de mutación (baja, media y alta). Los bancos fueron evaluados por medio del despliegue en fagos, en presencia de concentraciones decrecientes de la toxina Cn2, en cuatro rondas de tamizado. Mediante ensayos de ELISA de proteína soluble, se lograron identificar dos mutantes denominadas: G5 (Q27R y V51A) y B7 (N35I), las cuales presentaron una mayor afinidad y estabilidad que el scFv de BCF2. Sin embargo, estas clonas fueron incapaces de neutralizar los efectos de la toxina Cn2. Posteriormente, la estrategia que se utilizó fue la de la combinación de las mutaciones presentes en los anticuerpos (G5 y B7), con lo cual se obtuvo un anticuerpo denominado scFv Triple mutante. Este anticuerpo es neutralizante de la toxina Cn2 y presenta la mejor afinidad y estabilidad, con respecto a las demás variantes obtenidas. Estos resultados abren el camino para la generación de antiseros recombinantes neutralizantes de las toxinas del veneno de alacranes basados en anticuerpos de cadena sencilla (scFvs).

2. SUMMARY

In this work the construction, expression and functional characterization of the scFv format of monoclonal antibody BCF2 (scFv of BCF2), was performed. The results of this characterization indicated that this scFv maintained the capacity to recognize the Cn2 toxin, but did not neutralize its effects. These results prompted us to subject it to directed evolution with the purpose to obtain variants with neutralizing capacity. We generated three libraries of the scFv of BCF2 with different rates of mutation (low, medium and high). Libraries were panned by phage display in the presence of four decreasing concentrations of the Cn2 toxin. Selected scFvs were evaluated by ELISA of soluble protein. Two mutants (G5 and B7), showed an improvement in affinity and stability with respect to scFv of BCF2. Nevertheless, both mutants were unable to neutralize the effects of the Cn2 toxin. The mutations present in G5 and B7 were combined by PCR giving rise to a Triple mutant, which showed the best affinity and stability of all the variants generated. This Triple mutant was capable of neutralizing the Cn2 toxin. These results pave the way for the generation of recombinant neutralizing antisera against scorpion stings based on scFvs.

3. INTRODUCCION

Alacranismo.

Uno de los problemas de salud pública en México, es la intoxicación por picadura de alacranes del género *Centruroides*. La tasa anual de accidentes reportados que son causados por estos alacranes es superior a 200,000 casos (Tay et al, 2004). La Tabla 1, muestra las especies del género *Centruroides* peligrosas a humanos y los estados de la republica más afectados.

Tabla 1. Principales especies del género *Centruroides* en México.

Especies	Estado de la república
<i>Centruroides noxius</i> *	Nayarit
<i>Centruroides suffusus</i>	Durango
<i>Centruroides limpidus tecomanus</i>	Colima
<i>Centruroides elegans</i>	Jalisco, Guerrero y Oaxaca
<i>Centruroides infamatus</i>	Michoacán, Jalisco y Guanajuato
<i>Centruroides pallidiceps</i>	Sinaloa, Sonora y Nayarit
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	Puebla, Morelos, Guerrero
<i>Centruroides sculpturatus</i>	Sonora

* Es considerado como el alacrán más tóxico del país (Tay et al, 2004).

El veneno del alacrán está constituido por proteínas (enzimas), péptidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, lípidos y sales, además de presentar una gran variedad de toxinas que modifican el flujo iónico de los canales de sodio, potasio, cloro y calcio (Possani et al, 1999). Dicho veneno es inyectado a la víctima por vía subcutánea, de donde se distribuye al plasma, a los diferentes tejidos y órganos, posteriormente es eliminado por la orina y la secreción biliar (Sevcik et al, 2004). Los principales componentes del veneno, responsables de las alteraciones fisiológicas en las células de los mamíferos, son dos grupos de toxinas: las que afectan a canales de sodio y las que afectan a canales de potasio de las membranas celulares, principalmente del sistema nervioso central y músculo-esquelético (Possani et al, 1999, Zhu et al., 2004 a y Zhu et al., 2004 b).

Antivenenos.

Para contender con la intoxicación por picadura de alacrán, desde el siglo XIX hasta la década de los años 1930s, se emplearon los antivenenos de primera generación o sueros crudos, compuestos por una gran cantidad de moléculas heterólogas, las cuales llegaban a causar choque anafiláctico. Posteriormente, se

utilizaron los antivenenos de segunda generación, formados únicamente de inmunoglobulinas purificadas por los procedimientos clásicos, con lo cual las reacciones adversas disminuyeron al utilizar dichos sueros.

El uso de anticuerpos completos de origen animal como tratamiento terapéutico, provocaba problemas de inmunogenicidad, debido a su carácter heterólogo, es decir que son reconocidos como agentes extraños al organismo y son rechazados. Para contender con este serio problema, los anticuerpos completos pueden ser digeridos con proteasas, con lo cual se pueden obtener dos tipos de fragmentos de anticuerpos: los fragmentos $F(ab')_2$ y el Fab, los cuales pueden ser usados en aplicación terapéutica con menor riesgo de inmunogenicidad (Figura 1).

Los $F(ab')_2$ son fragmentos que carecen del segmento Fc (en donde se localizan las funciones efectoras de las inmunoglobulinas), disminuyendo así la inmunogenicidad. Dichos fragmentos $F(ab')_2$, se obtienen de la digestión del anticuerpo completo con la enzima pepsina, la cual actúa sobre el extremo carboxilo de la región de bisagra, dando como resultado la obtención de los siguientes fragmentos: un fragmento $F(ab')_2$ y un fragmento Fc (Figura 1).

Los Fab son fragmentos que se obtienen cuando la proteasa papaína actúa sobre el amino terminal de la región de la bisagra del anticuerpo completo, provocando la formación de dos fragmentos Fab y un fragmento Fc; en ambos casos el fragmento Fc es eliminado. El fragmento Fab consiste de los dominios V_H-C_{H1} y V_L-C_L unidos covalentemente mediante un enlace disulfuro (Winter y Milstein, 1991 y Rothlisberger et al, 2005) (Figura 1). Otra característica importante de los Fabs es su tamaño de 50 kDa, el cual es mucho menor que el de los anticuerpos completos (150 kDa). El tamaño de los Fabs mejora su biodistribución (Wright, 1992 y Rothlisberger et al, 2005) y es más fácil manipularlos. Los Fabs mantienen su estabilidad y su especificidad, de una forma muy similar a como lo hace el anticuerpo completo del cual provienen. Sin embargo, la generación de los fragmentos Fab de un anticuerpo, por digestión enzimática, presenta varios problemas tales como los bajos rendimientos de producción, (debido a que no hay una digestión completa de los anticuerpos) y el elevado costo que representa su obtención (Adair, 1992). Actualmente, el tratamiento más exitoso contra los venenos de alacranes *Centruroides*, está constituido por faboterápicos $F(ab')_2$, o sueros de tercera generación, los cuales neutralizan de una manera eficiente y rápida la acción de los diferentes venenos. Los sueros de tercera generación han disminuido notablemente el número de muertes al año. La mortalidad durante las décadas de los setenta y ochentas fue de 700 personas al año, en 1998 fue de 136 personas y en el año 2002 fue de 70 personas (Boletín epidemiológico semanal, Secretaría de Salud de México).

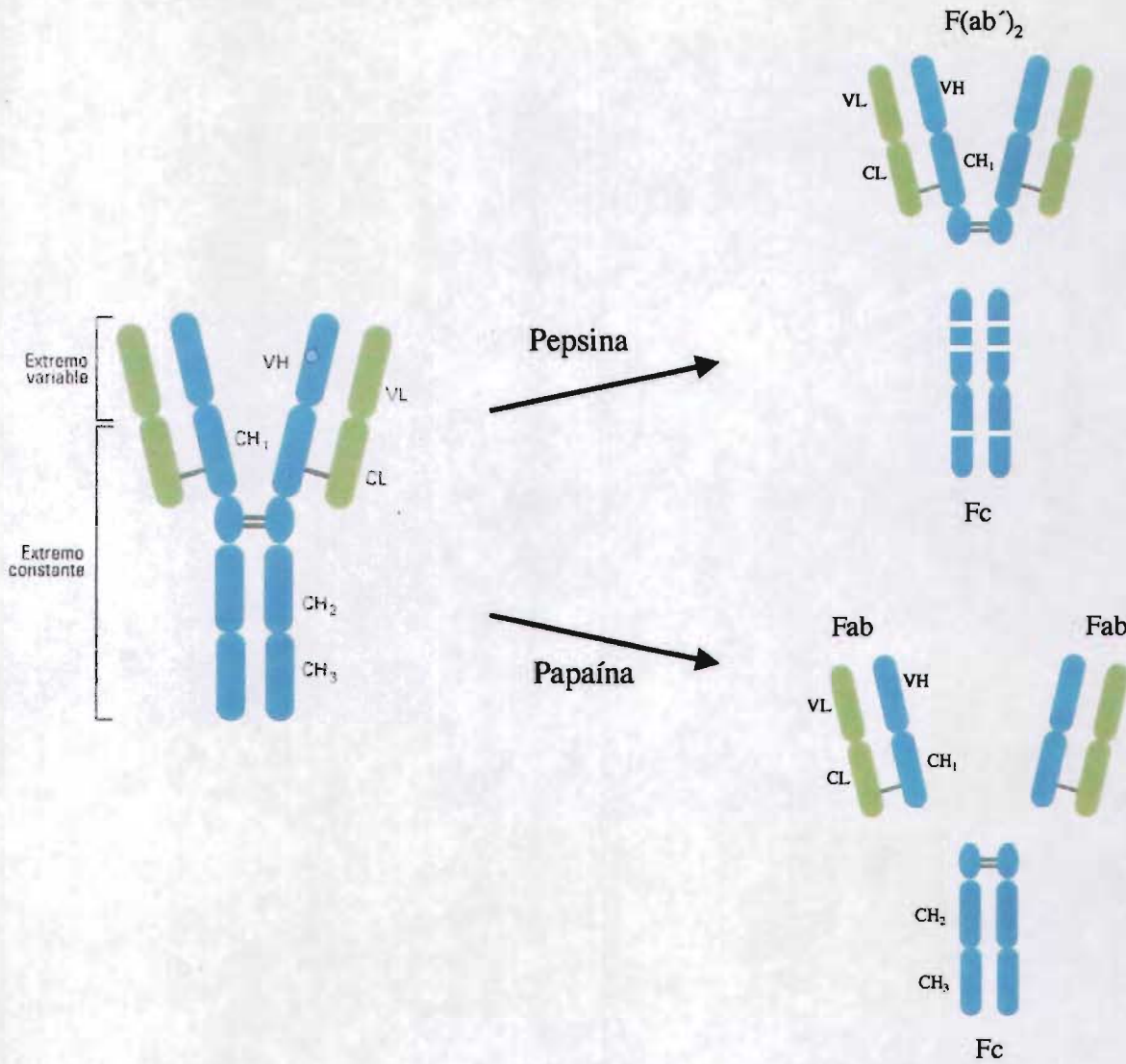


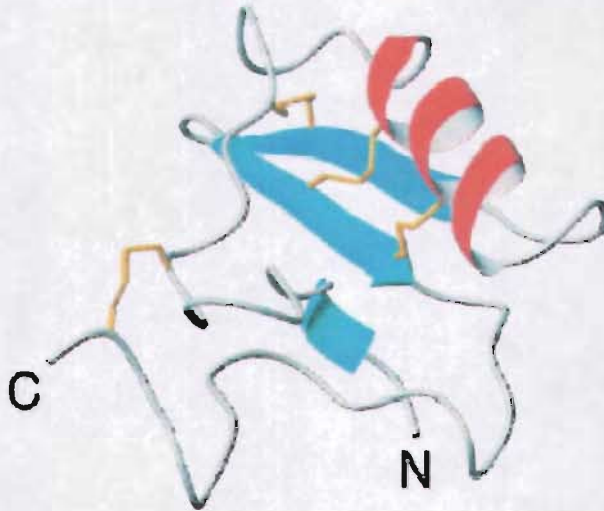
Figura 1. Digestión del anticuerpo con las proteasas pepsina y papaína.

Tóxina Cn2.

El alacrán *Centruroides noxius* (Anexo 1), es considerado como uno de los alacranes más peligrosos en el país, debido a que esta especie contiene el veneno más tóxico de todos los alacranes de México: su LD_{50} es de 5 $\mu\text{g}/20$ gr de ratón cepa CD1 hembra (Dent et al, 1980). Los componentes del veneno de *C. noxius*, pueden ser separados a través de tres cromatografías diferentes: exclusión molecular, intercambio iónico y HPLC (Zamudio et al, 1992). A través de estas cromatografías se aisló la toxina Cn2, la cual constituye el componente peptídico más abundante del veneno y representa el 6.8% del veneno total. Cn2 tiene un peso molecular de 7348 Da y su estructura primaria está compuesta por 66 aminoácidos (Figura 2). La toxina

presenta una estructura tridimensional formada de 3 hebras β antiparalelas y una hélice- α , estabilizada por 4 puentes disulfuro (Pintar et al, 1999) (Figura 2). La toxina Cn2 ejerce su actividad sobre los canales de sodio de los mamíferos y su LD₅₀ es de 0.25 μ g/20 gr de ratón cepa CD1 hembra (Zamudio et al, 1992).

a)



b)

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQYGGAGGYCYAFACWCTHLYEQAIWPLPNKRCS

Figura 2. a) Estructura tridimensional de la toxina Cn2 y b) estructura primaria.

Anticuerpos.

Los anticuerpos son glicoproteínas generadas por el sistema inmune, como mecanismo de defensa contra agentes extraños al organismo. La estructura del anticuerpo está compuesta por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (H, de su sigla en inglés Heavy) y dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas (L, de su sigla en inglés Light).

Cada cadena ligera (L) está formada por un dominio variable N-terminal (V_L) y un dominio constante (C_L). El dominio variable puede ser de dos tipos: V_k o V_λ dependiendo de la secuencia de aminoácidos que las formen. Cada cadena pesada (H) está constituida por un dominio variable N-terminal (V_H), tres dominios constantes (C_{H1-3}) y una región de bisagra (Figura 3). Los dominios variables (V_H , V_L) están formados por cuatro regiones con secuencias relativamente conservadas

llamadas frameworks o andamiajes (FR₁, FR₂, FR₃ y FR₄), los cuales separan y soportan tres regiones de secuencias hipervariables denominadas regiones determinantes de complementaridad (CDR₁, CDR₂ y CDR₃). Los CDRs adoptan la estructura de asas o "loops"; en estos elementos de estructura secundaria se encuentran la mayoría de los aminoácidos que reconocen toda la diversidad de antígenos.

Los dominios constantes 1 y 2 de la cadena pesada (C_{H1} y C_{H2}), están enlazados entre sí por una secuencia de aminoácidos llamada región "bisagra", la cual es rica en prolinas. En esta región están ubicadas las cisteínas que dan lugar a los enlaces disulfuro que unen a las dos cadenas pesadas (Figura 3). Los anticuerpos contienen carbohidratos unidos, los cuales están en el segundo dominio de la región constante. La unión se forma generalmente con el grupo NH₂ de la asparagina de la N-acetilglucosamina y esta glicosilación juega un papel importante en la secreción de las inmunoglobulinas (Pluckthun, 1992). La región constituida por los dominios C_{H2} y C_{H3} (F_c o región cristalizable), es la responsable de desencadenar las funciones efectoras de las células (la fijación del complemento y anafilaxis).

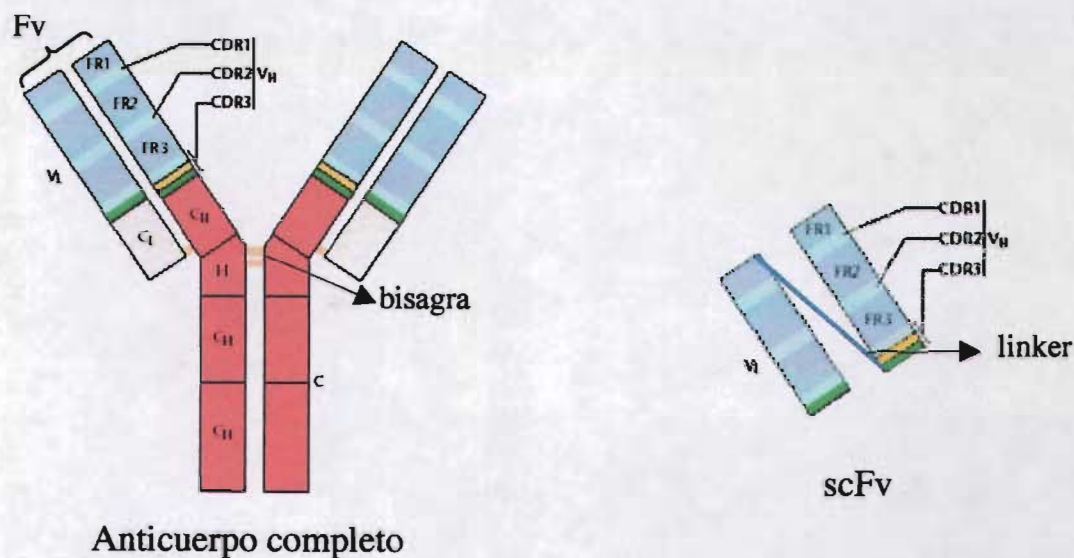


Figura 3. Esquemas de un anticuerpo completo tipo IgG y un scFv: se muestran los CDRS (azul cielo), los frameworks (morado), las regiones constantes (rojo y blanco), la región de la bisagra (indicada por una flecha), los sitios de unión a los carbohidratos (c) y los puentes disulfuro (naranja). En el scFv se señala además el linker.

La región del anticuerpo formada por las dos regiones variables de los dominios ligeros y pesados (V_H , V_L) constituyen el fragmento variable (Fv) (Figura 3). La unión de los dominios V_H y V_L , por medio de un péptido conector o “linker”, da como resultado la formación de un fragmento variable de cadena sencilla o scFv (Figura 3). El linker más frecuentemente usado es $(Gly_4 Ser)_3$. El empleo del formato de scFv, presenta varias ventajas con respecto a la utilización de los anticuerpos completos, entre las que destacan: el ser una molécula de menor tamaño, lo cual le permite una rápida distribución y penetración en los tejidos, una rápida eliminación en el organismo y disminución de las reacciones inmunológicas en organismos heterólogos.

Despliegue en fagos (Phage Display).

El despliegue en fagos es una nueva metodología, la cual permite la unión directa entre el fenotipo (las proteínas desplegadas por el fago) y el genotipo (secuencia que codifica para la proteína). Esto consiste en la obtención de fagos filamentosos del tipo M13, los cuales llevan en el interior la información genética que codifica para la proteína que será desplegada sobre la cápsula o cápside del fago. Para lo cual la secuencia de la proteína de interés se fusiona a una secuencia de las proteínas de la cápsula del fago.

Por despliegue en fagos, se han evaluado bancos de diversos tamaños hasta 1×10^{13} péptidos o proteínas diferentes, los cuales son desplegados en la superficie del fago M13 (Pini y Bracci, 2000; Benhar, 2001; Azzazy y Highsmith, 2002).

El despliegue en fagos permite el estudio de diferentes interacciones de las proteínas. Para esto se realizan varios ciclos de tamizado, en los cuales una vez que las proteínas están desplegadas en la cápsula de las partículas virales, se colocan en presencia de un ligando inmovilizado en una superficie sólida. Los fagos que se unen al ligando son recuperados de la superficie de unión y son amplificados mediante la infección de células *Escherichia coli* (*E. coli*), produciendo nuevos fagos que son sometidos a otros pasos de tamizado, logrando un enriquecimiento de los fagos con mejor afinidad por el ligando, mientras que los fagos no adheridos al ligando son eliminados por varios pasos de lavado.

El despliegue en fagos ha tenido un gran impacto en diferentes campos, entre los que destacan: el mejoramiento en la estabilidad de las proteínas (Kotz et al, 2004; Jun et al, 1999), la caracterización de epítopes en proteínas (An et al, 2005), la caracterización de epítopes en anticuerpos monoclonales (O’connor et al, 2005), el tamizado o “screening” de bancos de péptidos (Lunder et al, 2005; White et

al, 2005), el tamizado de bancos de anticuerpos (Griffiths and Duncan, 1998; Winter et al., 1994; Vaughan et al, 1996., de Bruin et al, 1999; Azzazy y Highsmith, 2002), etc..

Particularmente, la obtención de anticuerpos recombinantes (scFv y Fab), puede ser la aplicación más común del despliegue en fagos, debido a la obtención de manera directa de secuencias de anticuerpos diversos, sin la necesidad de utilizar la inmunización clásica (McCafferty, 1990; Marks et al, 1991; Barbas et al, 1991; Barbas et al, 1994; Griffiths y Duncan, 1998). El despliegue en fagos de fragmentos de anticuerpo, rápidamente desplazó a la tecnología de los hibridomas, debido a que los fragmentos de anticuerpos recombinantes son obtenidos sin la necesidad de los laboriosos y costosos protocolos que representa la generación de los mismos.

Características del fago M13 y su ciclo de infección.

El fago M13 muestra una estructura cilíndrica de aproximadamente 7 nm de ancho por 2000 nm de largo. El ADN viral es de cadena sencilla circular (cadena +), el cual tiene 6407 pares de bases y codifica para 11 genes (Tabla 2), importantes para la replicación, transcripción y traducción de las proteínas necesarias para el ensamblaje de las nuevas partículas virales (Pini y Bracci, 2000). La cápsula del fago está formada aproximadamente por 2710 copias de la proteína VIII; en uno de los extremos del virión se localizan 5 copias de cada una de las proteínas minoritarias pVI y pIII (Gramatikoff et al, 1994), mientras que en el otro extremo del fago están las proteínas minoritarias pVII y pIX.

El ciclo de vida del fago M13 inicia con la infección de las células de *E. coli* F', mediante una interacción específica de la proteína III de la cápsula del fago con el pilus de la bacteria (tubo proteico, el cual es ensamblado por procesos de polimerización de subunidades de pilina). Durante el proceso de infección, el virus unido al pilus por la proteína pIII es transportado a la superficie de la bacteria por despolimerización del pilus. Las proteínas mayores de la cápsula, integradas con la membrana, permiten que el ADN de cadena sencilla (cadena +), sea transferido hacia el citoplasma de la bacteria. La replicación del ADN del fago ocurre, en un inicio con la participación de la ADN polimerasa y la maquinaria de síntesis de la bacteria que interactúan con la cadena +, para crear una doble cadena de ADN o forma replicativa (FR). Al sintetizar la cadena -, esta molécula inicial de doble cadena sirve como templado para la transcripción y síntesis de las once proteínas del fago pI-pXI (Tabla 2). Después de producirse múltiples moléculas FR, el siguiente evento consiste en la unión de la proteína V a las cadenas positivas de ADN (complejo pV/csADN). De esta forma, el

complejo no puede ser utilizado para la síntesis de la cadena -. Posteriormente, este complejo es transportado al periplasma donde se ensamblan las partículas virales llevando en el interior el csADN. Estos viriones se liberan sin lisar a la célula (Pini y Bracci, 2000).

Tabla 2. Genes y proteínas del bacteriófago M13.

Gene	Aminoácidos	Peso molecular	Función
I	348	39,502	Ensamblaje
II	410	46,137	Replicación del ADN
III	406	42,522	Proteína de la cápsida menor
IV	405	43,476	Ensamblaje
V	87	9,682	unión a ADN
VI	112	12,342	Proteína menor de la cápsula
VII	33	3,599	Proteína menor de la cápsula
VIII	50	5,235	Proteína mayor de la cápsula
IX	32	3,650	Proteína menor de la cápsula
X	111	12,672	Replicación del ADN
XI	108	12,424	Ensamblaje

Expresión de proteínas en el fago filamentoso M13.

En el fago M13 se han desplegado diversas proteínas y péptidos heterólogos, incorporados a las diferentes proteínas que componen la cápsula del fago (Benhar, 2001), de las cuales la más utilizada ha sido la proteína PIII (Tabla 3). Los anticuerpos en la forma de fragmentos recombinantes, fueron las primeras proteínas en ser desplegadas en la superficie de los fagos (McCafferty et al, 1990). Esto fue llevado a cabo por la unión de las secuencias codificantes de la región variable de los fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), a la proteína PIII del fago,

Tabla 3. Moléculas desplegadas en las proteínas de la cubierta del fago M13.

Fago	Proteína de la cubierta	No. de copias	Moléculas desplegadas
M13	pIII	5	péptidos
M13	pIII	5	anticuerpos
M13	pIII	5	citocinas
M13	pIII	5	receptores
M13	pIII	5	enzimas
M13	pIII	5	inhibidores enzimáticos
M13	pIII	5	anticuerpos catalíticos
M13	pIII	5	proteínas de unión a ADN
M13	pIII	5	péptidos M13
M13	pIII	5	proteínas de unión a celulosa
M13	pVI	5	inhibidores enzimáticos
M13	pVI	5	enzimas
M13	pVIII	2700	péptidos
M13	pVIII	2700	anticuerpos
M13	pVIII	2700	enzimas
M13	pVIII	2700	inhibidores enzimáticos
M13	pVII	5	anticuerpos
M13	pIX	5	anticuerpos

Para realizar el despliegue de proteínas, se han desarrollado dos sistemas: el de fago y el de fagémido, siendo éste último el sistema más utilizado. El fagémido (Anexo 2), es un plásmido que presenta dos orígenes de replicación: uno para la replicación del fago y otro para la replicación en la bacteria *E. coli*. El fagémido presenta un gen de fusión que codifica para la proteína PIII del fago, al inicio de este gen se encuentran los sitios de restricción *Sfi* I y *Not* I, para clonar las secuencias nucleotídicas de interés. El fagémido, además, presenta un gen de la β -lactamasa que da resistencia al antibiótico ampicilina, un promotor *lacZ*, el cual es inhibido por glucosa e inducido por IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido), lo cual permite regular la expresión de la molécula fusionada a la proteína PIII (Pini y Bracci, 2000). El fagémido necesita de un fago ayudador o “*helper*”, el cual aporta la información génica necesaria para la formación de las partículas virales: la replicación del fago ayudador sucede a una menor frecuencia que la del fagémido. Esta característica permite obtener la mayor parte de la población de fagos con la información genética del fagémido y las proteínas de interés desplegadas en la cubierta del fago (Pini y Bracci, 2000).

LA EVOLUCION DIRIGIDA.

Una de las estrategias más exitosas de los últimos años aplicada para el mejoramiento de las proteínas, es la evolución dirigida. Esta tecnología emplea la generación de variantes de una determinada secuencia de proteína y un método de selección. Para llevar a cabo la evolución dirigida no es necesario la información estructural, basta con tener el gen de interés y un método de selección, para obtener las variantes deseadas. La evolución dirigida, incluye diferentes técnicas de variación molecular, entre las que destacan: la recombinación de genes por PCR o “DNA shuffling” (Zhao y Arnold, 1997; Cramer et al, 1996); la recombinación de exones o “exon shuffling” (Kolkman y Stemmer, 2001); los oligonucleótidos mutagénicos (Zaccolo et al, 1996; Yanes et al, 2004) y el PCR propenso a error o “error prone-PCR” (Cadwell y Joyce, 1992; Leung et al, 1989), entre otros. Esta última técnica consiste en el uso de la PCR modificando algunas de las condiciones de reacción (se agrega Mn^{2+} en lugar del cofactor natural Mg^{2+} y se adicionan los nucleótidos en diferentes concentraciones). Bajo estas condiciones de reacción la Taq polimerasa introduce mutaciones en un segmento de ADN de 1 Kb, con una tasa de mutación de 0.66% (tasa de mutagénesis media). Para incrementar la tasa de mutación, se agregan además de las condiciones mencionadas con anterioridad agentes químicos como β -mercaptoetanol y DMSO; con lo cual se ha obtenido una tasa de 3% (tasa de mutagénesis alta).

De la misma forma, en la evolución dirigida, se pueden usar diferentes métodos de selección, para el aislamiento de las proteínas o péptidos con las características deseadas. Entre estos se encuentran los sistemas de despliegue: el despliegue en fagos o “phage display” anteriormente descrito (Azzazy y Highsmith, 2002); el despliegue en bacteria o “bacterial display” (Chen et al, 2001); el despliegue en levadura o “yeast display” (Cereghino y Cregg, 1999; Van den Beucken et al, 2003; Blaise et al, 2004), el despliegue en ribosoma o “ribosome display” (Lipovsek y Pluckthum, 2004); el despliegue en retrovirus o “retroviral display” (Urban et al, 2005), entre otros.

Por evolución dirigida se han explorado y modificado diferentes propiedades en las proteínas, entre las que destacan: el mejoramiento de la estabilidad (Jermutus et al, 2001; Kotz et al, 2004; Strausberg et al, 2005), el mejoramiento en la catálisis de las enzimas (Gulick and Fah1, 1995; Zhang et al, 1997; Zaccolo y Gherardi, 1999; Jurgens et al, 2000; Saab-Rincón et al, 2001; Fujii et al, 2005; Cherry y Fidantsef, 2003), la resistencia a proteasas (Wirsching et al, 2003), el incremento de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (Heim y Tsien, 1996; Siemering et al, 1996), entre otras.

Para el caso de los anticuerpos por medio de la evolución dirigida, se han explorado las siguientes propiedades: el mejoramiento en la afinidad (Hawkins et al, 1992; Barbas et al, 1994; Boder et al, 2000; Jermutus et al, 2001), el mejoramiento en la estabilidad (Jun et al, 1999; Brockmann et al, 2005) y la disminución de la constante de disociación o k_{off} (Graff et al, 2004).

ANTECEDENTES.

Anticuerpos monoclonales y scFvs generados contra toxinas de alacrán.

En la actualidad hay tres ejemplos de anticuerpos murinos, obtenidos por la tecnología de hibridoma contra toxinas de alacrán. Para el caso del alacrán *Centruroides noxius*, existe un anticuerpo monoclonal llamado BCF2 el cual neutraliza a la toxina Cn2 y al veneno completo (Zamudio et al, 1992). A través del empleo de la síntesis de péptidos discontinuos, fue posible mapear el epitope de reconocimiento del anticuerpo BCF2 en la toxina Cn2. La región está comprendida entre los residuos del extremo amino N 5-14 y del extremo carboxilo C 56-65 (Calderón et al, 1999).

Los otros trabajos reportados se refieren a dos anticuerpos monoclonales que presentan la capacidad de neutralizar a las toxinas más potentes y peligrosas del alacrán del norte de Africa (*Androctonus australis* Héctor). El anticuerpo 4C1 se une específicamente y neutraliza a la neurotoxina más potente AahII (Mousli et al, 1999) y el anticuerpo 9C2 que es capaz de neutralizar a las toxinas (AahI y AahIII) del mismo alacrán (Clot-Faybesse et al, 1999). En cuanto al anticuerpo 9C2 se ha hecho un trabajo extenso para construir otros fragmentos de anticuerpo menos inmunogénicos. A partir de los genes que codifican para el anticuerpo 9C2, se han construido: el scFv (monómero y dímero) y el Fab. Resulta muy interesante el efecto del tipo de formato en las constantes de afinidad, debido a que el monoclonal presenta una K_D de 0.2 nM, mientras que el monómero del scFv presenta una K_D de 1.5 nM, el dímero del scFv muestra una K_D de 0.08 nM y en el Fab es de 0.082 nM. Esto puede indicar que en este ejemplo particular, existe una mejora en la K_D de los formatos scFv dímero y Fab, mientras que el scFv monómero presenta una disminución considerable en la K_D con respecto al anticuerpo monoclonal. A pesar de esto, los autores reportan que los fragmentos de anticuerpo (scFvs), mantienen las propiedades de reconocimiento hacia las toxinas del *Androctonus australis* Héctor y las neutralizan (Mousli et al, 1999; Devaux et al, 2001). Hay que considerar que el ejemplo anterior y en otros reportados, generalmente cuando se construye el scFv ocurre una pérdida de la afinidad y de la estabilidad funcional. Estos problemas pueden ser solucionados por medio de la evolución dirigida, lo cual permite generar variantes con mejores propiedades.

4. JUSTIFICACION.

Debido a que el formato scFv presenta una mayor difusión, mas rápida penetración en los tejidos, disminución en los problemas de inmunogenicidad y una mayor eliminación en el organismo (con respecto al anticuerpo completo), en este trabajo se pretende manipular el formato scFv del anticuerpo neutralizante BCF2 para obtener una variante lo suficientemente estable y con capacidad neutralizante.

5. HIPOTESIS.

Utilizando las metodologías de mutagénesis al azar y despliegue en fagos, se espera obtener un derivado del scFv de BCF2 con un incremento en la afinidad, estabilidad y con la capacidad de neutralizar a la toxina Cn2.

6. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

1.- Obtener variantes del scFv de BCF2 con alta afinidad, estabilidad y capacidad de neutralización por la toxina Cn2, mediante evolución dirigida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1.- Construcción y caracterización del scFv de BCF2 en cuanto a **especificidad, afinidad, estabilidad** y capacidad de neutralización.
- 2.- Maduración del scFv de BCF2 mediante evolución dirigida.
- 3.- Caracterizar las clonas con mejor reconocimiento que el scFv de BCF2, comparando las propiedades de afinidad, estabilidad y capacidad de neutralización.

7. MATERIALES Y METODOS NO PUBLICADOS.

A) Análisis de expresión del scFv del BCF2 por SDS-PAGE.

Se preparó un gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 12%), para ver la expresión del scFv de BCF2. Se cargaron las muestras de las proteínas recuperadas de la columna de Níquel-agarosa y fueron evaluadas en el gel de poliacrilamida por tinción de coomasie. El control negativo empleado fue una muestra igualmente procesada de la cepa TG1 sin el anticuerpo.

B) Elección del sistema para la recuperación de los fago-anticuerpos.

Para determinar que sistema es más eficiente para la recuperación de los fago-anticuerpos en los procesos de tamizado, se empleó el fago-anticuerpo de cadena sencilla de BCF2. Se probaron 3 formas de recuperación: elución con TEA (Marks et al, 1991), elución con células (Sblattero y Bradbury, 2000) y elución con tripsina (Goletz et al, 2002).

En tres inmunotubos se colocaron 10 µg/ml de toxina Cn2, en buffer de carbonatos 50 mM, pH 9.4 y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de saturar los inmunotubos con BSA 0.5% en buffer PBS IX, se agregó 1 ml de los fago-anticuerpos a una concentración de 2×10^{13} fagos/ml. Después de los lavados se realizó la recuperación de los fagos-anticuerpos de la siguiente forma: un inmunotubo se trató con 1 ml de TEA 100 mM durante 30 min; posteriormente se realizó la neutralización con Tris HCl 1M, pH 7. Al segundo inmunotubo se le agregó 1 ml de tripsina 1nM por 30 min. Posteriormente, con los fagos eluidos de los inmunotubos primero y segundo, se infectaron células y se realizó la recuperación en cajas con medio YT2X con Gluc 2% y Amp (200 µg/ml), para cuantificar el número de fago-anticuerpos recuperados y poder comparar la eficiencia.

Al tercer inmunotubo se le agregó 1 ml de células XLI-Blue de D.O de 0.7 a 600 nm, la muestra fue incubada 30 min sin agitación y 30 min en agitación a 37°C, para una recuperación directa.

C) ELISA de fago anticuerpos de cuarta ronda de tamizado (PUBLICADO).

La metodología de esta prueba se encuentra en el Artículo 2 (Anexo 6).

D) Caracterización de las variantes seleccionadas como fago-anticuerpos.

1) Pruebas de reconocimiento a Cn2 en ELISA.

Se probó la capacidad de unión de los scFvs a la toxina Cn2 por medio de la prueba de ELISA. Se emplearon las mismas concentraciones de fago-anticuerpos de cada variante. La unión fue revelada

con un anticuerpo anti M13 acoplado a la enzima peroxidasa. Los experimentos se realizaron 4 veces para cada muestra.

2) Estabilidad funcional.

La estabilidad de los fago-anticuerpos se realizó como se describe en el artículo 1 (Resultados publicados). En la placa de ELISA se colocaron 100 μ l/pozo de la toxina Cn2 a una concentración de 3 μ g/ml. Posteriormente se colocaron 100 μ l/pozo de los fago-anticuerpos, a una concentración de 5×10^{11} fagos/ml, en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. La unión de los fagos en estas condiciones se reveló como en el ELISA de especificidad, estas pruebas se realizaron 4 veces.

E) Pruebas de neutralización en la relación molecular 1:1 (toxina/scFv dimérico).

Para determinar si los anticuerpos seleccionados en concentraciones equimolares tienen la capacidad de neutralizar a la toxina Cn2, se realizaron los experimentos, siguiendo la metodología descrita en el artículo 1, donde se probó la relación molecular 1:1 de toxina y los anticuerpos seleccionados. De la misma forma se realizó la verificación de la capacidad de neutralización del anticuerpo monoclonal BCF2 en una relación molecular 1:10 (toxina/anticuerpo).

F) Ensayos de desplazamiento en BIACORE.

Para saber si la variante evolucionada (Triple mutante) reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal BCF2, en la toxina Cn2, se realizaron 2 ensayos de competencia en BIACORE.

- 1) En el primer ensayo de competencia se agregaron los anticuerpos de manera independiente sobre el antígeno (Donini et al. 2003). La toxina Cn2 fue fijada a un chip (placa metálica de oro con dextranos, que tienen grupos carboxilatos a los cuales se une el antígeno a evaluar), saturando sus epítopes con el anticuerpo BCF2. Posteriormente, se inyectó un segundo anticuerpo (scFv Triple mutante) que también reconoce a Cn2 y finalmente se inyectó un tercer anticuerpo (scFv 6009F; Artículo 2), que reconoce un epítipo en la Cn2 diferente al reconocido por el BCF2. El sensograma obtenido permite detectar la competencia entre dos anticuerpos por un mismo epítipo (cambio no significativo en los valores de RU) o la unión de un anticuerpo a un diferente epítipo (incremento notorio en los valores de RU).

Este primer ensayo también se realizó saturando los epítopes de Cn2 con el scFv Triple mutante, luego inyectando el BCF2 y finalmente el scFv 6009F.

- 2) En el segundo ensayo se agregan dos anticuerpos al mismo tiempo sobre el antígeno y también de manera independiente, comparando los diferentes sensogramas (Amersdorfer et al, 2002). Se realizaron aplicaciones independientes de la triple mutante y el BCF2, los sensogramas obtenidos de estos anticuerpos son comparados con el sensograma obtenido al aplicar la mezcla (Triple mutante + BCF2). La concentración de los anticuerpos fue la misma (20 nM). Esta fue la segunda forma de verificar que los anticuerpos BCF2 y scFv Triple mutante reconocen el mismo epítipo en la toxina Cn2.

8. RESULTADOS PUBLICADOS

Los resultados de este trabajo fueron publicados en la revista *J Mol Biol.* 346: 1287-1297, con el título: Directed Evolution, Phage Display and Combination of Evolved Mutants: A Strategy to Recover the Neutralization Properties of the scFv Version of BCF2 a Neutralizing Monoclonal Antibody Specific to Scorpion Toxin Cn2 (Artículo 1).

También se contribuyó en la elaboración del artículo publicado en la revista *FEBS J.* 272: 2591-2601 con el título: A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display (Artículo 2). Sobre este último trabajo no se discuten los resultados en esta tesis (Anexo 6).

Directed Evolution, Phage Display and Combination of Evolved Mutants: A Strategy to Recover the Neutralization Properties of the scFv Version of BCF2 a Neutralizing Monoclonal Antibody Specific to Scorpion Toxin Cn2

V. R. Juárez-González, L. Riaño-Umbarila, V. Quintero-Hernández
T. Olamendi-Portugal, M. Ortiz-León, E. Ortíz, L. D. Possani
and B. Becerril*

Departamento de Medicina
Molecular y Bioprocesos
Instituto de Biotecnología
UNAM, Apartado Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62250
México

BCF2, a monoclonal antibody raised against scorpion toxin Cn2, is capable of neutralizing both, the toxin and the whole venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. The single chain antibody fragment (scFv) of BCF2 was constructed and expressed in *Escherichia coli*. Although its affinity for the Cn2 toxin was shown to be in the nanomolar range, it was non-neutralizing *in vivo* due to a low stability. In order to recover the neutralizing capacity, the scFv of BCF2 was evolved by error-prone PCR and the variants were panned by phage display. Seven improved mutants were isolated from three different libraries. One of these mutants, called G5 with one mutation at CDR1 and another at CDR2 of the light chain, showed an increased affinity to Cn2, as compared to the parental scFv. A second mutant, called B7 with a single change at framework 2 of heavy chain, also had a higher affinity. Mutants G5 and B7 were also improved in their stability but they were unable to neutralize the toxin. Finally, we constructed a variant containing the changes present in G5 and B7. The purpose of this construction was to combine the increments in affinity and stability borne by these mutants. The result was a triple mutant capable of neutralizing the Cn2 toxin. This variant showed the best affinity constant ($K_D = 7.5 \times 10^{-11}$ M), as determined by surface plasmon resonance (BIAcore). The k_{on} and k_{off} were improved threefold and fivefold, respectively, leading to 15-fold affinity improvement. Functional stability determinations by ELISA in the presence of different concentrations of guanidinium hydrochloride (Gdn-HCl) revealed that the triple mutant is significantly more stable than the parental scFv. These results suggest that not only improving the affinity but also the stability of our scFv were important for recovering its neutralization capacity. These findings pave the way for the generation of recombinant neutralizing antisera against scorpion stings based on scFvs.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author

Keywords: directed evolution; affinity maturation; functional stability; phage display; single chain antibody fragment (scFv)

Abbreviations used: CDR, complementarity determining region; O/N, overnight; scFv, single chain antibody fragment; Gdn-HCl, guanidinium hydrochloride.

E-mail address of the corresponding author:
baltazar@ibt.unam.mx

Introduction

Immune serum therapy (serotherapy), has been used during the last century for the treatment of poisoning caused by animal bites and stings in humans. Scorpion stings in Mexico reach over 200,000 accidents per year with a mortality of

approximately 700 people during the seventies and eighties. For the nineties, the fatalities reported were 300 and by 1998, 136 (Weekly Epidemiological Bulletin, Mexican Health Ministry, week 52, 1998). During 2002 the number diminished to 70 due to an intensive serotherapy campaign. The antivenom currently used in Mexico consists of bivalent F(ab')₂ fragments obtained from hyper-immunized horses with a water extract from venomous glands of *Centruroides* scorpions.²

The monoclonal antibody BCF2 neutralizes the deadly effects of Cn2 toxin, which is present in the venom of one of the most dangerous species of Mexican scorpions (*Centruroides noxius* Hoffman).³ Cn2 is one of the most abundant (6.8% of total venom), and toxic (LD₅₀=0.25 µg/20 g mouse) peptides of this venom. BCF2 is able to neutralize also the whole venom.⁴

A new perspective for the treatment of scorpion poisoning by means of recombinant antibodies, has emerged recently. Two recombinant single chain antibody fragments (scFv) derived from their respective monoclonal antibodies have been expressed in bacteria.^{5,6} Antibody 4C1 binds specifically to and neutralizes the most potent neurotoxin (AahlI) from the scorpion *Androctonus australis* Hector.⁵ Another antibody named 9C2 neutralizes the toxins Aahl and AahlII from the same scorpion.^{6,7} Both recombinant scFvs showed neutralizing activities similar to those of the original monoclonal antibodies. However, other examples of scFvs derived from their respective monoclonal antibodies have lost their recognition capacity or have shown a decreased affinity.⁸⁻¹⁰ The scFv antibody format presents several advantages with respect to the whole antibody, like better diffusion, penetrability and faster elimination. However, their low stability makes them less attractive to be used as therapeutic molecules.¹¹⁻¹³ Directed evolution has been used to improve the affinity and/or the stability of scFvs.¹⁴⁻¹⁶ Error-prone PCR (epPCR), allows us to introduce different rates of mutation in the DNA segments encoding the scFvs by means of the use of Taq polymerase under specific conditions.^{17,18} The repertoires generated by epPCR can be displayed on the surface of filamentous phages (phage display) for the subsequent selection (bio-panning) of the clones improved in the desired properties like recognition capacity and/or stability.¹⁹⁻²⁶

A new generation of anti-venoms could be based on a set of recombinant antibody fragments, which would be capable of neutralizing the most abundant and toxic components of the venom of a dangerous group of animals.

Here, we report the construction, expression and functional characterization of the scFv from the monoclonal antibody BCF2 (scFv BCF2). Since this construction was not neutralizing, two mutants (G5 and B7) were generated by directed evolution of the DNA segment encoding the scFv BCF2. Both mutants showed an improved stability. They also had an increased affinity to the Cn2 toxin as

compared with the parental scFv, but were unable to neutralize the toxin *in vivo*. The combination of both variants resulted in a dimeric scFv (triple mutant) with the adequate affinity and stability to neutralize the Cn2 toxin.

Results

Construction and displaying of scFv BCF2

The gene coding for scFv BCF2 was cloned into the pSyn2 displaying vector and the construction was verified by DNA sequencing. Figure 1 shows the scFv BCF2 amino acid sequence translated from sequenced DNA. The segments involved in the conformation of the three loops corresponding to the complementarity determining regions (CDRs) of the V_H and V_L domains,²⁷ are indicated. The scFv BCF2 was evaluated by phage-antibody ELISA. It was able to recognize specifically the Cn2 toxin (Figure 2). Other proteins, including close homologous scorpion toxins, such as CII1, CII2, Pg7, Pg8 and toxic fraction II, and unrelated proteins, trypsinogen, casein and BSA were not recognized.

Expression and purification of soluble scFv BCF2

The scFv BCF2 gene sub-cloned into the pSyn1 vector, was expressed by IPTG induction using the TG1 *Escherichia coli* strain. The protein was extracted from the periplasm and purified by ion-metal affinity chromatography (IMAC). The purified fraction containing the antibody fragment was separated into two peaks after flowing through a Superdex 75 column. The faster peak (18 minutes, elution time), corresponded to the dimeric form of the scFv and the second peak (20.5 minutes, elution time), to the monomeric form. The typical yield was

```

                                CDR-H1
1  EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKV SGYSFTDRTMNWVKQS 40

                                CDR-H2
41  HGKNLELIG LINPFNGDAT YKQKPTGKATLTVDRSSSTAF 80

                                CDR-H3
81  MELLSLTSEDSAVVYCAR YGRYAMDYWQQTSTVTSS GGG 120

Linker
121  GGGGGGGGGGDIYLTQSPVSLAVSVGQRATISG KASQS 160

                                CDR-L1
161  VDFDGESYMN WYQQKPGQP PKLLTY VVSNLESGIPARPSG 200

                                CDR-L3
201  SGSGTDFTLNIHPVEERDAATYYC QQSNEDPLTFGAGTNL 240

241  ELK 243

```

Figure 1. Amino acid sequence of the scFv BCF2. Amino acid residues corresponding to the CDRs²⁷ are underlined. Linker peptide is shown in bold. The numbers shown correspond to a continuous numbering which includes the linker.

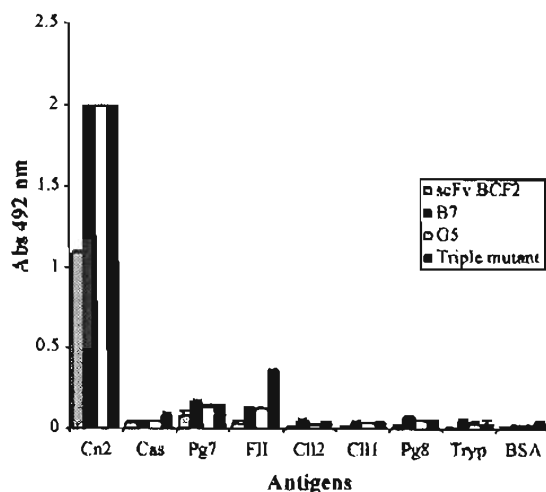


Figure 2. Specificity ELISA of phage-antibodies. Phage titers were normalized to 5×10^{11} phages/ml. Specificity of recognition was confirmed by using different antigens (Cn2, CII1, CII2, Pg7, Pg8, toxic fraction II, trypsinogen, casein and BSA). See Materials and Methods. Data are means of four experiments. Error bars show the standard deviation from the mean.

0.3 mg of soluble total protein per liter of culture. These two peaks represented an estimate of 30% and 70%, respectively, of the recovered protein (data not shown). Monomeric and dimeric fractions under SDS-PAGE conditions showed a M_r of approximately 30 kDa.

Neutralization of toxin Cn2 by scFv BCF2

The capacity of scFv BCF2 to inhibit the toxic effects of Cn2 was tested *in vivo* in CD1 female mice. In these assays the scFv BCF2 (monomeric or dimeric), despite being capable of recognizing specifically the Cn2 toxin in ELISA, was unable to inhibit the deadly effects of Cn2. We only show the data corresponding to the dimeric form (Table 1). We have observed that 20 minutes after the injection of Cn2, the first clinical symptoms of intoxication are present. The protective capacity of scFv BCF2 was practically non-existent as evidenced by the appearance of the poisoning symptoms almost at the same time as they occurred in the control

animals (injected with Cn2 only). A subtle delay of five to ten minutes in the appearance of symptomatology was observed, but the mortality rate was consistently higher than in the control group injected with the toxin alone, suggesting that the scFv BCF2 caused a kind of potentiation of the Cn2 toxicity. This phenomenon was already reported by our group when a synthetic vaccine against the venom of *C. noxius* was assayed.²⁸

Construction and characterization of the mutant libraries of scFv BCF2

The scFv BCF2 DNA segment was used as template to generate three random libraries: low, medium and high rate of mutation. The sizes were 7.8×10^7 , 1.8×10^7 and 1.6×10^8 transformants, respectively. Ten independent plasmid clones from each library were sequenced to determine the diversity and the mutation rate. The experimental values of mutation rate (low 0.1%, medium 0.8% and high rate of mutation 4.7%) were very close to the theoretical reported values.^{17,18} The analysis of the DNA sequences allowed us to conclude that the mutations were all different and randomly distributed throughout the frameworks, CDRs and linker.

Biopanning and characterization of the mutants of scFv BCF2

Mutagenic libraries were panned against the Cn2 toxin. From the fourth round of panning, we analyzed 88 colonies from each library by phage-antibody ELISA. About 90% of the positive clones showed higher signals than phage-scFv BCF2. We performed a second ELISA in which we tested the expressed soluble proteins (non-phage associated) from those variants. We found that only eight clones recognized Cn2 with higher signals than scFv BCF2 (Table 2). Two of them were from the low rate of mutagenesis library and six from the medium rate one. The high rate of mutagenesis library did not yield any Cn2 recognizing clone. Those eight clones were sequenced, and the analysis of the DNA sequences revealed that only seven were different. Two mutants named G5 and B7, giving the strongest signals in a quantitative ELISA, were further characterized. Mutant B7 was found twice among the eight clones tested as soluble scFvs (Table 2). The mutant G5 showed two mutations,

Table 1. *In vivo* neutralization of toxin Cn2 by dimeric scFv BCF2, G5, B7 and triple mutant

Test	Cn2 1LD ₅₀ 0.25 µg of Cn2/20 g mouse	Molar ratio Cn2: scFv	Survival ratio protected/injected
No antibody	1LD ₅₀	—	5/10
scFv BCF2	1LD ₅₀	1:10	1/10
G5	1LD ₅₀	1:10	3/10
B7	1LD ₅₀	1:10	2/10
Triple mutant	1LD ₅₀	1:10	10/10

Negative control (no antibody): the mice were injected with the toxin alone.

Table 2. Description of the selected mutants

Clone	Library	Number of changes	Change ^a	Position ^b	Region
G5	L	2	Q27R V51A	159 187	CDR1 V _L CDR2 V _L
E11	L	2	G7R Q27R	124 159	Linker CDR1 V _L
A9	M	3	L82cH N92K E93V	86 228 229	Fw3 V _H CDR3 V _L Fw4 V _L
B3	M	4	F53Y K60N S113T I58V	54 61 117 194	CDR2 V _H CDR2 V _H Fw4 V _H Fw3 V _L
B7	M	1	N35I	35	Fw2 V _H
D1	M	1	N35I	35	Fw2 V _H
D3	M	1	K60N	61	CDR2 V _H
D4	M	1	Y98H	102	CDR3 V _H

Source: L, scFvs isolated from the low mutagenesis library; M, scFvs isolated from the medium mutagenesis library.

The number, the type and the location of the changes are indicated. Two numbering systems were used.

^a Individual numbering of variable chains according to Chothia.²⁷

^b Continuous numbering which includes the linker. CDR, complementarity determining region; Fw, framework, V_H, heavy chain; V_L, light chain.

one at CDR1 (Q27R) and the other at CDR2 (V51A) of the light chain (Figure 1; Table 2). Mutant B7 showed a single change (N35I) at framework 2 of the heavy chain (Figure 1; Table 2). Phage-antibodies of mutants G5 and B7 were assayed by ELISA to confirm that these variants conserved their specificity to Cn2 toxin (Figure 2). G5 and B7 were expressed as soluble proteins and purified. The Superdex 75 elution profile for G5 revealed the presence of two peaks corresponding to the monomeric and dimeric forms. In these cultures the yield of the scFv of G5 was 0.4 mg/l. In the case of B7, it showed a single peak corresponding to the dimeric form with a yield of 0.8 mg/l of culture. The dimeric form from both mutants were employed in the stability and neutralization assays.

Functional stability in guanidinium hydrochloride

The recognition capacity of the different scFv proteins (all dimeric) in the presence of increasing amounts of guanidinium hydrochloride (Gdn-HCl), as a measure of the functional stability, was evaluated by ELISA. These results revealed that 1 M Gdn-HCl was the critical concentration for functional stability, because the ability of scFv BCF2 to recognize Cn2 decreased significantly. The scFv BCF2 lost approximately 50% of its binding capacity, G5 still showed a significant high signal (lost only 10%) and B7 still had 100% binding (Figure 3). Similar results were obtained when the corresponding phage-antibodies were tested under the same conditions (data not shown).

Neutralization of toxin Cn2 by G5 and B7 mutants

In spite of showing an increased binding activity to Cn2 toxin and also having an improved stability, the

mutants G5 and B7 (dimeric forms) were unable to neutralize the toxic effects of Cn2 (Table 1). However, some interesting observations were made: B7 mutant showed similar effects as compared to scFv BCF2 in terms of the time at which the poisoning symptoms appeared. Importantly, the mutant G5 did not show any symptoms up to three to four hours, after the typical envenoming symptoms appeared.

Construction and characterization of the triple mutant

The mutations present in the clones G5 and B7

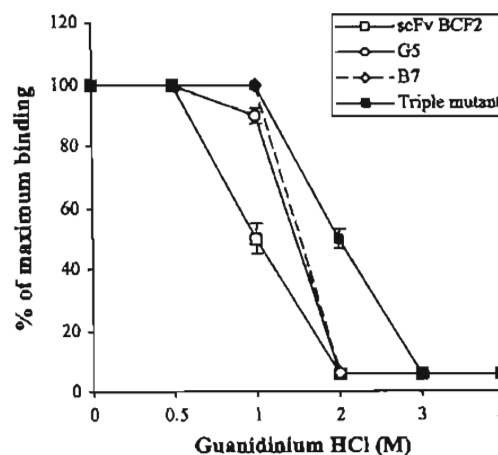


Figure 3. Functional stability determination of dimeric scFv antibody fragments. Cn2 binding by scFv BCF2, G5, B7 and triple mutant in the presence of different concentrations of guanidinium hydrochloride as determined by ELISA. The antibody concentration was normalized to 10 µg/ml. Data are means of four experiments. Error bars show the standard deviation from the mean.

were combined by means of PCR to obtain a variant with a significant improvement in affinity and stability, as a result of the synergistic contribution of both mutants. This combination resulted in a triple mutant whose identity was verified by DNA sequencing (Figure 1). This mutant was purified by gel filtration and its elution profile revealed the presence of a single peak with an elution time corresponding to a dimeric scFv (data not shown). This variant had the best expression level; the yield was 1 mg of soluble protein per liter of culture. The functional stability in Gdn-HCl of this protein was evaluated. It was shown to be significantly more stable than scFv BCF2 (Figure 3). At 2 M Gdn-HCl this variant still showed 50% binding while the other scFvs lost more than 90% of their binding activity.

Surface plasmon resonance (BIAcore) measurements

The affinity constants for all the scFvs were determined using soluble protein from their dimeric forms (Table 3). The K_D values of the scFvs were: scFv BCF2 = 1.1×10^{-9} M; G5 = 4.3×10^{-10} M and B7 = 7.1×10^{-10} M. The affinity constants of G5 and B7 were 2.5-fold and 1.5-fold higher than parental scFv BCF2, respectively. The triple mutant showed the best affinity constant ($K_D = 7.5 \times 10^{-11}$ M). These results correlate with the functional stability assays (Figure 3). This increment in the affinity of the triple mutant, is another aspect that reflects the additive effect of the changes already present in mutants G5 and B7.

Neutralization test of the triple mutant against toxin Cn2

A molar ratio 1 : 10 (toxin:dimeric triple mutant), was used for protection assays *in vivo*. After eight to ten hours post-injection, the mice showed minor symptoms of poisoning but recovered rapidly. All of them survived after 36 hours of observation (Table 1).

Discussion

Characterization of scFv BCF2

In our laboratory, several monoclonal antibodies

Table 3. Affinity and binding kinetics for the dimeric scFv of BCF2 and its mutants

Antibody	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
scFv BCF2	4.0×10^5	4.5×10^{-4}	1.1×10^{-9}
G5	6.7×10^5	2.9×10^{-4}	4.3×10^{-10}
B7	2.3×10^5	1.6×10^{-4}	7.1×10^{-10}
Triple mutant	1.1×10^6	8.5×10^{-5}	7.5×10^{-11}

Association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants were determined using surface plasmon resonance (BIAcore) and K_D was calculated as k_{off}/k_{on} .

against Cn2 have been generated.³ BCF2 was the only antibody that protected against toxin Cn2 and the whole venom of *C. noxius* Hoffmann.⁴ This species is one of the most dangerous scorpions in Mexico and probably in the world.

The possibility to generate an antibody fragment like an scFv capable of neutralizing a toxin, is an important alternative in the therapeutic antibody area, because they have a reduced size and cause low immunological reactions in heterologous organisms. This new approach for the treatment of scorpion stings by means of recombinant antibodies has appeared recently. The scFv fragments derived from monoclonal antibodies 4C1 and 9C2 were able to neutralize their respective toxins.⁵⁻⁷ The scFv of BCF2 generated here, although having a K_D in the nanomolar range (1.1×10^{-9} M; Table 3), did not neutralize toxin Cn2. Possible explanations to this fact can be given by: (a) a fast dissociation ($4.5 \times 10^{-4} s^{-1}$), which facilitates the detachment of the toxin from the antibody-toxin complex, allowing the toxin to bind to its target; (b) the conformation adopted by V_H and V_L domains, which might not have the same orientation as in the monoclonal antibody, resulting in a decrease of the binding capacity, as it has been reported for other scFvs;^{12,13} and (c) the low functional stability of the scFv BCF2, which in the presence of 1 M Gdn-HCl lost 50% of activity (Figure 3).

Characterization of evolved scFv BCF2 variants

The loss of neutralizing activity of the scFv BCF2 prompted the initiative to look for variants improved in their binding capacity and stability, aimed at recovering the neutralization capacity. For this purpose, we decided to generate three error-prone PCR libraries of different rates of mutagenesis (low, medium and high) in order to explore a wide range of combinatorial mutations. After four rounds of panning several phage-antibodies were isolated, which gave stronger signals in ELISA as compared to phage-scFv BCF2. When these phage-antibodies were tested as soluble proteins, only about 10% maintained their binding capacity, indicating that most of them had lost their recognition ability. This phenomenon has been well characterized and it has been explained in terms of the stabilizing effect of pIII on the surface of the phage.²⁹ Some scFvs, when they are displayed on the surface of filamentous phages recognize efficiently their respective antigens, but when they are expressed as free proteins, lose their recognition capacity due to a decrease in stability, indicating that only those conserving their stability will be functional. When we assayed the selected clones as soluble proteins, we chose two of them with the best affinities: G5 and B7, which maintained their specificity to Cn2 toxin (Figure 2). The variant G5, with one mutation at CDR1 (Q27R) and another at CDR2 (V51A) of the light chain, showed an improvement in affinity (Table 3), and stability (Figure 3). At 1 M Gdn-HCl it showed an activity

higher than scFv BCF2 (approximately 40%) (Figure 3), however, it did not neutralize Cn2 toxin (Table 1).

Similar results have been obtained by other members of our laboratory, which indicate that not only a high affinity but also a good stability are necessary to reach the capacity to neutralize a toxin (L.R.-U., V.R.J.-G., T.O.-P., M.O.-L., L.D.P. & B.B., unpublished results). It has been shown that mutations at CDRs generally result in an improvement of the binding capacity due to the direct contact of loop residues with the antigen.¹⁴ Our results are in agreement with these data. The changes at CDRs of G5 improved the affinity of this variant. An improvement of the stability was also observed. This level of improvement was still insufficient to confer to this mutant the capacity to neutralize the toxin. The most important observation was that mutant G5 delayed the onset of poisoning symptoms, indicating that the improvements in affinity and stability were characteristics that favor neutralization.

On the other hand, it has been reported that certain mutations at frameworks can improve the affinity of the antibody for its antigen.^{14,16,30} The mutant B7 has a single change (N35I) at framework 2 of heavy chain. When it was purified by gel filtration, a single peak with an elution time corresponding to a dimeric scFv was recovered. An interesting effect of this mutation was an increase in the protein yield (2.6-fold) as compared to scFv BCF2. This mutation produced a dimeric variant that is more stable. It was demonstrated in the functional stability assays that this clone, at 1 M Gdn-HCl, was 50% more stable than scFv BCF2 and 10% more stable than mutant G5 (Figure 3). The increase in stability of mutant B7 can be explained based on its intrinsic dimeric properties. This mutant showed a similar K_D to G5 (Table 3). Noteworthy, this single mutation at the framework 2 of B7, improved both its affinity and stability, although not sufficient to confer a neutralizing capacity.

Combination of improved scFv BCF2 variants (triple mutant)

The properties shown by mutants G5 and B7 in terms of their increase in affinity and stability with respect to the parental scFv BCF2, suggested experiments aimed at combining the mutations carried by these variants in order to obtain an antibody fragment improved in these two parameters and hopefully producing a neutralizing antibody. The triple mutant was constructed and expressed, giving the best yield (1 mg/l of culture). The protein was tested in the neutralization assays and it was capable of neutralizing Cn2 toxin (Table 1). This variant protected 100% of mice. Its affinity constant (K_D), was 7.5×10^{-11} M (Table 3), in which the k_{on} and k_{off} were improved approximately threefold and fivefold, respectively, as compared to scFv BCF2, leading to 15-fold

affinity improvement. With respect to the functional stability of the triple mutant (Figure 3), while the other variants showed only marginal values, at 2 M Gdn-HCl, this mutant still retained approximately 50% activity. These results indicate that in this mutant two determining characteristics were combined, which resulted in its neutralizing capacity: a significant improvement in affinity and stability as a result of the contribution of mutations at CDRs of the V_L and the mutation at the framework 2 of the V_H .

Dimeric scFvs with shortened linker, which showed a better affinity and higher stability than the monomeric form, have been reported. This is the case of a scFv specific for AahI scorpion toxin, whose dimeric form had a K_D in the sub-nanomolar range. It was neutralizing and very stable.³¹ In another case, the dimeric format was required to neutralize the human cytomegalovirus.³² We have also observed consistently in our laboratory that dimerization, both as a consequence of shortening the linker joining the variable domains or by directed evolution without shortening the linker, has resulted in an improvement of the stability of the single chain. These results suggest that dimerization was important for functional stabilization.

Putative effects of the mutations on the interaction antibody-toxin

The NMR structure of the Cn2 toxin,³³ a model of the Fv fragment of BCF2 and experimental data generated by epitope mapping,³⁴ have been used to propose a spatial model of the interaction between BCF2 and Cn2.³⁵ We made use of this model in order to obtain some insights into the nature of the changes that the mutations herein described could imply at the structural level (Figure 4). The light chain Q27R substitution, places a positively charged amino acid in a region where two acidic amino acids (light chain E93 and Cn2 E28), one belonging to the antibody and the other to the toxin, are expected to be located in close proximity. The R27 could be involved in the formation of new salt bridges with at least one of them, releasing in this way the tension generated by the natural repulsion between the two negatively charged residues. This could directly lead to an increase in the affinity of the interaction. On the other hand, the heavy chain position 35, although not directly located at the V_H - V_L interface, is a residue in close contact with the hydrophobic layer of amino acids that do conform to this interface. We postulate that the replacement of a hydrophilic residue at this position (Asn) for a hydrophobic one (Ile) could lead to a change in the geometry and/or stability of the intramolecular V_H - V_L interaction, favoring the formation of the dimeric scFv, and consequently affecting in a positive way the recognition properties of the whole antibody fragment. We could not come to a plausible explanation for a putative effect of the V_L V51A mutation on the BCF2-Cn2 interaction in light of the structural model. There seems to be no

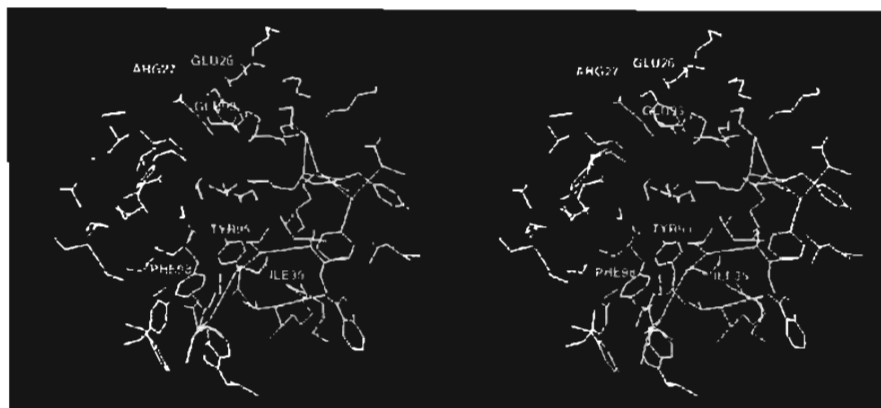


Figure 4. Stereo view of a segment of the BCF2–Cn2 complex model. Restricted part of the C α trace and side-chains of the complex with the Q27R (V_L) and N35I (V_H) mutations included. The mutant amino acid residues are shown in magenta. The remaining side-chains are represented in RGB colors. The BCF2 light and heavy chain traces are shown in blue and yellow, respectively. The Cn2 toxin trace is displayed in green. Image created using the software package Swiss PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

significant change in the structure due to the replacement of Val by the similar Ala. However, we cannot rule out the possibility that this mutation could have caused a local change undetectable at the model level but contributing with the Q27R mutation to increase the affinity and/or stability of G5 mutant.

In conclusion, we constructed the single chain Fv (scFv) of the monoclonal antibody BCF2 raised against toxin Cn2 from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, and realized that this single chain was unable to neutralize Cn2 toxin. Two mutants (G5 and B7) were isolated from three different libraries with a wide range of variability generated by random mutagenesis. None of these mutants was able to neutralize the Cn2 toxin. The combination of the mutations from G5 and B7 resulted in a triple mutant, which was capable of neutralizing Cn2 toxin *in vivo*. The analysis of the regions in which the mutations occurred, based on the reported model for the structure of the complex antibody-toxin, provided a working hypothesis to explain the effect of these mutations on the stability and affinity of the triple mutant.

Using the approaches here described, low affinity and low stability antibody fragments (scFvs), can be modified in order to improve such properties. There seems to be a relationship between the improvement in those parameters (stability and affinity) and the protein yield.

A new generation of anti-venoms containing a limited number of highly specific antibody fragments capable of neutralizing the most abundant and toxic components of a venom can be obtained by means of the procedures reported here.

Materials and Methods

Toxins

All the scorpion toxins used here are specific for

sodium channels and were purified and characterized in our laboratory. Toxin Cn2 was isolated from the venom of *C. noxius* Hoffmann.³ Pg7 and Pg8, were isolated from *Parabutus granulatus* (unpublished data). CII1³⁶ and CII2, were isolated from *Centruroides limpidus limpidus*.³⁷

Toxic fraction II was isolated from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. This fraction was obtained by molecular weight sieving in Sephadex G-50 column chromatography, and contains a mixture of all Na⁺ channel specific toxins.³⁶

Enzymes

NotI, SfiI, BstNI, Taq polymerase, high-fidelity Vent polymerase and T4 DNA ligase, were purchased from New England Biolabs (Berkeley, MA, USA).

Escherichia coli strains

TG1: K12 Δ (lac-pro), supE, thi, hsdD5/F'traD36, proA⁺B⁺, lacI^q, lacZAM15.

XL1-Blue: F'⁺:TrJ10 proA⁺B⁺, lacI^q, Δ (lacZ)M15/recA1, endA1, gyrA96 (Nal^r), thi, hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) glnV44 relA1, lac.

Construction of scFv BCF2

The segments of DNA used for the assembly of the scFv BCF2 were amplified from the pMrec-chFab-BCF2 phagemid³⁸ by means of a three-step PCR using high-fidelity Vent polymerase. In the first step, the variable domains were amplified. For the heavy chain, two primers were used: V_HBCF2 5', a forward oligonucleotide (5' GAG GTT CAG CTG CAA CAG TCT 3') and V_HBCF2 3', a reverse oligonucleotide (5' TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT 3'). In the case of the light chain, the combination of oligonucleotides was V_LBCF2 5', forward (5' GAC ATT GTG TTG ACC CAA TCT 3') and V_LBCF2 3', reverse (5' TTT CAG CTC CAG GTT GGT CCC 3'). In the second PCR step, overlapping sequences corresponding to the scFv linker ((Gly₄Ser)₃) were introduced into each variable domain encoding fragment. The primers used were V_HBCF2 5' and linkV_H (5' AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT

GAC 3') for heavy chain, and linkV_H (5' GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GTG TTG ACC 3') plus V_HBCF2 3' for light chain. The conditions used for the first and second steps of PCR were: one hold at 94 °C for three minutes, 30 cycles at 94 °C for one minute, 55 °C for one minute and 72 °C for one minute, with a final extension hold at 72 °C for ten minutes. In the third step, a combination of overlapping PCR and amplification of the overlapped product took place; V_HforSfiI (5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTT CAG CTG CAA CAG TCT 3') and V_LrevNotI (5'GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT CAG CTC CAG GTT GGT CCC AGC ACC 3'), were the primers used for the amplification of an approximately 800 bp DNA segment encoding the scFv BCF2. These primers include restriction sites for SfiI and NotI. For the overlapping reaction, the conditions were: eight cycles at 94 °C for 1.30 minutes, 60 °C for 1.30 minutes and 72 °C for 1.30 minutes, in the absence of primers and for the amplification, 30 cycles at 94 °C for one minute, 60 °C for one minute and 72 °C for one minute, with a final extension hold at 72 °C for ten minutes. A GeneAmp PCR thermo-cycler (PERKIN ELMER 2400, Norwalk, CT, USA), was used for all PCR reactions. PCR products were run in 1% (w/v) agarose gel electrophoresis and purified using a QIAquick gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). The scFv BCF2 DNA was digested sequentially with SfiI and NotI, run in 1% agarose gel, purified as described and cloned into pSyn2 vector (SfiI/NotI digested), in order to display the scFv on the surface of a filamentous phage.

DNA sequencing

The identity of the scFv BCF2 and its variants was verified by DNA sequencing using the forward primer pSynDir (5'AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA 3'). As reverse primers we used RevpSyn2 (5'ACT TTC AAC AGT CTA TGC GGC 3') for pSyn2 and RevpSyn1 (5' ATG GTG ATG ATG GTG ATG TGC GGC CCC 3') for pSyn1 in an Applied Biosystems 3100 Gene Analyzer (Foster City, CA, USA).

Expression and purification of soluble scFv BCF2 and its mutants

The scFv BCF2 DNA segment was subcloned into the pSyn1 which contains the same restriction sites as pSyn2. The construction was electroporated into *E. coli* TG1 cells. The cells were grown in 500 ml YT2X medium supplemented with 0.1% (w/v) glucose plus ampicillin (200 µg/ml) at 37 °C. When the culture reached an $A_{600\text{ nm}}=0.7$, the scFv expression was induced with 1 mM IPTG at 30 °C for six hours. The culture was centrifuged at 4500 rpm (in a Beckman J2-21 centrifuge and the JA-20 rotor) at 4 °C for 15 minutes and the pellet resuspended in 12.5 ml of PPB extraction buffer (30 mM Tris-HCl (pH 8.0), containing 1 mM EDTA and 200 mg/l sucrose). The suspension was incubated on ice for 20 minutes and centrifuged at 5000 rpm for 15 minutes. Supernatant was collected and the pellet resuspended in 12.5 ml of 5 mM MgSO₄. The resuspended pellet was incubated on ice for 20 minutes and centrifuged at 15,000 rpm (in a Beckman J2-21 centrifuge and the JA-20 rotor) for 15 minutes and the supernatant collected. Both supernatants (periplasmic extracts) were mixed and dialyzed against PBS1X at 4 °C overnight (O/N). After dialysis, the periplasmic extracts were purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography (QIAGEN GmbH, Hilden,

Germany). Samples were eluted with 1 ml of 250 mM imidazole/PBS1X. The scFvs were purified by gel filtration chromatography on a Superdex[®]75 column (10 mm×300 mm; Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). Eluted fractions containing the dimeric scFv were used for analysis in ELISA tests and for toxin neutralization assays.

In vivo neutralization assays

CD1 female mice were used for the *in vivo* neutralization assays. The toxin dose was normalized for mouse weight to correspond to 1 LD₅₀ (0.25 µg/20 g of mouse weight). One LD₅₀ was incubated with 16 µg of scFv corresponding to a molar ratio of 1:10 (toxin:scFv dimeric). The antibody-toxin mixture was incubated for 30 minutes at room temperature and injected intraperitoneally into mice. As control, the toxin alone was used. The animals were observed for up to 36 hours after injection. Ten animals were used for each test condition and the survival ratio recorded. These conditions were considered sufficient for validation of the experimental results and were approved by the Committee for Animal Welfare of our Institute.

Mutant libraries

The scFv BCF2 DNA was used as template to generate three libraries with different rates of mutation (high, medium and low) by means of error prone-PCR. A single round of error prone-PCR, in the conditions required to obtain the different rates of mutation, was carried out by the methods described (medium rate¹⁷ and high rate¹⁸). For low rate of mutagenesis, we used conventional PCR conditions but increasing the concentration of MgCl₂ to 70 mM. The primers used to amplify the mutant libraries were V_HforSfiI and V_LrevNotI. One hold at 95 °C for five minutes, 30 cycles at 95 °C for one minute, 60 °C for one minute and 72 °C for 10 minutes, with a final extension hold at 72 °C for 10 minutes were the conditions used. Eight µg of the mutagenized scFv DNA from each library and 8 µg of pSyn2 phagemid, both previously digested with SfiI and NotI enzymes, were purified as already described and ligated at a 1:5 molar ratio (vector:insert) at 16 °C for 18 hours in a final volume of 200 µl. The ligated products were electrotransformed into competent *E. coli* XL1-Blue cells. The size of the libraries was determined by plating serial dilutions of the transformed cells on YT2X plates supplemented with 2% glucose, ampicillin (200 µg/ml) and tetracycline (30 µg/ml). The phagemid DNA from ten isolated colonies was purified and sequenced to determine the diversity and the mutagenesis rate in each library.

Biopanning

Low, medium and high rate of mutagenesis libraries were separately panned against the toxin Cn2 of *Centruroides noxius*. Two hundred µl from the respective library were inoculated into 15 ml of YT2X supplemented with 2% glucose plus 200 µg/ml ampicillin and grown at 37 °C with shaking (250 rpm). When the absorbance at 600 nm reached 0.7, 20 µl of helper phage VCSM13 (7×10¹² phages/ml) were added. The growing of the culture and harvesting of phages was performed as described.²¹ Four rounds of panning were performed, using decreasing concentrations of the Cn2 toxin in order to enrich phage-antibodies with increased affinities for this toxin. MaxiSorp immunotubes (Nunc-Immuno[™]

tubes Brand products, Roskilde, Denmark) were coated overnight with 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml or 1 µg/ml of Cn2 in 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.4) at 4 °C. The bio-panning was performed as described.²¹ After washing with PBS1X Tween-20, bound phages were detached by adding 1 ml of XL1-Blue cells ($A_{600\text{ nm}} = 0.7$), incubating at 37 °C for 30 minutes without shaking and 30 minutes with shaking as described.^{39,40} The cells were then plated on two YT2X-agar plates supplemented as described and incubated at 37 °C O/N. Selected phagemid DNA molecules were once again rescued as infecting particles from the scraped cells with helper phage as described above. The phages were used to initiate a new round of panning. Resulting colonies from the fourth round were collected and characterized.

Phage-antibody ELISA

A total of 88 isolated colonies from the fourth round of panning of each library were grown in 100 µl of YT2X supplemented with 2% glucose plus ampicillin (200 µg/ml) in the wells of a cell culture plate with flat bottom (Costar, New York, USA). Culture plates were incubated at 37 °C with shaking at 250 rpm O/N (Master plate). Replica plates (round bottom) were prepared inoculating 2 µl of the previous culture in 125 µl/well of YT2X supplemented as described. Replica plates were incubated at 37 °C with shaking at 250 rpm for three hours. Aliquots of 25 µl of 1×10^9 helper phages/ml were added to each well. The plates were incubated at 37 °C for 30 minutes without shaking and 30 minutes with shaking at 250 rpm. The culture plates were centrifuged at 3500 rpm, 4 °C, ten minutes and the supernatant was removed and the cells resuspended in 125 µl/well of YT2X supplemented with 200 µg/ml ampicillin and 30 µg/ml kanamycin. A final incubation O/N at 30 °C with agitation was done. The culture plates were centrifuged at 3500 rpm, 4 °C, ten minutes and the supernatant collected for ELISA.

Duplicate ELISA plates were coated with 100 µl/well of Cn2 toxin at a concentration of 3 µg/ml in 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.4) and incubated at 4 °C O/N. Plates were washed thrice with PBS1X/0.1% Tween-20 and saturated with 0.5% (w/v) BSA (200 µl/well) for two hours at 37 °C. Plates were washed thrice with PBS1X/0.1% Tween-20. Fifty µl of phage supernatant were mixed with 50 µl of PBS1X and added to each well of the previously saturated ELISA plate and incubated at 37 °C for one hour. Plates were washed thrice with PBS1X/0.1% Tween-20. The presence of bound specific phage-antibodies was revealed by adding 100 µl of a 1 : 2000 dilution (PBS1X) of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Plates were incubated in the dark one hour at 37 °C and washed thrice with PBS1X/0.1% Tween-20. HRP activity was detected by adding 100 µl/well of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5), containing O-phenylenediamine and H₂O₂ as substrates. After ten minutes, the reaction was stopped by adding 100 µl/well of 6 M HCl and the absorbances read at 492 nm in a BIO-RAD ELISA autoreader, model 2550 EIA Reader (BIO-RAD, Richmond, CA, USA). Positive clones were named according to the position of their respective well in the master plate.

ELISA of soluble single-chain antibodies

Procedures were similar to phage ELISA except that the expression of soluble scFvs was initiated by growing of

the colonies from master plate in YT2X/0.1% glucose supplemented with 200 µg/ml ampicillin, until the $A_{600\text{ nm}}$ was 0.7. Plates were incubated for six hours at 37 °C with shaking at 250 rpm. Culture plates were induced by adding 25 µl/well of YT2X medium with IPTG (USB, Cleveland, OH, USA) and ampicillin to final concentrations of 1 mM and 200 µg/ml, respectively. Plates were incubated at 30 °C O/N and centrifuged at 3500 rpm for ten minutes at 4 °C. Fifty µl of these supernatants were added to their respective wells of an ELISA plate previously coated with 3 µg/ml of Cn2 toxin in 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.4). ELISA plates were incubated at 37 °C for one hour and washed. Aliquots of 100 µl/well of a 1 : 2000 dilution (PBS1X) of mouse anti-c-myc antibody (ZYMED, San Francisco, CA, USA) were added. Plates were incubated one hour at 37 °C and washed. Aliquots of 100 µl/well of a 1 : 2000 dilution (PBS1X) of goat anti-mouse-HRP antibody (ZYMED, San Francisco, CA, USA) were added. Plates were incubated one hour at 37 °C in the dark and washed. HRP activity detection and plate reading were done as already described.

Combination of mutations from G5 and B7

The mutations in G5 and B7, isolated from the panning procedures, were combined by means of PCR. In the first PCR the oligos V_HforSfiI and Iso35rev (5' CTT CAC CCA GAT CAT GGT GTG 3') were used in an equimolar ratio in order to amplify the segment containing a mutation at position 35 (N35I). The B7 DNA was used as template. The product of this reaction, whose size was 147 bp, was purified and used as a mega-primer in a second step of PCR. This second step was carried out using G5 DNA as template. The mega-primer generated in the first round of PCR and oligo V_KrevNotI were used as primers. One hold at 94 °C for three minutes, 30 cycles at 94 °C for one minute, 60 °C for one minute and 72 °C for one minute, with a final extension hold at 72 °C for ten minutes were the conditions used in both steps. The PCR product was extracted, purified from an agarose gel and digested sequentially with SfiI and NotI. One hundred ng of the 800 bp fragment were ligated with 100 ng of pSyn2 and pSyn1 vectors. The constructions were transformed into *E. coli* TG1. The combination of mutations was verified by DNA sequencing.

Specificity test of phage-antibodies

High binding ELISA plates (polystyrene; COSTAR 3366, New York 14831, NY, USA) were coated (100 µl/well) with different antigens at the indicated concentration, in 50 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9.4). The toxins used as antigens were all specific for sodium channels, approximately 7 kDa M_r and their concentration was 1 µg/ml (Cn2, Cl11, Cl12, Pg7 and Pg8). The proteins used at 20 µg/ml were: casein, BSA and trypsin. Toxic fraction II of scorpion *C. limpidus limpidus* at 20 µg/ml, was also employed. The phage-antibodies were added at a concentration of 5×10^{11} /ml in PBS 1X (100 µl/well). ELISA plates were processed as described.

Functional stability assays

High binding ELISA plates were coated as described with Cn2 toxin. After washing and blockade with BSA, 100 µl of 10 µg/ml of soluble scFvs were added in the presence of different concentrations (0.5–4 M) of guanidinium hydrochloride in PBS1X (100 µl/well) and

incubated one hour at 37 °C.⁴¹ The remaining of the ELISA process was performed as described.

Surface plasmon resonance measurements

All the experiments were performed at 25 °C using a BIAcoreX instrument (Amersham Pharmacia Biotech). Toxin Cn2 was covalently immobilized onto a CM5 sensor chip (BIAcore AB) using the amino coupling procedure, at a concentration of 15 µg/ml in 10 mM Mes buffer (pH 6) as recommended by manufacturers. Approximately 480 resonance units (RU) of protein were immobilized. To determine the kinetic constants, different concentrations of dimeric antibody fragments were injected, flowing at a rate of 30 µl/minute in PBS1X (pH 7.4) containing 0.005% P20 (polyoxyethylenesorbitan). The injection times were: for association, 120 seconds and for dissociation, 600 seconds. For the triple mutant, the injection times for association and dissociation were 180 seconds and 1200 seconds, respectively. The surfaces were regenerated by injecting 10 µl of a 10–15 mM NaOH solution, flowing at a rate of 5 µl/minute. Binding data were fitted to 1:1 Langmuir binding model of BIA evaluation software ver 3.2 (BIAcore AB), using rate equations with the term for drifting base line. For the triple mutant, a clear mass transfer phenomenon was observed. In order to obtain more realistic data for the determination of the K_D of this mutant, the Langmuir binding model with mass transfer limitation was applied.

Acknowledgements

This work was partially supported by a grant (P-156) from the Mexican "Instituto Bioclon, S.A. de C.V.". We thank Dr Joel Osuna for the critical reading and helpful discussions on the manuscript. We are indebted to D.V.M. Elizabeth Mata, D.V.M. Barbara Mondragon and Mr Sergio Gonzalez for invaluable help and animal supply. We also thank Dr Paul Gaytán, MSc. Eugenio López and BSc. Santiago Becerra for oligonucleotide synthesis and purification, Mr Fredy Coronas and BSc. Cipriano Balderas for technical assistance and BSc. Alma Martínez-Valle for computational assistance. The scholarship to V. R. J. G. from the National Council of Science and Technology (CONACYT, 113972), is also acknowledged.

References

- Bon, C. (1996). Serum therapy was discovered 100 years ago. In *Envenomings and their Treatments* (Bon, C. & Goyffon, M., eds), pp. 4–9, Fondation Marcel Merieux, Lyon, France.
- Calderón-Aranda, E. S., Dehesa-Dávila, M., Chavez-Haro, A. & Possani, L. D. (1996). Scorpion stings and their treatment in México. In *Envenomings and their Treatments* (Bon, C. & Goyffon, M., eds), pp. 311–320, Fondation Marcel Merieux, Lyon, France.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, M. B., Gurrola-Briones, G., Herion, P. & Possani, L. D. (1992). Amino acid sequence and immunological characterization

with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* **204**, 281–292.

- Licea, A. F., Becerril, B. & Possani, L. D. (1996). Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are able of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, **34**, 843–847.
- Mousli, M., Devaux, Ch., Rochat, H., Goyffon, M. & Billiald, P. (1999). A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *FEBS Letters*, **442**, 183–188.
- Devaux, Ch., Moreau, E., Goyffon, M., Rochat, H. & Billiald, P. (2001). Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin AahI from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* **268**, 694–702.
- Clot-Faybessé, O., Juin, M., Rochat, H. & Devaux, Ch. (1999). Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* Hector scorpion neurotoxin I: characterization and use for venom neutralization. *FEBS Letters*, **458**, 313–318.
- Nishida, Y., Torigoe, K., Aizawa, Y., Okura, T., Mori, T., Yamauchi, H. *et al.* (1998). Cloning and expression of a single-chain Fv fragment specific for the human interleukin 18 receptor. *Hybridoma*, **17**, 577–580.
- Poon, K. Y., Tam, F. C., Chui, Y. L. & Lim, P. L. (2002). Single-chain Fv fragment lacks carrier specificity of the native antibody. *Mol. Immunol.* **39**, 19–24.
- Arndt, M. A., Krauss, J., Schwarzenbacher, R., Vu, B. K., Greene, S. & Rybak, S. M. (2003). Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer*, **107**, 822–829.
- Jun, S., Honegger, A. & Plückthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* **294**, 163–180.
- Worn, A. & Plückthun, A. (1999). Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: identification, classification and improvement by protein engineering. *Biochemistry*, **38**, 8739–8750.
- Worn, A. & Plückthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **305**, 989–1010.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Iverson, B. L. & Georgiou, G. (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 2029–2034.
- Boder, E. T., Midelfort, K. S. & Wittrup, D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 10701–10705.
- Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbuhl, B., Amstutz, P., Cambillau, C. & Plückthun, A. (2004). Directed *in vitro* evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *J. Biol. Chem.* **279**, 18870–18877.
- Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Applic.* **2**, 28–33.
- Leung, D. W., Chen, E. & Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique. J. Meth. Cell. Mol. Biol.* **1**, 11–15.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell,

- D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552–554.
20. Barbas, C. F., III, Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 7978–7982.
21. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581–597.
22. de Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. & Quattrocchio, F. (1999). Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnol.* **17**, 397–399.
23. Pini, A. & Bracci, L. (2000). Phage display of antibody fragments. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 155–169.
24. Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Advan.* **19**, 1–33.
25. Azzazy, M. E. H. & Highsmith, W. E. (2002). Phage display technology: clinical application and recent innovations. *Clin. Biochem.* **35**, 425–445.
26. Kotz, J. D., Bond, C. J. & Cochran, A. G. (2004). Phage-display as a tool for quantifying protein stability determinants. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1623–1629.
27. Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **196**, 901–917.
28. Calderón-Aranda, E. S., Olamendi-Portugal, T. & Possani, L. D. (1995). The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine*, **13**, 1198–1206.
29. Jensen, K. B., Larsen, M., Pedersen, J. S., Christensen, P. A., Alvarez-Vanilla, L., Goletz, S. *et al.* (2002). Functional improvement of antibody fragments using a novel phage coat protein III fusion system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 566–573.
30. Graff, Ch. P., Chester, K., Begent, R. & Wittrup, K. D. (2004). Directed evolution of an anti-carcinoma-embryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 °C. *Protein Engng. Des. Sel.* **17**, 293–304.
31. Aubrey, N., Devaux, C., Sizaret, P. Y., Rochat, H., Goyffon, M. & Billiald, P. (2003). Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 617–628.
32. Lantto, J., Fletcher, J. M. & Ohlin, M. (2002). A divalent antibody format is required for neutralization of human cytomegalovirus via antigenic domain 2 on glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **83**, 2001–2005.
33. Pintar, A., Possani, L. D. & Delepiere, M. (1999). Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J. Mol. Biol.* **287**, 359–367.
34. Calderón-Aranda, E. S., Selisko, B., York, E. J., Gurrola, G. B., Stewart, J. M. & Possani, L. D. (1999). Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* **264**, 746–755.
35. Selisko, B., Licea, A. F., Becerril, B., Zamudio, F. & Possani, L. D. (1999). Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **37**, 130–143.
36. Ramirez, A. N., Martín, M. B., Gurrola, G. B. & Possani, L. D. (1994). Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon*, **32**, 479–490.
37. Dehesa-Dávila, M., Ramírez, A. N., Zamudio, F. Z., Gurrola-Briones, G., Liévano, A., Darszon, A. & Possani, L. D. (1996). Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *limpidus noxius*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **113**, 331–339.
38. Selisko, B., Cosío, G., García, C., Becerril, B., Possani, L. D. & Horjales, E. (2004). Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, **43**, 43–51.
39. Sblattero, D. & Bradbury, A. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnol.* **18**, 75–80.
40. Lou, J., Marzari, R., Verzillo, V., Ferrero, F., Pack, D., Sheng, M. *et al.* (2001). Antibodies in haystacks: how selection strategy influences the outcome of selection from molecular diversity libraries. *J. Immunol. Methods*, **253**, 233–242.
41. Bose, B., Chugh, D. A., Kala, M., Acharya, S. K., Khanna, N. & Sinha, S. (2003). Characterization and molecular modeling of a highly stable anti-Hepatitis B surface antigen scFv. *Mol. Immunol.* **40**, 617–631.

Edited by I. Wilson

(Received 4 October 2004; received in revised form 15 December 2004; accepted 30 December 2004)

9. RESULTADOS NO PUBLICADOS.

A) Análisis de la expresión del scFv de BCF2 por SDS-PAGE.

La construcción y expresión del scFv de BCF2 (descrita en el Artículo 1) (Anexo 3), fue evaluada. La proteína purificada por medio de la cromatografía de afinidad (Níquel-agarosa), se analizó en un gel SDS-PAGE (Figura 4). En este gel se observa que la proteína se encuentra pura y presenta un peso molecular de 30 kDa aproximadamente, que corresponde al valor teórico esperado de un scFv. El control negativo demuestra que no hay degradación del anticuerpo y proteínas contaminantes de *E. coli*.

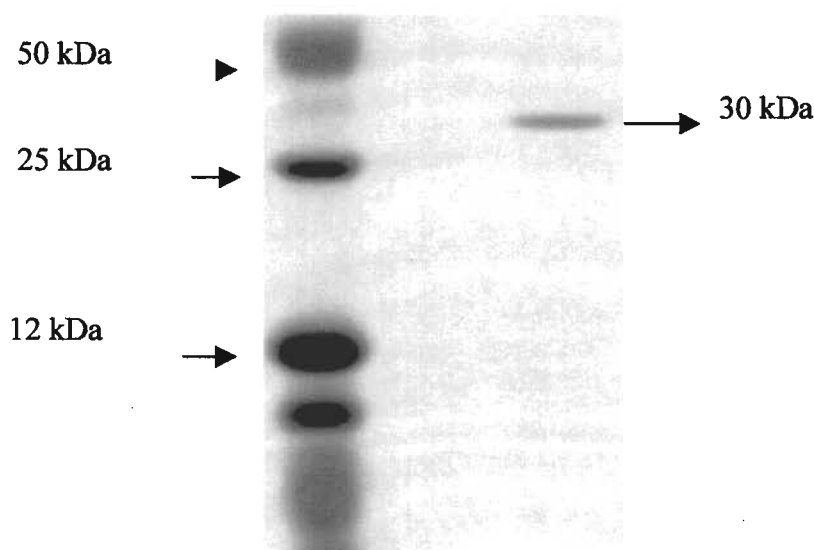


Figura 4. Se muestra la presencia del scFv de BCF2 en el gel SDS-PAGE al 12%. En el carril 1, se encuentra el marcador de peso molecular, para proteínas de peso molecular de bajo rango. El carril 2, es la muestra derivada de lo que se despegó de la columna de afinidad a una concentración de 250 mM de Imidazol de la cepa TG1 transformada con el plásmido pSyn1 y finalmente el carril 3, es la muestra desprendida con 250 mM de Imidazol de la cepa TG1 transformada con el plásmido pSyn1 que lleva clonado el gen del scFv de BCF2.

B) Elección del sistema para la recuperación de los fago-anticuerpos.

Se probaron 3 metodologías para determinar cual es la más eficiente, en la recuperación de los fago-anticuerpos. En este ensayo se empleó el scFv de BCF2 contra la toxina Cn2 (ver materiales y métodos). Los resultados de la recuperación se describen en la Tabla 4, en la que se observa que el sistema más eficiente es la recuperación por células, seguido de la TEA y finalmente la tripsina.

La recuperación con células fue la metodología usada, para las rondas de tamizado de las bibliotecas generadas del scFv de BCF2.

No. de tamizados	Tratamiento	No. de fago-anticuerpos/ml	No. de fagos recuperados
1	Tripsina	2×10^{13}	2011
1	TEA	2×10^{13}	3053
1	XLI-Blue	2×10^{13}	5510

Tabla 4. Muestra el número de fago-anticuerpos recuperados contra la toxina Cn2, empleando diferentes tratamientos, a partir de una concentración de 2×10^{13} fago-anticuerpos/ml.

C) ELISA de fago-anticuerpos de cuarta ronda de tamizado.

Después de realizar 4 rondas de selección, a partir de los bancos mutagénicos generados del scFv de BCF2, se evaluó por ELISA de fago-anticuerpos el reconocimiento a Cn2. En esta prueba se observó que más del 80% de las clonas dieron señales que se salieron de escala del lector de ELISA. El control (fago-anticuerpo del scFv de BCF2), sólo mostró un valor de 0.5 de absorbancia en el lector (Figura 5). Un segundo control empleado fue el fago-anticuerpo de la clona humana 3F (Artículo 2), que reconoce específicamente a la toxina Cn2. Para ello se siguió la metodología descrita en el artículo 2 (materiales y métodos).

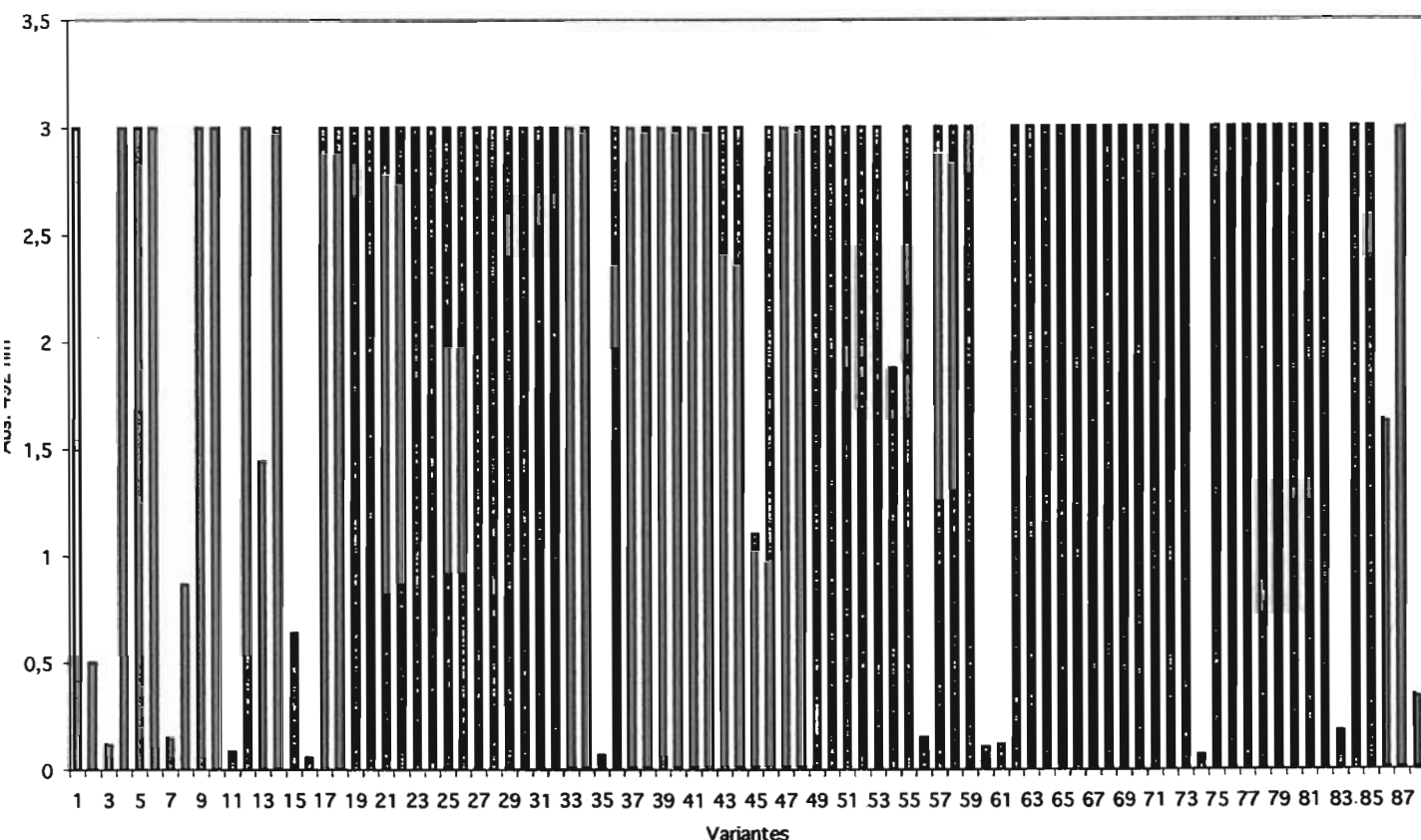


Figura 5. ELISA de fago-anticuerpos de cuarta ronda de selección contra la toxina Cn2. El carril 1 pertenece a la clona humana 3F, el carril 2 pertenece al scFv de BCF2; los carriles 3 al 46, son clonas derivadas de la biblioteca de mutagénesis media (MM) y los carriles 47 al 88, son clonas derivadas del banco de mutagénesis baja (MB) del scFv de BCF2.

D) Caracterización de las variantes seleccionadas como fago-anticuerpos.

1) Pruebas de reconocimiento a Cn2 en ELISA.

De las variantes ganadoras de la cuarta ronda de selección, se tomaron solamente las clonas que dieron señales altas en el ELISA de proteína soluble, ver Artículo 1 (resultados). Los cambios de las dos mejores variantes G5 y B7, fueron mezcladas para formar a la Triple mutante. Las 3 variantes (G5, B7 y Triple mutante), fueron recuperadas como fago-anticuerpos los cuales se titularon y se emplearon para hacer una ELISA cuantitativa. En la figura 6 se observa que la clona scFv de BCF2, a concentraciones de 1×10^{12} fagos/ml y 5×10^{11} fagos/ml presenta una absorbancia de 2 y 1 respectivamente, mientras que las variantes seleccionadas presentan lecturas que se salen de la escala.

En la dilución de 5×10^{10} fagos /ml se pueden observar mejor las diferencias de las variantes en el reconocimiento, en orden ascendente son el scFv de BCF2, G5, B7 y la triple mutante (Figura 6). La triple mutante fue la variante que mantuvo el mayor reconocimiento hacia la toxina Cn2, en las menores diluciones, mientras que las clonas G5 y B7 mostraron valores intermedios (Figura 6).

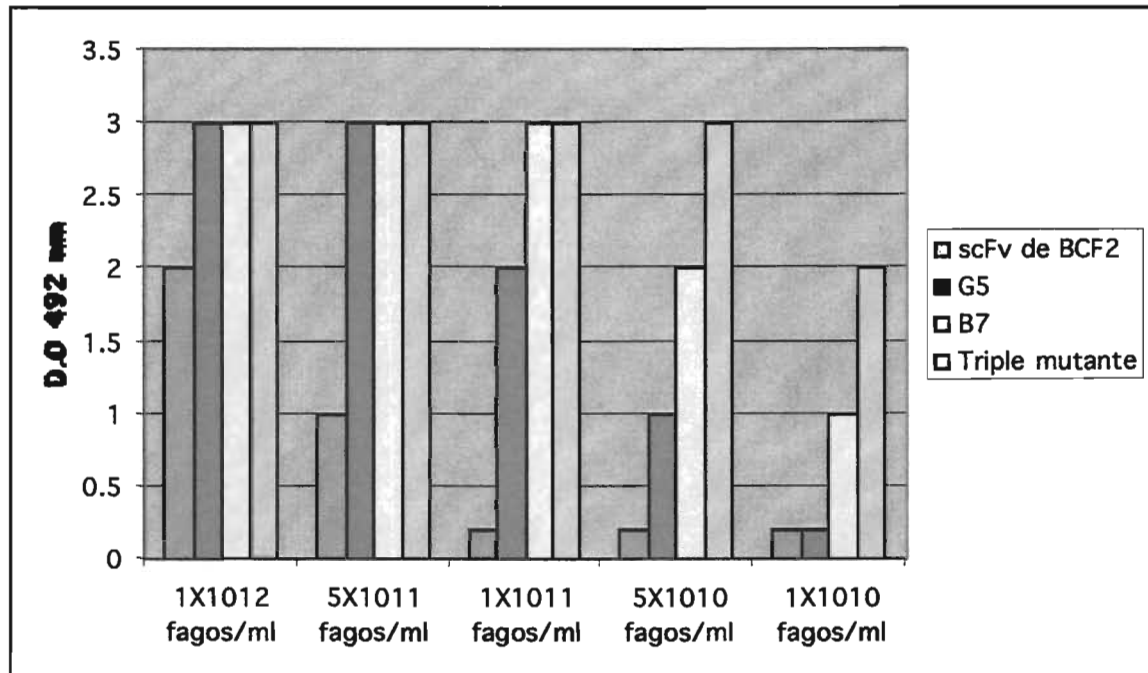


Figura 6.- ELISA de fago-anticuerpos de las variantes (scFv de BCF2, G5, B7 y Triple mutante), reconociendo a la toxina Cn2, usando diferentes diluciones de los fagos. La grafica es el promedio de 4 ensayos.

2) Estabilidad funcional.

Los fagos del scFv de BCF2 en presencia de 0.5 M de cloruro de guanidinio, presentaron una disminución al 70% en la señal de reconocimiento hacia la toxina; mientras que el resto de las mutantes mantuvieron el 100% de la señal de reconocimiento.

Al incrementar la concentración del agente desnaturizante a 1M, los fagos del scFv de BCF2 presentaron un reconocimiento basal de tan solo un 10%, mientras que los fagos de las mutantes G5, B7 y Triple mutante, mantuvieron el 80, 90% y 100% de la señal respectivamente (Figura 7).

A la concentración de 2 M del desnaturizante, los fagos de la G5 presentaron niveles basales en el reconocimiento, mientras que en los fagos de B7 y de la Triple mutante, las señales se encuentran en

70% y 75%, respectivamente (Figura 7). En presencia del cloruro de guanidinio el fago de la Triple mutante, resultó ser la mutante que mejor reconoce a la Cn2.

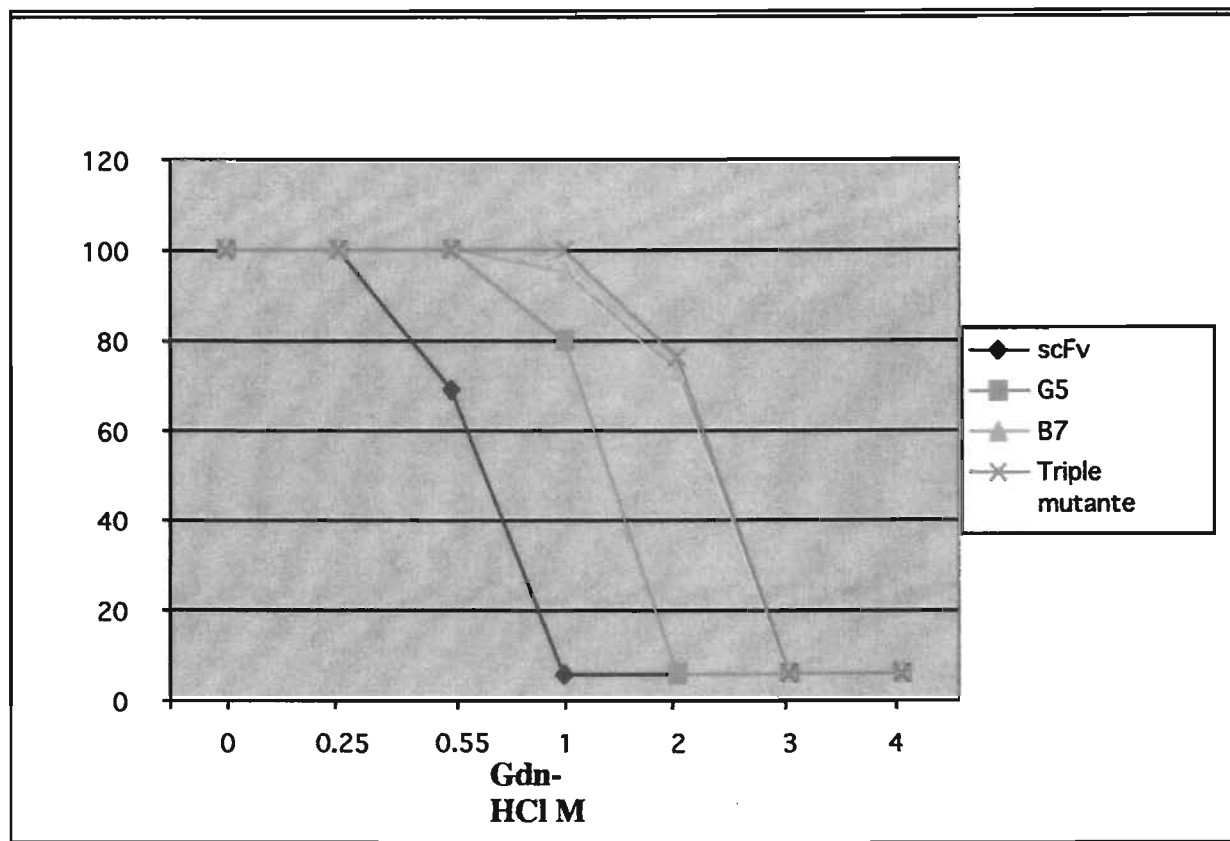


Figura 7. ELISA de estabilidad funcional de los fago-anticuerpos (scFv de BCF2, G5, B7 y Triple mutante), reconociendo a la Cn2 ante diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio (Gdn-HCl).

E) Pruebas de neutralización en la relación molecular 1:1 (toxina/scFv dimérico).

Con las variantes se realizaron ensayos de protección empleando otras relaciones moleculares de toxina y anticuerpo. La relación molecular 1:10 (toxina/anticuerpo dimérico) (ver Artículo 1), mostró que la variante Triple mutante tiene la capacidad de proteger los efectos de la toxina Cn2. Otra relación molecular probada fue 1:1 (toxina/anticuerpo dimérico) (ver tabla 5); en donde se observó que en el caso de la DL_{50} sobrevivieron 6 ratones de los 10 probados, mientras que el grupo de ratones probados con el scFv de BCF2 en presencia de la toxina, solo sobrevivieron 3 ratones de los 10 tratados. Las variantes G5, B7 y triple mutante, aunque mostraron una mayor sobrevivencia que el scFv de BCF2, ningún scFv fué capaz de proteger al 100% (Tabla 5).

Ensayo	Dosis	Relación molecular toxina/anticuerpo	Ratones empleados	Sobrevivientes
Cn2	1DL ₅₀	1:0	10	6
Cn2+scFv de BCF2	1DL ₅₀	1:1	10	3
Cn2+G5	1DL ₅₀	1:1	10	6
Cn2+B7	1DL ₅₀	1:1	10	4
Cn2+Triple	1DL ₅₀	1:1	10	6
Cn2+BCF2	1DL ₅₀	1:10	10	10
scFv	-	0:10	10	10
Triple mutante	-	0:10	10	10

Tabla 5. Experimentos de neutralización de la toxina Cn2 con los scFvs diméricos derivados del scFv de BCF2. Los ensayos de neutralización se realizaron utilizando 1 LD₅₀ de Cn2 y los anticuerpos (scFvs) en una relación molecular 1 a 1 (0.25 µg de Cn2/1.6 µg de cada scFv). Los controles realizados fueron 1DL₅₀ de Cn2, 16 µg de anticuerpo/20 g de ratón de el scFv de BCF2 y Triple mutante. También se realizó la neutralización con el anticuerpo BCF2.

F) Ensayos de desplazamiento en el BIACORE.

La evolución dirigida produce cambios en la secuencia y es importante verificar si la mutante obtenida mantiene el mismo sitio de reconocimiento que el anticuerpo BCF2 por la toxina Cn2. Para verificar ésto, se realizaron dos diferentes ensayos (ver materiales y métodos no publicados).

En el primer ensayo se saturaron los epítopes de la toxina Cn2, con el anticuerpo BCF2 (lo cual se observa en el sensograma hasta los 2450 segundos). La inyección de la triple mutante no produjo cambios en el sensograma (no se observa un incremento significativo en las RU), lo cual nos sugiere que ambos anticuerpos, están reconociendo el mismo epítipo en la toxina Cn2. Al inyectar el tercer anticuerpo, scFv 6009F, se observó un incremento significativo en la señal del BIACORE, lo cual significa que este anticuerpo reconoce un epítipo diferente al reconocido por el BCF2 y la triple mutante (Figura 8).

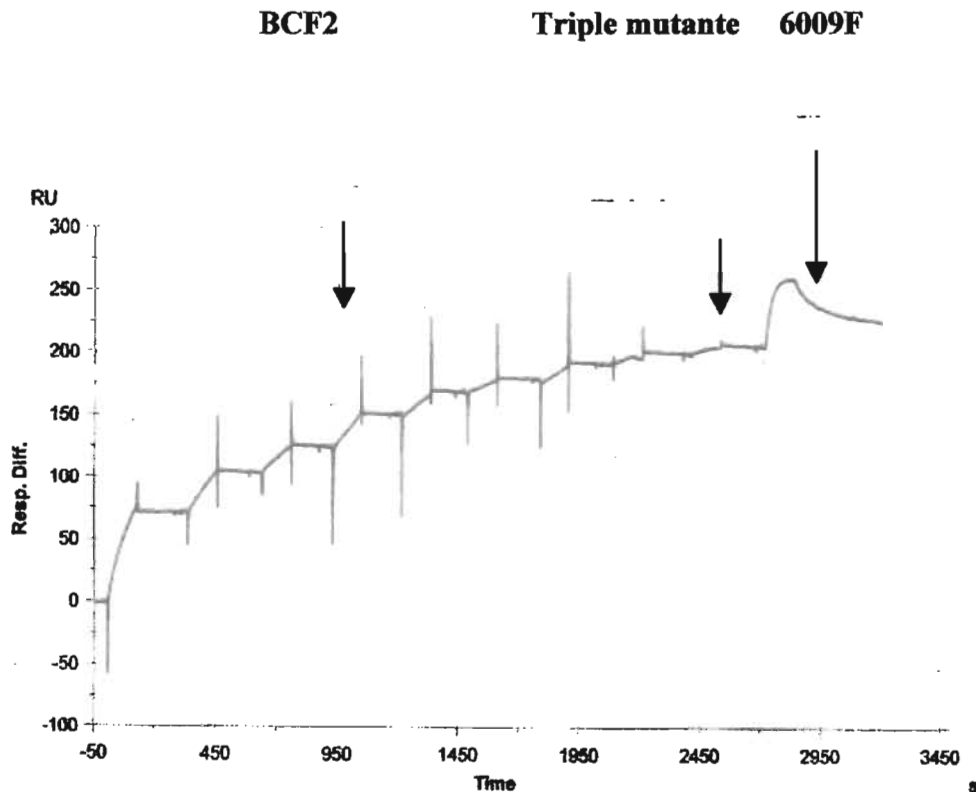


Figura 8.- Desplazamiento en el BIACORE del BCF2, triple mutante y 6009F. Se realizaron 7 inyecciones del monoclonal BCF2 (200 nM), posteriormente dos inyecciones de la triple mutante (20 nM) y finalmente una inyección de la clona humana 6009F (20 nM).

Este primer ensayo también se realizó saturando los epítopes de Cn2 con el scFv Triple mutante (hasta los 2800 segundos), luego inyectando el BCF2 y finalmente el scFv 6009F (Figura 9). De igual manera que el primer ensayo no hay un incremento en las RU, cuando se aplica el BCF2, confirmando que tanto el anticuerpo Triple mutante como el BCF2 compiten por el mismo epítipo. Mientras que la aplicación del anticuerpo scFv 6009F, nuevamente produce un incremento en las RU, dado que reconoce un epítipo diferente.

Triple mutante BCF2 6009F

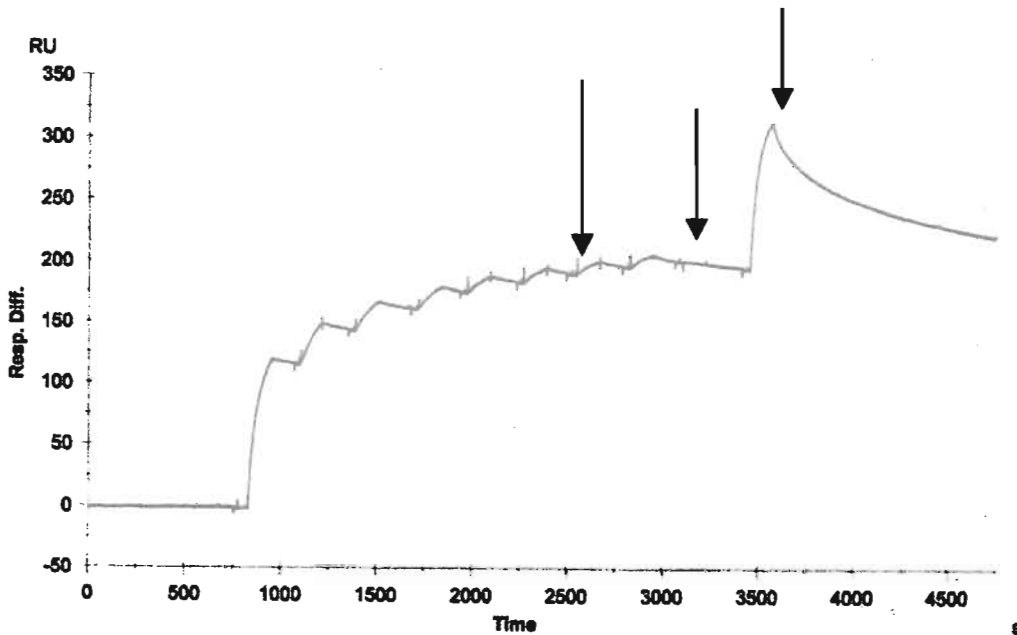


Figura 9.- Desplazamiento en competencia en el BIACORE de la triple mutante, BCF2 y 6009F. Se realizaron 8 inyecciones de la triple mutante (200 nM), posteriormente una inyección del BCF2 (20 nM) y finalmente una inyección de la clona humana 6009F (20 nM).

En un segundo ensayo para verificar que los anticuerpos BCF2 y scFv Triple mutante reconocen el mismo epítopo en la toxina Cn2, se realizaron aplicaciones independientes de cada uno de los anticuerpos y los sensogramas obtenidos son comparados con el sensograma que se genera al aplicar la mezcla de ambos anticuerpos. Al aplicar la mezcla, se obtuvo un sensograma intermedio entre los sensogramas obtenidos independientemente para cada uno de los anticuerpos, lo cual corrobora que ambos reconocen el mismo epítopo (Figura 10). Ya que si reconocieran epítopos diferentes el sensograma resultante sería el correspondiente a la suma de los sensogramas independientes.

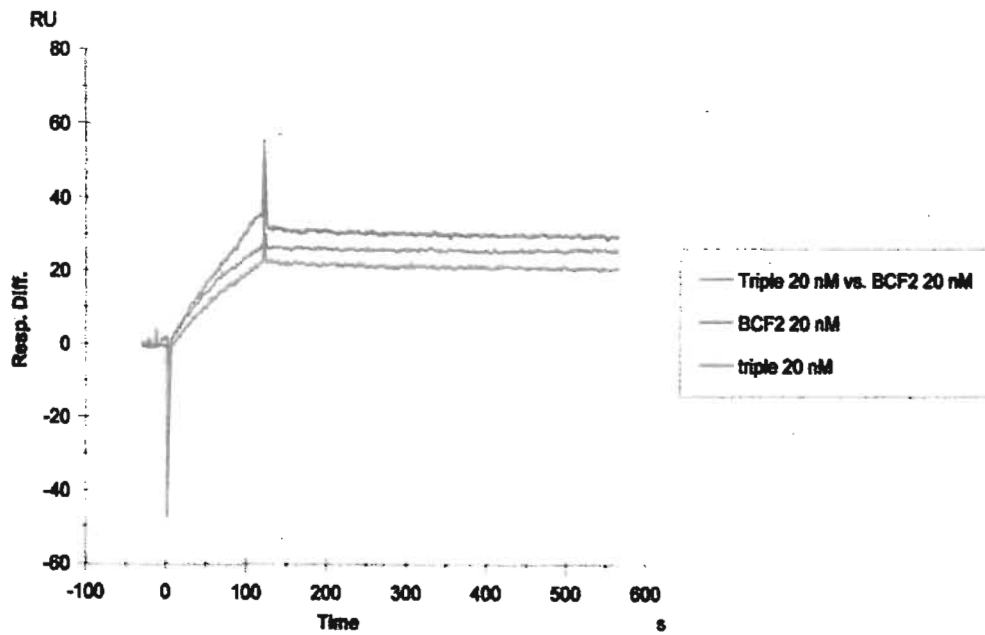


Figura 10.- Desplazamiento en solución en el BIACORE del scFv triple mutante y el BCF2. Todos fueron probados a una misma concentración (20 nM). En verde, está la grafica del monoclonal, en azul está la triple mutante y finalmente en rojo la grafica de ambos.

10. DISCUSION.

En el laboratorio del Dr. Posanni, se obtuvo el anticuerpo murino BCF2, capaz de neutralizar los efectos tóxicos de la toxina Cn2 y del veneno completo del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann (Zamudio et al, 1992). La posibilidad de generar fragmentos de anticuerpos recombinantes, tales como los scFvs, con la capacidad de neutralizar los efectos tóxicos de las toxinas como la Cn2, representa una importante alternativa que puede ser aplicada con fines terapéuticos.

En este trabajo se construyó el scFv de BCF2 por medio de varias reacciones secuenciales de PCR, como se describe en el artículo 1. Es importante considerar que en reportes similares donde se construye la cadena sencilla, generalmente existe una considerable pérdida de la afinidad y de la estabilidad (Nishida et al, 1998; Poon et al, 2002 y Arndt et al, 2003). En algunos casos las propiedades se mantienen, por esto la proteína del scFv del BCF2 fue inicialmente caracterizada. La secuencia del scFv de BCF2 fue clonada en el vector de expresión pSyn1 (Anexo 3) y transformada en la cepa TG1. Después de la inducción, el anticuerpo se purificó en una columna de afinidad a Níquel. En la figura 4, se observa el anticuerpo que corresponde a una banda única, lo cual implica que la proteína no está degradada. Teniendo como referencia el marcador de peso molecular, se observa que el anticuerpo tiene un peso molecular alrededor de 30 kDa, el cual corresponde o esta cercano al valor teórico de la cadena sencilla del BCF2.

El anticuerpo, fue sometido a un segundo paso de purificación por medio de la cromatografía de exclusión molecular (Materiales y Métodos, Artículo 1), en la cual se obtuvieron 2 picos en el perfil de elusión. El primero constituye el 30% de la proteína total y corresponde a la forma dimérica del scFv de BCF2, mientras que el segundo pico es el 70% de la proteína total y corresponde a la forma monomérica del anticuerpo (Anexo 4). Este comportamiento de equilibrio entre monómero-dímero de los scFvs ha sido descrito (Arndt et al, 1998). Hay diversos factores que influyen en la prevalencia de una u otra forma, como la concentración del anticuerpo, la fuerza iónica, pH, T, etc (Arndt et al, 1998). El rendimiento de la expresión del scFv fue de 0.3 mg/L de cultivo.

En las pruebas de ELISA de fago-anticuerpo se verificó que el scFv de BCF2, mantiene el reconocimiento a Cn2. De la misma forma mantiene la especificidad ya que al probar el reconocimiento del scFv de BCF2 contra otras toxinas similares a Cn2 (toxinas de alacranes bloqueadoras de los canales de sodio) y diversas proteínas (Figura 2, Artículo 1), éste solo reconoce a Cn2. El formato de scFv de BCF2 no modificó las propiedades del reconocimiento a la toxina. Al realizar los experimentos de neutralización del scFv de BCF2 con la Cn2, se encontró que este

anticuerpo no neutraliza los efectos de la toxina (Tabla 1, Artículo 1 y Tabla 5), ya que el número de ratones sobrevivientes son menores que en el control (1 LD₅₀). La diferencia observada en la capacidad de protección entre el scFv de BCF2 y el anticuerpo completo BCF2 (Tabla 5) (Zamudio et al, 1992), puede ser explicada por que el scFv de BCF2 es un formato poco estable. El scFv de BCF2 carece de las regiones constantes que lo estabilizan y probablemente que le permiten neutralizar.

Debido a que el scFv de BCF2 no protege, se decidió madurar el scFv con el propósito de obtener una variante con la capacidad de neutralizar a la toxina. Para esto se generaron, 3 bancos a partir del ADN del scFv de BCF2 con diferentes tasas de mutación (baja, media y alta), por medio de la PCR mutagénica. Para tener una mayor probabilidad de seleccionar mutantes mejoradas en cualquiera de los bancos. Las tasas de mutación y el tamaño de cada uno de los bancos se describe a continuación:

Banco	Tamaño	Taza mutagénica (%)
Baja	7.8X10 ⁷ transformantes	0.1
Media	1.8X10 ⁷ transformantes	0.8
Alta	1.6X10 ⁸ transformantes	4.7

Estos bancos tienen una buena variabilidad, y las tazas mutagénicas corresponden a los valores teóricos reportados: Baja 0.1%, Media 0.66% y Alta 3%.

Antes de iniciar los tamizados de estos bancos mutagénicos, se realizó una prueba para determinar el sistema de recuperación de los fago anticuerpos que reconocen a la toxina Cn2 fijada en el inmuntubo. Se realizó el procedimiento descrito en materiales y métodos, donde se pudo observar claramente que la estrategia de Bradbury (Sblattero y Bradbury, 2000), es decir la recuperación directa con células fue la más eficiente (Tabla 4).

Los bancos se desplegaron y fueron sometidos a un proceso de tamizado contra la toxina Cn2 (Artículo 1). De la cuarta ronda de tamizado se evaluaron 88 clonas de cada banco en ELISA de fago anticuerpo contra la toxina Cn2. Mas del 80% de las clonas evaluadas presentaron señales que se salieron de la escala (Figura 5). El control (scFv de BCF2), presento una absorbancia a 492 nm de 0.5 lo cual demuestra que las variantes seleccionadas son mejores que la clona parental. Posteriormente estas mismas variantes fueron evaluadas como proteína soluble, sólo 8 clonas dieron señales positivas en ELISA (Tabla 2, Artículo 1). Las mutantes G5 y B7 presentaron el mejor reconocimiento a la toxina Cn2 y mantuvieron la especificidad (Figura 2, Artículo 1). La clona G5 presentó 2 mutaciones en los CDRs, la primera mutación esta ubicada en el CDR1 (Q27R) y la segunda mutación se encuentra en el CDR2 (V51A) de la cadena ligera (Tabla 2, Artículo 1). La variante B7 presentó una

mutación (N35I) en el andamiaje o framework 2 de la cadena pesada (Tabla 2, Artículo 1). Las mutaciones en los CDRs son importantes ya que estos son los sitios de contacto directo con el antígeno, también se han reportado que mutaciones en los andamiajes o frameworks, pueden mejorar la afinidad del anticuerpo (Daugherty et al, 2000 y Ewert et al, 2004).

Estas variantes fueron transformadas en el vector de expresión y purificadas, en el perfil de exclusión molecular (Anexo 4). La variante B7 presentó un solo pico que corresponde a la forma dimérica de la proteína, causado por la presencia de la mutación N35I, mientras que la variante G5 presentó un perfil de exclusión similar al de scFv de BCF2 pero con mayor tendencia a la forma dimérica (70%). De manera interesante también se observó que la producción de estas 2 variantes es mucho mejor que la del scFv de BCF2. Sin embargo, la variante B7 presenta la mejor productividad de aproximadamente 0.8 mg/L de cultivo mientras que en la variante G5 fue de 0.4 mg/L de cultivo.

Triple mutante

Las mutaciones presentes en las clonas G5 y B7, fueron combinadas para la generación de la triple mutante. Esta clona fue expresada y purificada. El perfil de exclusión molecular fue similar al que presenta la B7 (Anexo 4). Esta presentó la mejor productividad (1mg/L de cultivo), lo cual refleja un efecto aditivo de las mutaciones.

Caracterización de las variantes seleccionadas.

Reconocimiento a Cn2 en ELISA de fago anticuerpo.

Para observar el efecto de las mutaciones en el reconocimiento a la toxina Cn2, se probaron diluciones de las diferentes mutantes en el formato de fago anticuerpos. El scFv presentó una señal de reconocimiento a Cn2 de 0.25 de absorbancia, empleando una concentración de 5×10^{10} fagos/ml. La clona G5 tuvo un valor de absorbancia de 1, lo cual refleja el efecto de las mutaciones en los CDRs, la mutante B7 presentó una absorbancia de 2, lo cual sugiere que la mutación presente en el framework, da una señal más grande que las mutaciones presentes en la clona G5 (Figura 6). La triple mutante presentó la mejor señal que el resto de las mutantes analizadas, lo cual corrobora el efecto aditivo de las mutaciones en el reconocimiento a la toxina en el formato de fago anticuerpo (Figura 6).

Estabilidad.

Se comparó la estabilidad de las variantes a través del reconocimiento a Cn2 en presencia de un agente desnaturizante (Gdn-HCl). La prueba se realizó utilizando la proteína soluble (Figura 3, Artículo 1) y el fago anticuerpos (Figura 7) de cada una de las clonas. Los experimentos realizados mostraron un comportamiento similar, los cuales reflejan que las mutantes presentan un incremento en la afinidad y en la estabilidad, ya que las clonas B7 y G5 soportan mayores concentraciones de Gdn-HCl que la clona silvestre. De manera interesante la Triple mutante resultó ser la clona más estable.

Afinidad

La afinidad de los anticuerpos se determinó en el BIACORE. La constante de afinidad o K_D del scFv de BCF2 fue de 1.1×10^{-9} M (Tabla 3, Artículo 1), este es un valor de afinidad que corresponde a los valores obtenidos de anticuerpos madurados (respuesta secundaria). El BCF2 presenta una afinidad de 2×10^{-9} M (Resultados no publicados), lo cual indica que la afinidad del formato del scFv de BCF2 es del mismo orden que el monoclonal.

Las variantes recuperadas del proceso de maduración (G5 y B7), presentaron un incremento en la K_D (Tabla 3, Artículo 1), llegando en los dos casos al orden de 10^{-10} M (4.3×10^{-10} M para la G5 y 7.1×10^{-10} M para la B7). Estos valores de afinidad se deben a una mejora en la asociación (k_{on}), para la clona B7 fue de 0.5 veces y para la G5 fue de 1.6 veces con respecto al scFv de BCF2. Sin embargo, la disociación (k_{off}) es un parámetro más importante, ya que indica la permanencia de la formación del complejo (toxina/anticuerpo), en este caso la menor disociación la presenta la clona B7, lo cual explica por que presentó un mejor reconocimiento en la ELISA de fago anticuerpos que la clona G5 (Figura 6), al igual que fue mejor en la prueba de estabilidad (Figura 7).

La combinación de los 3 residuos en la Triple mutante, permitió mejorar la K_D a 7.5×10^{-11} M, así como la asociación y la disociación. La k_{off} de las variantes se puede observar en el Anexo 5, donde claramente se puede apreciar los efectos de la maduración en las variantes generadas y la menor disociación.

Neutralización.

Las proteínas de los scFv fueron utilizados para los ensayos de neutralización. Para el caso de los anticuerpos scFv de BCF2, G5 y B7 no neutralizaron en las relaciones moleculares 1:1 ni 1:10 de toxina Cn2 y anticuerpo scFv dimérico (Tabla 1, Artículo 1 y Tabla 5). La aparición de los síntomas del envenenamiento, en los grupos de ratones probados con la toxina (control LD₅₀) y los scFvs (LD₅₀/scFv dimérico), comenzó con la piloerección, sialorrea, paralización total en las extremidades posteriores, intensificación en las contracciones musculares y finalmente la muerte. La triple mutante fue la única variante que mostró un efecto protector (sobrevivencia al 100%), en la relación molecular 1:10 (Tabla 1, Artículo 1), sin embargo presentan una ligera sintomatología de intoxicación y posteriormente se recuperaron.

Dado que la afinidad del scFv de BCF2 es similar a la que presenta el monoclonal, se esperaba que esta construcción tuviera un efecto protector, pero no fue así. Esto puede deberse a que el scFv carece de la avidéz y estabilidad del anticuerpo completo. Con la evolución se logró incrementar la afinidad, factor que puede contribuir en la eficiencia de protección, así como en la estabilidad. Las clonas G5 y B7 aunque mejoraron la afinidad y la estabilidad no protegieron. De manera muy interesante la variante G5 retardó la aparición de los síntomas del envenenamiento.

La variante triple mutante además de proteger, es la más estable de todas las construcciones, pero sin alcanzar la estabilidad del anticuerpo completo, por lo que se requiere del empleo de una mayor concentración de anticuerpo (relación molecular 1:10 toxina:scFv dimérico), para ser neutralizante. La recuperación de la capacidad de neutralización del scFv, se logró por la combinación de 3 cambios presentes en las dos variantes maduras. Este efecto aditivo no siempre ocurre en los trabajos de mejoramiento de las propiedades de las proteínas, nuestro resultado muestra que los cambios seleccionados tienen un papel fundamental en el reconocimiento a Cn2, que le permite retener a la toxina e impedir la muerte de los ratones ensayados tal como lo hace el anticuerpo completo.

Desplazamiento.

Con el fin de conocer si la triple mutante mantiene el reconocimiento por el mismo epítotope en la toxina Cn2, al que reconoce el monoclonal BCF2 se realizaron 2 estrategias. Por la primera estrategia (Donini et al, 2003), se observó que después de la saturación de los sitios de reconocimiento en la toxina Cn2, por el BCF2 o la Triple mutante (Figuras 8 y 9), no hay un incremento significativo en

las RU (anticuerpos compitiendo por el mismo epítipo). La inyección del segundo anticuerpo Triple mutante o BCF2, no produjo un cambio en la señal, esto indica que hay una competencia por el mismo epítipo. Esto no es sorprendente ya que la Triple mutante solo presenta 3 mutaciones, de las cuales dos caen en los CDRs (regiones que están en contacto directo con el antígeno). Son muy pocos los cambios que presenta la Triple mutante para modificar el sitio original de unión a la toxina.

El segundo método (Amersdorfer et al, 2002), confirmó las observaciones del primero. Cuando los anticuerpos ocupan epítopes diferentes, la señal que se obtiene es la suma de las señales obtenidas en los sensogramas de reconocimiento individual (Figura 10). En este caso la señal obtenida de la mezcla de Triple mutante y BCF2 es un promedio de los dos, que indica que la variante triple mutante no reconoce un epítipo diferente en la Cn2.

Efecto posible de las mutaciones en la interacción anticuerpo-toxina.

Se recurrió al modelo previamente generado (Selisko et al, 1999) para explicar el efecto de las mutaciones en el scFv de BCF2 (Figura 4, Artículo 1). El cambio en la cadena ligera de Q27R puede favorecer la cercanía a los aminoácidos E93 de la cadena ligera del anticuerpo y el aminoácido E28 de la toxina Cn2. La R27 podría estar involucrada en la formación de nuevos puentes salinos con al menos uno de ellos, relajando de esta manera la tensión generada por la repulsión natural entre dos residuos de carga negativa. Esto podría llevar a un incremento directo en la afinidad de la interacción. Por otro parte, la posición 35 de la cadena pesada, aunque no está directamente localizada en la interfase V_H-V_L , es un aminoácido que se encuentra en contacto directo con la capa hidrofóbica de los aminoácidos que conforman esta interfase. Nosotros postulamos que el reemplazamiento de un residuo hidrofílico en esta posición (Asn) por un hidrofóbico (Ile), puede llevar a un cambio en la geometría y/o la estabilidad de la interacción intermolecular V_H-V_L , favoreciendo la formación del scFv dímérico y consecuentemente afectando de manera positiva las propiedades de reconocimiento de todo el fragmento de anticuerpo.

Nosotros no pudimos llegar a una explicación plausible, sobre el efecto de la mutación V51A de la VL sobre la interacción BCF2-Cn2 a la luz del modelo estructural. Parece no haber un cambio significativo en la estructura debido a la substitución del aminoácido Val por su análogo Ala. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad que esta mutación este causando un cambio local que,

aunque no se refleje a nivel del modelo, pueda contribuir junto a la mutación Q27R a incrementar la afinidad y/o estabilidad de la mutante G5.

11. CONCLUSIONES.

1.- En esta tesis se construyó el scFv del anticuerpo monoclonal BCF2, el cual mantiene la capacidad de reconocer a la toxina Cn2 del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann, pero es incapaz de neutralizar a la toxina Cn2.

2.- Dos mutantes del scFv de BCF2 (G5 y B7) fueron generadas por PCR mutagénica y aisladas por medio del despliegue en fagos. Estas variantes presentaron mejor afinidad y estabilidad, pero tampoco recuperaron la capacidad de neutralización.

3.- La combinación de las mutaciones, presentes en G5 y B7 dieron como resultado una variante denominada triple mutante, la cual fué capaz de neutralizar a la toxina Cn2 gracias al efecto sinérgico de los cambios. Esta variante logró mejorar 15 veces la afinidad con respecto al scFv de BCF2 y reconocer a la toxina en presencia de 2 M de Gdn-HCl.

4.- Los procedimientos descritos, pueden ser aplicados en la modificación de las propiedades como la afinidad y la estabilidad, propiedades muy importantes para la generación de antivenenos más eficientes y seguros.

12. PERSPECTIVAS.

1.- Cristalizar el anticuerpo de la triple mutante unido a la toxina Cn2 y establecer la participación de las mutaciones en el reconocimiento del complejo.

2.- Evolucionar los anticuerpos G5, B7 y Triple mutante, para obtener una variante mejor que la obtenida en este trabajo, que tenga una mejor capacidad de neutralización a la toxina Cn2, lo cual se vería reflejado en la neutralización con relaciones equimolares de toxina:anticuerpo.

3.- Se puede explotar el potencial de los bancos para el aislamiento de scFvs contra otras toxinas de alacrán.

aunque no se refleje a nivel del modelo, pueda contribuir junto a la mutación Q27R a incrementar la afinidad y/o estabilidad de la mutante G5.

11. CONCLUSIONES.

1.- En esta tesis se construyó el scFv del anticuerpo monoclonal BCF2, el cual mantiene la capacidad de reconocer a la toxina Cn2 del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* Hoffmann, pero es incapaz de neutralizar a la toxina Cn2.

2.- Dos mutantes del scFv de BCF2 (G5 y B7) fueron generadas por PCR mutagénica y aisladas por medio del despliegue en fagos. Estas variantes presentaron mejor afinidad y estabilidad, pero tampoco recuperaron la capacidad de neutralización.

3.- La combinación de las mutaciones, presentes en G5 y B7 dieron como resultado una variante denominada triple mutante, la cual fué capaz de neutralizar a la toxina Cn2 gracias al efecto sinérgico de los cambios. Esta variante logró mejorar 15 veces la afinidad con respecto al scFv de BCF2 y reconocer a la toxina en presencia de 2 M de Gdn-HCl.

4.- Los procedimientos descritos, pueden ser aplicados en la modificación de las propiedades como la afinidad y la estabilidad, propiedades muy importantes para la generación de antivenenos más eficientes y seguros.

12. PERSPECTIVAS.

1.- Cristalizar el anticuerpo de la triple mutante unido a la toxina Cn2 y establecer la participación de las mutaciones en el reconocimiento del complejo.

2.- Evolucionar los anticuerpos G5, B7 y Triple mutante, para obtener una variante mejor que la obtenida en este trabajo, que tenga una mejor capacidad de neutralización a la toxina Cn2, lo cual se vería reflejado en la neutralización con relaciones equimolares de toxina:anticuerpo.

3.- Se puede explotar el potencial de los bancos para el aislamiento de scFvs contra otras toxinas de alacrán.

13. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adair JR. (1992). Engineering antibodies for therapy. *Immunol.*130:5-40.
- 2.- Amersdorfer P, Wong C, Smith T, Chen S, Deshpande S, Sheridan R, Marks JD. (2002). Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine.* 20:1640-1648.
- 3.- An TQ, Zhou YJ, Qiu HJ, Tong GZ, Wang YF, Liu JX, Yang JY. (2005). Identification of a Novel B Cell Epitope on the Nucleocapsid Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Phage Display. *Virus Genes.* 31:81-87.
- 4.- Arndt MA, Krauss J, Schwarzenbacher R, Vu BK, Greene S, Rybak SM. (2003). Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer.* 107:822-829.
- 5.- Arndt KM, Muller KM, Pluckthun A. (1998). Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry.* 37:12918-12926.
- 6.- Azzazy, M. E. H. & Highsmith, W. E. (2002). Phage display technology: clinical application and recent innovations. *Clin. Biochem.* 35, 425-445.
- 7.- Barbas, C. F., Hu, D., Dunlop, N., Sawyer, L., Cababa, D., Hendry, R.M., Nava, P.L & Burton, D.R. (1994). In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 91, 3809-3813.
- 8.- Barbas, C.F, III, Kang, A. S., Lerner, R.A., Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 88, 7978-7982.
- 9.- Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* 19, 1-33.
- 10.- Blaise L, Wehnert A, Steukers MP, van den Beucken T, Hoogenboom HR, Hufton SE. (2004). Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene.* 342:211-218.
- 11.- Boder, E. T., Midelfort, K. S. & Witttrup, D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 97, 10701-10705.
- 12.- Brockmann EC, Cooper M, Stromsten N, Vehniainen M, Saviranta P. Selecting for antibody scFv fragments with improved stability using phage display with denaturation under reducing conditions. (2005). *J Immunol Methods.* 296:159-70.
- 13.- Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Applic.* 2, 28-33.
- 14.- Calderón-Aranda, E. S., Selisko, B., York, E. J., Gurrola, G. B., Stewart, J. M. & Possani, L. D. (1999). Mapping of an epitope recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides. *Eur. J. Biochem.* 264, 746-755.
- 15.- Cereghino GP, Cregg JM. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 422-427.
- 16.- Chen G, Hayhurst A, Thomas JG, Harvey BR, Iverson BL, Georgiou G. (2001). Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS). *Nat Biotechnol.* 19, 537-42.
- 17.- Cherry JR, Fidantsef AL. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 14:438-443.
- 18.- Clot-Faybesse, O., Juin, M., Rochat, H. & Devaux, Ch. (1999). Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* Hector scorpion neurotoxin I: Characterization and use for venom neutralization. *FEBS Letters,* 458, 313-318.
- 19.- Cramer, A., Cwirla, S & Stemmer, W. P. (1996). Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nature. Med.* 2, 100-102.
- 20.- Daugherty, P. S., Chen, G., Iverson, B. L. & Georgiou, G. (2000). Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 97, 2029-2034.
- 21.- de Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. & Quattrocchio, F. (1999). Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnol.* 17, 397-399.
- 22.- Dent MA, Possani LD, Ramirez GA, Fletcher PL Jr. (1980). Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicol.*18:343-350.
- 23.- Devaux, Ch., Moreau, E., Goyffon, M., Rochat, H. & Billiald, P. (2001). Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin AaHI from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.* 268, 694-702.
- 24.- Donini M, Morea V, Desiderio A, Pashkoulov D, Villani ME, Tramontano A, Benvenuto E. (2003). Engineering stable cytoplasmic intrabodies with designed specificity. *J Mol Biol.* 330, 323-32.
- 25.- Ewert S, Honegger A, Pluckthun A. (2004). Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods.* 34, 184-199.

- 26.- Fujii R, Nakagawa Y, Hiratake J, Sogabe A, Sakata K. (2005). Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa* lipase for improved amide-hydrolyzing activity. *Protein Eng Des Sel.* 18: 93-101.
- 27.- Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, Blohm D, Tomlinson I, Winter G, Karsten U. (2002). Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol.* 315:1087-1097.
- 28.- Graff, C. P., Chester, K., Begent, R & Wittrup, K. D. (2004). Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37°C. *Protein Engineering.* 17, 293-304.
- 29.- Gramatikoff K, Georgiev O, Schaffner W. (1994). Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 22, 5761-2.
- 30.- Griffiths AD, Duncan AR. (1998). Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol.* 9:102-108.
- 31.- Gu Y, Zhang J, Wang YB, Li SW, Yang HJ, Luo WX, Xia NS. (2003). Selection of a peptide mimic the neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 19:680-685.
- 32.- Gulick, A. M & Fah1, W. E. (1995). Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxication enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92, 8140-8144.
- 33.- Hawkins R. E, Russell S. J & Winter G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226, 889-96.
- 34.- Heim, R & Tsien, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6, 178-182.
- 35.- Jensen, K. B., Larsen, M., Pedersen, J. S., Christensen, P. A., Alvarez-Vanilla, L., Goletz, S., Clark, B. F. & Kristensen, P. (2002). Functional improvement of antibody fragments using a novel phage coat protein III fusion system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 566-573.
- 36.- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J & Pluckthun, A. (2001). Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98, 75-80.
- 37.- Jun, S., Honegger, A. & Pluckthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* 294, 163-180.
- 38.- Jurgens, C., Strom ,A., Wegener ,D ., Hettwer ,S., Wilmanns ,M & Sterner ,R. (2000). Directed evolution of a (b a)₆-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97, 9925-9930.
- 39.- Kolkman, J. A & Stemmer, W. P. (2001). Directed evolution of proteins by exon-shuffling. *Nature Biotechnology.* 19, 423-428.
- 40.- Kotz, J. D., Bond, C. J. & Cochran, A. G. (2004). Phage-display as a tool for quantifying protein stability determinants. *Eur. J. Biochem.* 271, 1623-1629.
- 41.- Kotz JD, Bond CJ, Cochran AG. (2004). Phage-display as a tool for quantifying protein stability determinants. *Eur J Biochem.* 271, 1623-1629.
- 42.- Leung, D. W., Chen, E. & Goeddel, D.V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique. J. meth. cell mol. biol.* 1, 11-15.
- 43.- Licea, A. F., Becerril, B. & Possani, L. D. (1996). Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are able of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 34, 843-847.
- 44.- Lipovsek D, Pluckthun A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods.* 290:51-67.
- 45.- Lunder M, Bratkovic T, Kreft S, Strukelj B. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. (2005). *J Lipid Res.* 46:1512-1516.
- 46.- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581-597.
- 47.- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552-554.
- 48.- Mousli, M., Devaux, Chi., Rochat, H., Goyffon, M. & Billiald, P. (1999). A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *FEBS Letters*, 442, 183-188.
- 49.- Nishida Y, Torigoe K, Aizawa Y, Okura T, Mori T, Yamauchi H, Tanimoto T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. (1998). Cloning and expression of a single-chain Fv fragment specific for the human interleukin 18 receptor. *Hybridoma.* 17:577-580.
- 50.- O'connor KH, Konigs C, Rowley MJ, Irving JA, Wijeyewickrema LC, Pustowka A, Dietrich U, Mackay IR. (2005). Requirement of multiple phage displayed peptide libraries for optimal mapping of a conformational antibody epitope on CCR5. *J Immunol Methods.* 299:21-35.

- 51.- Pini, A. & Bracci, L. (2000). Phage Display of Antibody Fragments. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 1, 155-169.
- 52.- Pintar, A., Possani, L. D. & Delepierre, M. (1999). Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a b-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J. Mol. Biol.* 287, 359-367.
- 53.- Pluckthun A. (1992). Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding. *Immunol.* 130:151-188.
- 54.- Poon KM, Tam FC, Chui YL, Lim PL. (2002). Single-chain Fv fragment lacks carrier specificity of the native antibody. *Mol Immunol.* 39:19-24.
- 55.- Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem.* 264, 287-300.
- 56.- Rothlisberger D, Honegger A, Pluckthun A. (2005). Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol.* 347., 773-89.
- 57.- Saab-Rincon, G., Juarez, V.R., Osuna, J., Sanchez, F., Soberon, X. 2001. Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution *Protein Eng* 14 149-155.
- 58.- Sblattero D, Bradbury A. (2000) Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol.* 18:75-80.
- 59.- Selisko, B., Licea, A. F., Becerril, B., Zamudio, F. & Possani, L. D. (1999). Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: Primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins*, 37, 130-143.
- 60.- Selisko, B., Cosío, G., García, C., Becerril, B., Possani, L. D. & Horjales, E. (2004). Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 43, 43-51.
- 61.- Sevcik C, D'Suze G, Diaz P, Salazar V, Hidalgo C, Azpurua H, Bracho N. (2004). Modelling Tityus scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F(ab')₂ extrusion mechanism from blood to tissues. *Toxicon.* 44:731-741.
- 62.- Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R & Haseloff, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6, 1653-1663.
- 63.- Smith GP. (1991). Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr Opin Biotechnol.* 2:668-673.
- 64.- Strausberg SL, Ruan B, Fisher KE, Alexander PA, Bryan PN. (2005). Directed coevolution of stability and catalytic activity in calcium-free subtilisin. *Biochemistry.* 44:3272-3279.
- 65.- Tay Z.J., Díaz, S J., Vega, Scastillo, A.L., Ruiz, S., D y Calderón, R.L. (2004). Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México. *Rev Fac Med UNAM.* 47: 6-12.
- 66.- Urban JH, Schneider RM, Compte M, Finger C, Cichutek K, Alvarez-Vallina L, Buchholz CJ. (2005). Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries. *Nucleic Acids Res.* 24;33(4):e35.
- 67.- van den Beucken T, Pieters H, Steukers M, van der Vaart M, Ladner RC, Hoogenboom HR, Hufton SE. (2003). Affinity maturation of Fab antibody fragments by fluorescent-activated cell sorting of yeast-displayed libraries. : *FEBS Lett.* 546, 288-94.
- 68.- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* 14(3):309-314.
- 69.- White SJ, Simmonds RE, Lane DA, Baker AH. (2005). Efficient isolation of peptide ligands for the endothelial cell protein C receptor (EPCR) using candidate receptor phage display biopanning. *Peptides.* 26:1264-1269.
- 70.- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol.* 12:433-455.
- 71.- Winter G, Milstein C. (1991). Man-made antibodies. *Nature.* 24, 293-299.
- 72.- Wirsching F, Keller M, Hildmann C, Riester D, Schwienhorst (2003). A. Directed evolution towards protease-resistant hirudin variants. *Mol Genet Metab.* 80:451-462.
- 73.- Worn, A. & Pluckthun, A. (1999). Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: Identification, classification and improvement by protein engineering. *Biochemistry*, 38, 8739-8750.
- 74.- Worn, A. & Pluckthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* 305, 989-1010.
- 75.- Wright A, Shin SU, Morrison SL. (1992). Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Crit Rev Immunol.* 12, 125-168.
- 76.- Yanez J, Arguello M, Osuna J, Soberon X, Gaytan P. (2004) Combinatorial codon-based amino acid substitutions. *Nucleic Acids Res.* 32(20):158.

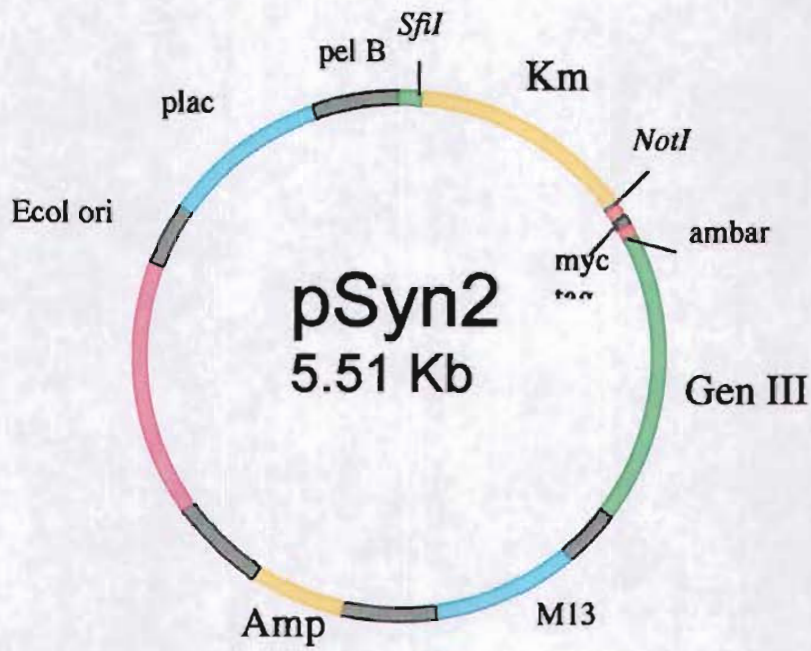
- 77.- Zaccolo, M & Gherardi, E. (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: A study on TEM-1 β -lactamase. *J. Mol. Biol.* 285, 775-783.
- 78.- Zaccolo M, Williams DM, Brown DM, Gherardi E. (1996). An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J Mol Biol.* 255, 589-603.
- 79.- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, M. B., Gurrola-Briones, G., Herion, P. & Possani, L. D. (1992). Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204, 281-292.
- 80.- Zhang, J. H., Dawes, G & Stemmer, W. P. (1997). Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA Shuffling and Screening. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94, 4504-4509.
- 81.- Zhao H, Arnold FH. (1997). Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids.* 15, 1307-8.
- 82.- Zhu S, Huys I, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J. (2004 a). Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *Proteins.* 54:361-70.
- 83.- Zhu S, Bosmans F, Tytgat J. (2004 b). Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins. *J Mol Evol.* 58:145-153.

14. ANEXOS

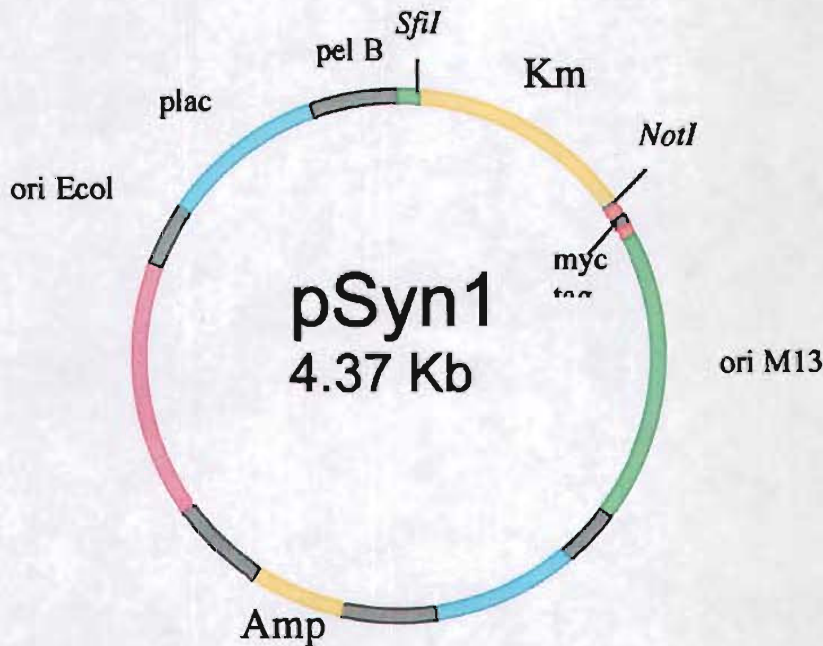
Anexo 1. Fotografía del alacrán *Centruroides noxius*.



Anexo 2. Mapa del plásmido pSyn2.



Anexo 3. Mapa del plásmido pSyn1.

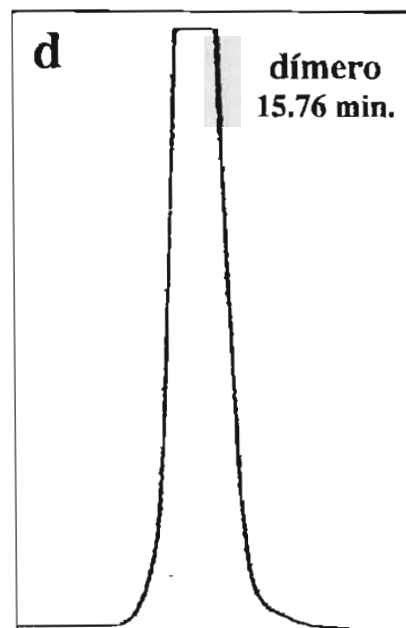
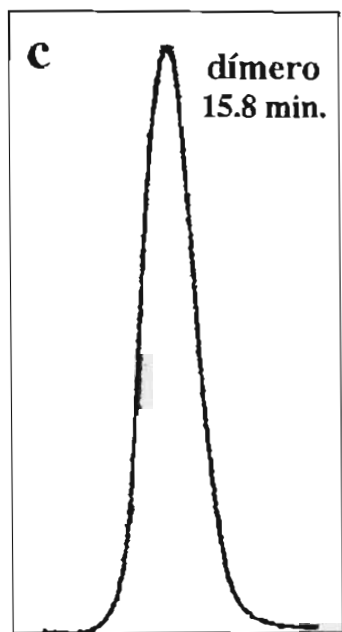
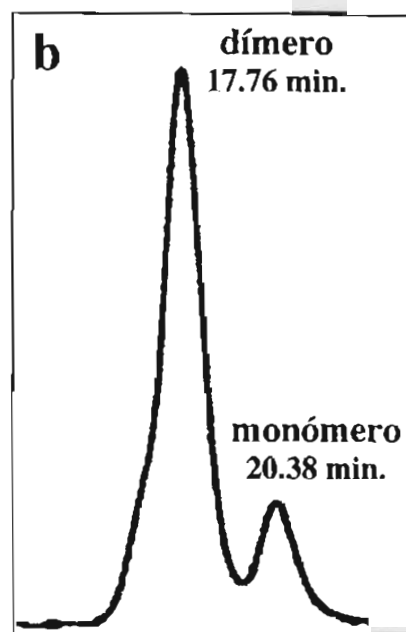
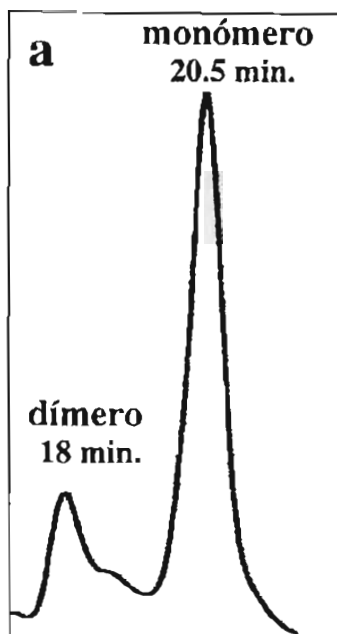


Anexo 4. Cromatogramas de exclusión molecular de los scFvs.

Durante el proceso de purificación de los anticuerpos a través de la cromatografía de exclusión molecular, se observó la presencia de formas monoméricas y diméricas de los anticuerpos recuperados. Dicho proceso de purificación está descrito en materiales y métodos del artículo 1.

El cromatograma del scFv de BCF2, mostró la presencia de dos picos en el perfil de elusión: el primero corresponde al dímero y constituye aproximadamente el 30% de la proteína total; el segundo pertenece al monómero y forma un 70% (Anexo 4).

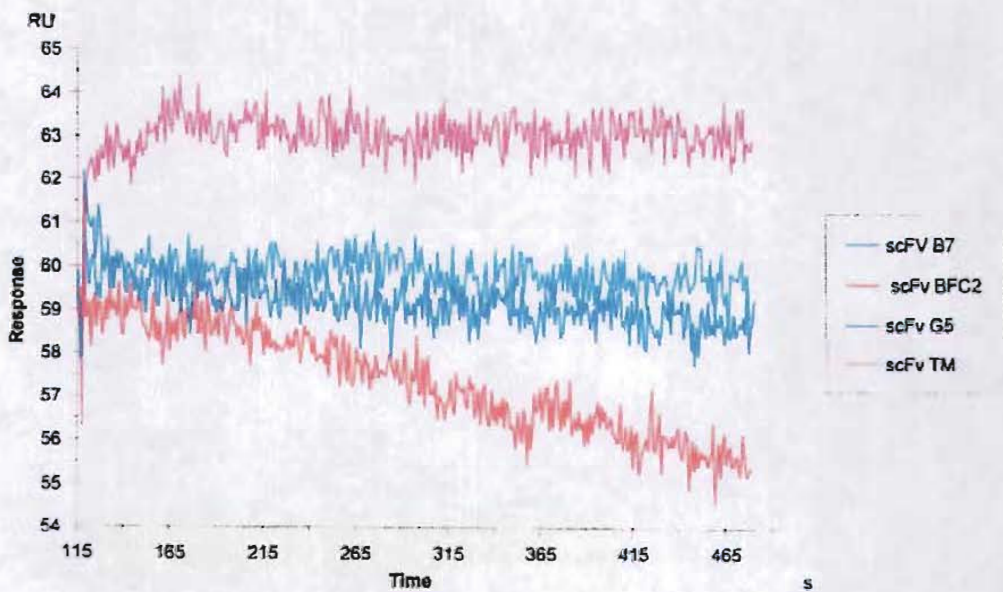
La mutante G5, presenta dos picos en el perfil de elusión, el primero pertenece al dímero y forma un 70% de la proteína, mientras que el segundo pertenece al monómero y forma el 30% (Anexo 4). La mutante B7, sorprendentemente forma un sólo pico, el cual pertenece a la proteína dimérica y forma el 100% de la proteína total; finalmente la triple mutante, presenta también un único pico, el cual pertenece a una proteína dimérica, que representa el 100% de la proteína total (Anexo 4).



Anexo 4. Cromatogramas de los picos de elución, correspondientes a los anticuerpos: a) scFv de BCF2, b) G5, c) B7 y d) Triple mutante.

Anexo 5. Comparación de las disociaciones evaluadas en BIACORE.

La capacidad de disociación del scFv de BCF2 y sus mutantes, fueron evaluadas en el BIACORE. Las graficas de los sensogramas muestran que la triple mutante, se disocia menos que el resto de las variantes G5, B7 y el scFv de BCF2 (Anexo 5). El scFv de BCF2, es el anticuerpo que se disocia más rápido que el resto de las variantes probadas.



Anexo 5. Es una ampliación de la cinética de la disociación de los sensogramas formados en el BIACORE de los anticuerpos (scFv de BCF2, G5, B7 y Triple mutante).

A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display

An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom

Lidia Riaño-Umbarila, Victor Rivelino Juárez-González, Timoteo Olamendi-Portugal, Mauricio Ortíz-León, Lourival Domingos Possani and Baltazar Becerril

Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Cuernavaca, Mexico

Keywords

affinity maturation; directed evolution; human scFv library; phage display; scorpion toxin

Correspondence

B. Becerril, Av. Universidad No. 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62210 Mexico
Tel: +52 7773 291669
E-mail: baltazar@ibt.unam.mx

Note

The sequences reported have been deposited in the GenBank database under accession nos. AY781338, AY781339, AY781340, AY781341 and AY781342; corresponding to scFvs: 3F, 6F, 610 A, 6009F and C1.

(Received 9 March 2005, revised 21 March 2005, accepted 28 March 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04687.x

This study describes the construction of a library of single-chain antibody fragments (scFvs) from a single human donor by individual amplification of all heavy and light variable domains (1.1×10^8 recombinants). The library was panned using the phage display technique, which allowed selection of specific scFvs (3F and C1) capable of recognizing Cn2, the major toxic component of *Centruroides noxius* scorpion venom. The scFv 3F was matured *in vitro* by three cycles of directed evolution. The use of stringent conditions in the third cycle allowed the selection of several improved clones. The best scFv obtained (6009F) was improved in terms of its affinity by 446-fold, from 183 nM (3F) to 410 pM. This scFv 6009F was able to neutralize 2 LD₅₀ of Cn2 toxin when a 1 : 10 molar ratio of toxin-to-antibody fragment was used. It was also able to neutralize 2 LD₅₀ of the whole venom. These results pave the way for the future generation of recombinant human antivenoms.

In recent years, the demand for antibodies for therapeutic purposes has increased [1]. To cope with this demand, some technologies have been adapted to generate and improve these antibodies [2,3]. Two of these methods are phage display [4,5] and directed evolution [6,7]. These technologies have allowed the generation and improvement of different antibodies, which now reach affinities similar to those of a secondary immunological response [3]. Depending on the purpose for which the antibody fragments are intended, several expression formats have been developed [8]. The

tendency to use smaller molecule formats [single-chain antibody fragment (scFv); 25 kDa], is due to their increased biodistribution, diminished immunogenic characteristics and clearance properties [9]. Display of antibody fragment libraries on the surface of filamentous phages has replaced hybridoma technology for the selection of human antibodies through the creation of large repertoires *in vitro* [10]. This process begins with the cloning and expression of cDNAs encoding the variable regions of the H and L chains of antibodies (V_H and V_L), allowing the *in vitro* generation of

Abbreviations

CDR, complementarity determining region; Cn2, toxin from *Centruroides noxius* scorpion; scFv, single-chain antibody fragment; TEA, triethylamine; V_H, heavy chain; V_L, light chain.

large antibody repertoires. From these libraries, specific antibodies can be selected by linking phenotype (binding affinity) to genotype, thereby allowing simultaneous recovery of the gene encoding the selected antibody. Selected antibody fragments that do not have the required affinity can be subjected to cycles of mutation and further selection (directed evolution) to enhance affinity [7]. Different selection strategies have been used to select variants with improvements in various properties, for example stability, affinity and expression level [6,7]. There has been little report of the use of these libraries to isolate antibody fragments against toxic components of animal venoms [11]. For therapeutic purposes, human antibody libraries would be the best source, because of their homologous character and their reduced allergenic or secondary reactions [12].

Here, we report the construction of a human nonimmune library in which all families of variable domains (H and L) were amplified independently and combined with each other, resulting in a repertoire of 1.1×10^8 different members. From this library, two specific clones (3F and C1) that recognize toxin Cn2 from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann were isolated and functionally characterized. Cn2 is one of the most abundant and toxic components of *C. noxius* venom (6.8% of total venom; $LD_{50} = 0.25 \mu\text{g}$ per 20 g of mouse weight) [13]. Clone 3F was matured by three cycles of directed evolution. The use of a set of stringent conditions in the third cycle allowed the selection of several improved clones. The best scFv obtained (6009F) had an affinity that was improved by 446-fold (from 183 nM to 410 pM). This scFv 6009F was able to neutralize 2 LD_{50} of Cn2 toxin when a toxin/antibody fragment molar ratio of 1 : 10, was used. It was also able to neutralize 2 LD_{50} of the whole venom. This is the first recombinant human antibody fragment that neutralizes *C. noxius* venom. To the best of our knowledge, this is the first report of the generation of a human recombinant antibody fragment capable of neutralizing the toxic effects of the whole venom from a deadly animal.

Results

Human nonimmune library construction

The scFv library was generated by RT-PCR from total RNA purified from B lymphocytes of human peripheral blood. To avoid, as far as possible, a bias in antibody variable chain family representation, each V family of variable regions (V_H or V_L), was amplified by independent PCR. In a second PCR step, the sequence of the linker peptide was added to each individual V family. A PCR-overlapping process was per-

formed in order to join both V domains (H and L). Every V_H family was overlapped to every V_K or V_λ family (a total of 72 combinations). The DNA segments encoding the assembled products were fused to the *pIII* gene of the pSyn2 phagemid. The scFv library comprised 1.2×10^8 members. Twenty independent colonies were analyzed by PCR. Eighteen were of the right size and had different restriction patterns when digested with *Bst*NI (data not shown). Variability in the 18 different scFvs was confirmed by DNA sequence, which resulted in a library of 1.1×10^8 variants. We found different combinations of variable domains, which included the majority of V families.

Isolation and characterization of specific scFvs against Cn2 toxin

After four rounds of biopanning, the recognition capacity of scFvs was evaluated by means of phage-ELISA. Positive clones (15 of 88) were sequenced and analyzed individually. Two unique anti-Cn2 scFvs were identified and named scFv 3F and scFv C1 (Fig. 1). The

		CDR H1	
C1	1	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFSFGSYGMHWVROA 40
3F	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAGSGPTFDNYAMHWIRQV 40
		CDR H2	
C1	41	PGKGLEWVAVLSYDGSNRY	YADSVKGRPTISRDNKNTLY 80
3F	41	PGEGLWVSGLSRSGDITG	YADSVKGRPTISRDNNAKLS 80
		CDR H3	
C1	81	LQMNSLRAEDTAVVYCAFD	ARDCLMCADWYFDLWGRGTLV 120
3F	81	LQMNSLRAEDTAVVYCAR	-G-G---VGS-FDTWGGQTMV 113
		Linker	
C1	121	TVSSGGGGGGGGGGSNF	MLTQ-PHSASGTPQGRVTI 159
3F	114	TVSSGGGGGGGGGGSEI	VLTSQSPATLSVSPGERATL 153
		CDR L1	CDR L2
C1	160	SCSGSSNIGSNTVNWYRHL	PGSPELLIGSHNQRPSGVP 199
3F	154	SCRASQS--VREYLAWYQ	KPGQAPRLLISDASNRATGIP 191
		CDR L3	
C1	200	DRFSASKSDTSASLAI	SGLQSEADYCAAWDDSLIGYV 239
3F	192	ARFTGSGSGTDFTLT	ISSLEPEDFAIYQQY--RYSPT 229
C1	240	FGTGTKLTVLGAAAEQKLI	SEEDLNGAAHHHHH 273
3F	230	FGQGTKVEIKRAAAEQKLI	SEEDLNGAAHHHHH 263

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of scFvs selected from a human repertoire. These sequences include the C-myc C-terminal tag followed by a hexameric His tag. Complementarity determining regions (CDR) of V_H and V_L are delimited by a rectangle. The closest germ line, diversity and joining segments for the V_H domain of clone C1 were IGHV3-30*18, IGHD2-21*01 and IGHJ2*01, respectively. For the V_L domain, the germ line and the joining segments corresponded to IGV1-44*01 and IGLJ1*01. The closest germ line, diversity and joining segments for the V_H domain of clone 3F were IGHV3-9*01; IGHD2-8*02; IGHJ3*02. For the V_L , the germ line and the joining segments corresponded to IGVK3-11*01; IGKJ1*01.

Table 2. Characterization of scFvs selected by directed evolution and phage display. Results of sequence analyses allowing identification of the changes in amino acid residues that occurred during each cycle of evolution. For each selected variant, mutations with respect to clone 3F are indicated. The last five columns show the binding kinetic parameters of the scFvs to immobilized Cn2 determined by surface plasmon resonance (BIAcore). SE, standard error.

Evolution cycle	scFv selected	Change	Position	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	SE (K_{on})	K_{off} (s^{-1})	SE (K_{off})	K_D (M)
	3F			7.00×10^4	1.7×10^3	1.28×10^{-2}	1.2×10^{-4}	1.83×10^{-7}
1	6F	Ser54Gly	CDR2V _H	4.93×10^5	3.9×10^3	8.25×10^{-3}	9.0×10^{-5}	1.68×10^{-8}
2	610 A	Ser54Gly	CDR2V _H	6.35×10^5	8.3×10^3	6.63×10^{-4}	1.3×10^{-5}	1.04×10^{-8}
		Val101Phe	CDR3V _H					
3	6009F	Ser54Gly	CDR2V _H	7.4×10^5	3.7×10^3	3.00×10^{-4}	1.7×10^{-6}	4.1×10^{-10}
		Val101Phe	CDR3V _H					
		Asp74Asn	FW3V _H					
		Thr152Ile	FW1V _C					
		Tyr164Phe	CDR1V _C					
		Ser197Gly	FW3V _C					

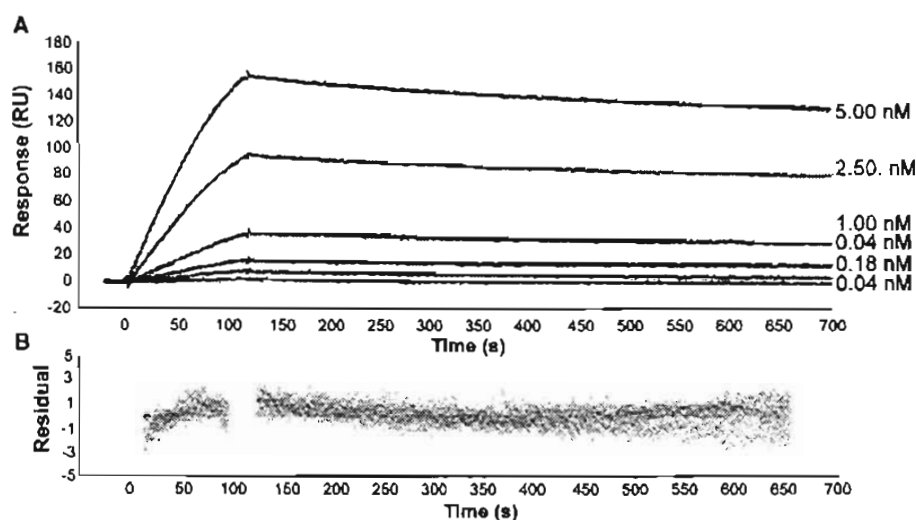


Fig. 3. Affinity determination of scFv 6009F. (A) BIAcore binding kinetics to Cn2 toxin. The Langmuir (1 : 1) binding model was used. (B) The variation between the theoretical and experimental data (residual values) shows the reliability of the fitting.

The total yield was typically $700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of culture. To determine the neutralization capacity and binding kinetics, only the monomeric fraction was used. The BIAcore analysis (Fig. 3; Table 2) showed a K_D value of 410 pM , the best affinity value for the evolved variants.

Neutralization assays

The capacity of the soluble protein purified from clones 6F, 610A and 6009F to neutralize toxin Cn2 was evaluated in CD1 mice. Clone 6009F was the only one that had the capacity to neutralize the toxin. The protection showed by this antibody fragment was 100% (Table 3). No symptomatology was detected up to 24 h of observation, using 1 or 2 LD_{50} of toxin

Table 3. Neutralization assays. Results of mice groups challenged with Cn2 toxin or whole venom by intraperitoneal injection alone or in the presence of the indicated molar ratios of toxin/antibody. LD_{50} : Cn2 = $0.250 \mu\text{g}$ per 20 g of mouse weight and whole venom = $2.5 \mu\text{g}$ per 20 g of mouse weight.

Sample	LD_{50}	Molar ratio Cn2 : 6009F	Survival ratio (alive/total)
6009F			10/10
Cn2	1		6/10
Cn2	1	1 : 10	20/20
Cn2	2		6/18
Cn2	2	1 : 10	18/18
Whole venom	2		0/10
Whole venom	2	1 : 14 ^a	10/10

^a Estimated assuming that Cn2 constitutes 6.8% of whole venom.

and a 1 : 10 molar ratio of toxin-to-antibody fragment. Two LD₅₀ of whole venom were also tested using the same quantity of antibody as the one used to neutralize 2 LD₅₀ of toxin. All the mice injected with the antibody/toxin mix survived. Slight symptoms of poisoning were observed up to 6 h after injection of the mix. One hour later the symptoms disappeared.

Discussion

Human scFv nonimmune library

The need to generate safer and more efficient antibodies to be used in human therapy has resulted in the development of recombinant antibodies from different sources. Ideally, the source itself should be human. In this study we constructed a scFv nonimmune library of 1.1×10^8 variants. Evaluation of the library in terms of variability revealed that it contained different combinations of variable domains.

From this library two anti-Cn2 clones (3F and C1) were selected. Although they were specific for Cn2 toxin (Fig. 2), they were not able to neutralize it. Analysis of the affinity constants showed values in the range 10^{-7} M (Table 1), which are typical affinity values for the primary immune response [15,16]. Clones 3F and C1 showed fast dissociation despite having good association, which suggests that the antibody fragments do not remain bound to the toxin for long enough to be neutralizing. It has been reported that the dimeric form of a scFv gives the molecule properties that are advantageous in therapeutic applications [17]. We constructed the dimeric form of our scFvs by shortening the linker from 15 to 7 amino acid residues. Neither of the di-bodies, 3F or C1, was able to neutralize the toxin in the protection assay. They did not have the required affinity and/or functional stability to be neutralizing as shown for most examples of neutralizing antibodies, which have affinities in the nanomolar range and lower [18–20]. This result was expected, because the library is nonimmune, is of medium size and it is now known that higher affinity binders can be selected from bigger libraries [21–23]. The affinity of the toxin Cn2 for the sodium channels present in some cell preparations has been shown to be in the nM range [24,25]. These results suggest that an antibody with an affinity in this range at least is needed to neutralize the toxin. Taking this into consideration we matured the scFv 3F.

Affinity maturation

Three cycles of evolution were performed to obtain variant scFv 6009F to neutralize Cn2 toxin. The first

cycle allowed selection of variant 6F (Table 2), with a change at CDR2 of the heavy chain. This mutant showed association and dissociation constants that were improved ≈ 7 - and 1.5-fold, respectively, resulting in a change of one order of magnitude in the K_D value (from 183 to 16.8 nM; Table 2). These results show that scFv 6F binds more efficiently to the toxin, but it still detaches rapidly, suggesting that Gly at position 54 might play an important role in the interaction of the antibody with the toxin Cn2. Variant 6F was not able to neutralize the toxin despite having a better affinity constant than scFv 3F. The next cycle of evolution allowed selection of clone 610A. The change at CDR3 of the heavy chain improved both the association constant, and more importantly the dissociation constant. This result suggests that residue 101 in the CDR3 (Val101Phe) of the heavy chain might also be important for binding to the toxin. The change of Val to Phe may result in a better interaction in terms of an increased contact area. Changes at CDRs 2 and 3 in clone 610A had a synergistic effect on the affinity constant leading to a 176-fold change [183 nM (3F) to 1.04 nM (610A)] (Table 2). These improvements in affinity still did not confer a neutralizing capacity on this clone. For the third cycle, we used two alternative selection strategies: the standard and the stringent procedure to select variants improved in terms of their affinity and functional stability (see Experimental procedures). Drastic conditions were crucial for the selection of a variety of improved clones. Different strategies with the same purposes have been reported [26–29]. The standard procedure of phage selection gave a lower number of positive variants (including the first and second cycle) compared with the more stringent procedure. The number of nucleotide changes in the selected clones from the two procedures was different. Interestingly, clones selected from the standard procedure had fewer changes (usually one), whereas using the stringent strategy, the selected clones showed 2–6 changes. Clone 6009F was selected and showed four amino acid changes with respect to clone 610A (Table 2). Analysis of affinity measurements (Table 2 and Fig. 3), revealed that clone 6009F had a K_D of 410 pM, which is comparable with the affinities of other neutralizing antibodies of scorpion toxins [17,20,30,31]. The kinetic parameters showed that the additional changes present in clone 6009F improved the dissociation constant by approximately twofold compared with clone 610A, resulting in an affinity constant, as already mentioned, in the picomolar range, leading to a 446-fold change in K_D with respect to scFv 3F.

The evolution cycles of scFv 3F allowed the accumulation of changes in the sequence, which improved the affinity significantly. It has been suggested that changes at CDRs are the most important for improving the affinity of the antigen [32,33]. However, it has recently been shown that changes at frameworks improve not only affinity [34], but also expression level [7]. A similar phenomenon was seen during maturation of clone 3F, because scFv 6009F accumulated three changes at CDRs and three at the frameworks. We surmised that the changes at the frameworks contributed to the generation of a molecule with an improved affinity and an improved functional stability.

Neutralization capacity of variant 6009F

For the neutralization assays, two different doses of toxin Cn2 (1 and 2 LD₅₀) were used, whereas for the whole venom only 2 LD₅₀ was assayed. When 1 LD₅₀ of toxin and a 10 M excess of scFv 6009F were injected, all the mice survived compared with the controls (Table 3). Control animals showed typical symptoms of poisoning 30 min post injection. The first deadly effects of the toxin occurred 1.5 h after the injection. It is noteworthy that mice injected with the antibody/toxin mix did not present any symptoms associated with envenoming [35]. The next step consisted in using 2 LD₅₀ of toxin. The mice did not show any signs of poisoning, demonstrating the effectiveness of our evolved human antibody (100% protection). When the mice were injected with 2 LD₅₀ of toxin, the symptoms appeared 15 min after injection and the deadly effects started only 1 h after injection. In the case of whole venom, mice were protected but they presented some symptoms, such as respiratory distress, but they recovered 7 h later. This observation can be explained because the whole venom contains at least 70 different toxins (unpublished results), the majority affecting sodium channels. Despite Cn2 being the major toxic peptide, there are other toxins similar in toxicity but lower in concentration. This could imply that the toxicity of the whole venom is almost completely neutralized when toxin Cn2 is trapped by antibody 6009F but the remaining toxins exert an effect for some time until they are eliminated from the circulation. We would like to emphasize that antibody 6009F is capable of completely protecting against envenoming caused by two lethal doses of toxin Cn2 and confers reasonably good protection against two lethal doses of whole venom. The scFv 6009F is stable after 4 weeks stored in NaCl/P, at 4 °C, as shown by a functional activity evaluation during 4 weeks (weekly; data not shown).

The scFv 6009F showed protective activity during this period, indicating that it is functionally stable, as expected from the stringent selection strategy used. In the case of murine scFvs that recognize scorpion toxins, it has been shown that dimerization of scFv confers better affinity and stability [17]. We have also observed that dimerization, as a consequence of directed evolution [36] or shortening of the linker peptide (unpublished results), resulted in an improvement in the stability of the single chain. The diabodies of evolved clones 6F and 610A were constructed by shortening the linker. Despite showing better signals on ELISA, compared with their monomeric counterparts, none of these diabodies was capable of neutralizing toxin Cn2. The neutralization capacity of monomeric 6009F compared with clone 610A (monomer or dimer), indicates that the additional changes present in monomeric 6009F exerted a real positive effect on the affinity and functional stability.

We have obtained two scFvs highly specific to Cn2 toxin from a nonimmune human library (1.1×10^8 members). One of them (3F) was subjected to three cycles of directed evolution yielding a neutralizing variant named 6009F. It was able to neutralize 2 LD₅₀ of toxin Cn2 and 2 LD₅₀ of whole venom. Mutant 6009F was obtained after performing some modifications to the standard procedures of biopanning, specially the inclusion of a pre-elution step with 100 mM triethylamine (TEA) for 30 min to eliminate low stable and/or low affinity variants. The scFv 6009F blocked an epitope in Cn2 which seems to be very relevant for the interaction of the toxin with its target. These are the first recombinant human antibody fragments specific for toxin Cn2, which have been isolated from scFv libraries displayed on filamentous phages. The scFv 6009F could be used as a potential component of a recombinant antiserum against *Centruroides* stings. These results open new avenues for the generation of recombinant antisera against deadly animals.

Experimental procedures

Antigens

Toxin Cn2 (formerly II-9.2.2) was purified from venom obtained by electric stimulation of scorpions of the species *Centruroides noxius* Hoffmann. The venom was purified by Sephadex G-50 gel filtration and cation-exchange chromatography [37]. The other toxins used, CIII [38], CII2 [39], Pg5, Pg7, Pg8 (T Olamendi-Portugal, BI García-Gomez, F Bosmans, J Tytgat, K Dyason, J van del Walt & LD Possani, unpublished data), and FII (toxic fraction II from

Table 4. Oligonucleotide primers used for PCR to append the sequence encoding the peptide linker [(Gly4-Ser)₃] to human V_H and V_L. The sequence corresponds to the 5'–3' orientation.

VK1.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCC
VK2.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
VK3.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGAAATTTGTGTTGACGCAGTCTCC
VK4.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGACATCGTGATGACCCAGTCTCC
VK5.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGAAACGACACTCACGCAGTCTCC
VK6.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTGAAATTTGTGCTGACTCAGTCTCC
VL1.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTCAGCTCGTGTGACGCAGCCGCC
VL2.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
VL3b.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTTCCTGTGAGCTGACTCAGGACCC
VL3a.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTTCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
VL4.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTCACGTTATACTGACTCAACCCGCC
VL5.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTCAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
VL6.link	GGCGGATCAGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGTAAATTTATGCTGACTCAGCCCCA
JH1-2.link	CCACCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCACCTCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
JH3.link	CCACCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCACCTCCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
JH4-5.link	CCACCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCACCTCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
JH6.link	CCACCAGAACCTCCGCCTCCTGATCCGCCACCTCCTGAGGAGACGGTGACCCTGGTCCC

Centruroides limpidus limpidus) [39], were obtained using the same procedure, from venoms of the species *C. limpidus limpidus* (CII) and *Parabuthus granulatus* (Pg).

Construction of the library

A human nonimmune scFv library was prepared from a sample of 400 mL of peripheral blood provided by a healthy individual. cDNA was synthesized from total RNA isolated from B lymphocytes, using random hexamers (Roche RT-PCR Kit, AMV, Indianapolis, IN, USA). Variable domain repertoires of immunoglobulin heavy chains were amplified from the cDNA using Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) in combination with each of the HuVHFOR primers and an equimolar mixture of HuJHBACK primers [40] in independent reactions for each family. For light chain variable domains, a similar procedure was performed using each HuVkFOR and a mixture of HuJκBACK for κ chains and each HuVλFOR with a mixture of HuJλBACK for λ chains. A GeneAmp PCR thermocycler (Perkin-Elmer 9600, Norwalk, CT, USA) was used for PCR. The conditions for the amplifications were: 3 min denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles at 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, with a final extension cycle at 72 °C for 10 min. PCR products were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). These fragments were reamplified to append a DNA segment encoding half of the peptide linker [(Gly4-Ser)₃] in independent reactions. The connector primers were designed as described previously [41]. Their sequences are shown in Table 4. PCR products were gel-purified and overlapped by PCR. Each overlapped product (72 in total), was amplified in the same overlapping reaction mixture with primers that allowed the incorporation of *Sfi* and

NotI restriction sites. The following program was used: denaturation at 95 °C for 5 min followed by seven cycles of 1 min at 95 °C, 1.5 min at 64 °C, and 1 min at 72 °C without primers. Subsequently, external primers were added, followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 64 °C, and 1 min at 72 °C and a final extension at 72 °C for 10 min. Each PCR product was quantified and mixed in equimolar amounts to be digested. DNA segments were cut with restriction enzymes *Sfi*I and *Not*I and gel-purified. The resulting DNA fragments were ligated into the phagemid pSyn2 (kindly provided by J. D. Marks, UCSF, San Francisco, CA, USA) previously cut with the same restriction enzymes. Ligated DNA was electroporated into *E. coli* strain TG1. Twenty individual clones were analyzed by digestion with *Bst*NI and sequenced. The sequences of the clones were determined with the primers forward (5'-ATACCTATTGCCTACGGC-3') and reverse (5'-TTTC AACAGTCTATGCGG-3') in the Applied BioSystems sequencer Model 3100 (Foster City, CA, USA).

Isolation of anti-Cn2 scFv by panning of phage-antibody repertoires

The library of human scFv was displayed on filamentous phage and used for the selection of antibodies against Cn2 toxin. Biopanning was performed as described previously [40]. Some modifications to these procedures were as follows: 1 mL of the library (1×10^{13} phage antibodies) was incubated in the presence of different blocking agents (BSA or gclatin) before to biopanning in order to eliminate as many unspecific clones as possible. Pre-blocked library was poured into an immunotube (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) previously coated overnight with 1 mL of Cn2 at 50 µg·mL⁻¹ in NaHCO₃ buffer, pH 9.4 at 4 °C. Exten-

sive washings were performed to remove nonspecific phage. The bound phage-antibodies were recovered by the addition of 1 mL of TG1 cells of a mid-log phase ($A_{600} = 0.7$) culture [23,42]. After four rounds of panning, single phage-antibody clones were randomly picked and screened for specific binding to Cn2 by ELISA. High-binding polystyrene ELISA plates (Corning, NY, USA) were coated overnight with 0.3 μg of Cn2 (100 $\mu\text{L}\cdot\text{well}^{-1}$) in bicarbonate buffer 50 mM pH 9.4 at 4 °C. Plates were washed three times with NaCl/P_i and 0.1% (v/v) Tween, then blocked with 0.5% (w/v) BSA in NaCl/P_i for 2 h at 37 °C. Phage-antibody supernatants were added to each well, incubated for 1 h at 37 °C and the plates washed. Bound phage-antibodies were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 serum (Amersham Pharmacia Biotech AB). HRP activity was detected by adding *O*-phenylenediamine. Plates were read at 492 nm in an ELISA reader (Bio-RAD Model 2550). Clones that bound to Cn2 with absorbance values > 2 were considered positive. Specific binding clones were sequenced.

Phage-antibody cross-reactivity

Selected phage-antibodies were tested for specificity with different antigens by ELISA. High-binding polystyrene immunoplates were coated with several proteins (Cn2, CIII, CII2, FII, Pg5, Pg7, Pg8, BSA, casein and gelatin) in bicarbonate buffer 50 mM pH 9.4 at 4 °C overnight. One hundred microliters of each selected variant containing 1×10^{11} phage-antibodies $\cdot\text{mL}^{-1}$ were added to the wells and detected as described.

Affinity maturation by error-prone PCR

Selected clones from the constructed library after four rounds of biopanning, were subjected to mutagenesis. Two standard techniques of error-prone PCR were used to construct random mutant scFv libraries with different mutation rates [43,44]. Both PCR products were mixed, digested with *Sfi*I and *Nor*I, gel-purified and then ligated into the phagemid pSyn2. Ligated DNA was electroporated into electrocompetent *E. coli* TG1 cells. The library variability (mutation rate) was determined. The library was subjected to 3–4 rounds of biopanning as described previously [38]. Three cycles of evolution were performed.

For the last cycle of evolution, a second biopanning procedure was employed in order to obtain scFv clones with improved affinity and functional stability. It was performed according to the standard methods but with the following modifications: the immunotube was coated with 1 mL of Cn2 at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the time of incubation was increased from 2 to 5 h and the temperature was increased from 25 to 37 °C. After the washing steps, 1 mL of 100 mM TEA (Pierce, Rockford, IL, USA), was added to remove the less stable or low-binding phage-antibodies. The incubation

time was 30 min, after which the detached phages were eliminated. Immunotubes were rinsed with 1 mL of 1 M Tris/HCl, pH 7 to neutralize the TEA and then washed three times with NaCl/P_i. Phage-antibodies that remained bound to Cn2 were recovered with *E. coli* TG1 cells. The clones selected with this procedure were evaluated by ELISA as soluble proteins.

Expression of single-chain antibodies

The scFv inserts from the selected clones, were ligated into the expression vector pSyn1 [45,46]. This vector allows expression of the cloned segment under the control of *lac* promoter. The expressed product contains a C-myc tag and a hexa-His tag at the C-terminus. The constructs were transformed into *E. coli* strain TG1. Five hundred milliliters of recombinant cells were grown until an $A_{600} = 0.7$ was reached. Expression of the scFvs was induced with 1 mM isopropyl thio- β -D-galactoside. After 6 h the cells were harvested by centrifugation (6000 r.p.m., 10 min, to 4 °C). The pellet was resuspended in 12.5 mL of periplasmic buffer (PPB) extraction buffer (20% sucrose/1 mM EDTA/30 mM Tris HCl adjusted to pH 8). The mixture was incubated on ice for 20 min. Cells were centrifuged at 6440 g at 4 °C for 20 min. The supernatant containing the scFv protein was collected for further purification. The pellet was resuspended in 5 mM MgSO₄, kept on ice for 20 min and centrifuged at 6440 g at 4 °C for 20 min p.p.b. and MgSO₄ supernatants were mixed and dialyzed twice against 1x NaCl/P_i. The scFvs were purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography (Qiagen, Hilden, Germany), and eluted with 1 mL of 250 mM imidazole. Finally, scFv preparations were purified by gel filtration chromatography on a SuperdexTM 75 column (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden).

Neutralization assays

Purified scFv proteins were used to test their neutralization capacity against the toxic effects of Cn2 or the whole venom in mice. Groups of 10–20 female mice (CD1 strain) were injected with a mix of scFv and toxin Cn2 or venom. One or two LD₅₀ (0.25–0.5 μg per 20 g of mouse weight) of Cn2 toxin or two LD₅₀ (5 μg per 20 g of mouse weight) of whole venom, were mixed with each scFv at a final molecular ratio of 1 : 10 (toxin : scFv). The mix was incubated for 30 min at 37 °C and injected intraperitoneally. Three controls were used: venom (2 LD₅₀), Cn2 (1 LD₅₀ and 2 LD₅₀) or scFv (8.7 μg per 20 g of mouse weight) were injected alone in independent assays. The amounts of antibody used to neutralize 1 or 2 LD₅₀ of the toxin were 8.7 or 17.4 μg , which corresponded to a molar ratio of 1 : 10 in terms of Cn2 concentration. The number of animals was kept to a minimum, but was enough to validate the experiment. The protocols were approved by the ethical committee of animal

care at our institute, following the guidelines of the NIH (USA).

Surface plasmon resonance measurements

Kinetic constants for the interaction between scFv proteins and immobilized Cn2 toxin were determined in a BIA-CORE biosensor system (BIA-CORE X). Twenty-four micrograms of Cn2 toxin were bound onto a CM5 sensor chip using an equimolar mix of *N*-hydroxysuccinimide and *N*-ethyl-*N*-(dimethyl-aminopropyl)carbodiimide in 200 mM Mes buffer pH 4.7. Approximately 400 resonance units (RU) were coupled. The scFvs were diluted at various concentrations in HBS-EP buffer (BIA-CORE) and 60 μ L were injected over immobilized Cn2 at a rate of 30 μ L·min⁻¹ with a delay in the injection of 700 s. Data were analyzed using BIA-EVALUATION (v. 3.2).

Acknowledgements

This work was partially supported by grants from Instituto Bioclon (P-156) and the National Council of Science and Technology, Mexican Government (Z002 and Z005). We thank Dr Humberto Flores for the critical reading and helpful discussions on the manuscript. We thank Dr Eduardo Horjales for analysis and critical comments on the Biacore results. We are indebted to DVM Elizabeth Mata, DVM Barbara Mondragón and Mr Sergio González for invaluable help and animal provision. We also thank Dr Paul Gaytán, Eugenio López MSc and Santiago Becerra BSc for oligonucleotide synthesis and purification, Cipriano Balderas BSc, Mr Fredy Coronas and Mario Trejo for technical assistance, Arturo Ocadiz Ramírez and Shirley Ainsworth MSc for computational assistance. The scholarship to L. R.-U. from the National Council of Science and Technology (CONACyT, 2776), is also acknowledged.

References

- 1 Stockwin LH & Holmes S (2003) The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem Soc Trans* **31**, 433–436.
- 2 Brekke OH & Loset GA (2003) New technologies in therapeutic antibody development. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 544–550.
- 3 Azzazy HM & Highsmith WE Jr (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* **35**, 425–445.
- 4 Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317.
- 5 Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE & Hoogenboom HR (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* **12**, 433–455.
- 6 Boder ET, Midelfort KS & Wittrup KD (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10701–10705.
- 7 Graff CP, Chester K, Begent R & Wittrup KD (2004) Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein Eng Des Sel* **17**, 293–304.
- 8 Roque AC, Lowe CR & Taipa MA (2004) Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog* **20**, 639–654.
- 9 Batra SK, Jain M, Wittel UA, Chauhan SC & Colcher D (2002) Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 603–608.
- 10 Hudson PJ & Souriau C (2003) Engineered antibodies. *Nat Med* **9**, 129–134.
- 11 Cardoso DF, Nato F, England P, Ferreira ML, Vaughan TJ, Mota I, Mazie JC, Choumet V & Lafaye P (2000) Neutralizing human anti-crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library. *Scand J Immunol* **51**, 337–344.
- 12 van Dijk MA & van de Winkel JG (2001) Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 368–374.
- 13 Selisko B, Licea AF, Becerril B, Zamudio F, Possani LD & Horjales E (1999) Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins* **37**, 130–143.
- 14 Lefranc MP (2003) IMGT, the international ImmunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* **31**, 307–310.
- 15 Hughes-Jones NC, Gorick BD, Bye JM, Finnern R, Scott ML, Voak D, Marks JD & Ouwehand WH (1994) Characterization of human blood group scFv antibodies derived from a V gene phage-display library. *Br J Haematol* **88**, 180–186.
- 16 Foote J & Eisen HN (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1254–1256.
- 17 Aubrey N, Devaux C, Sizaret PY, Rochat H, Goyffon M & Billiard P (2003) Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell Mol Life Sci* **60**, 617–628.
- 18 Maynard JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL & Georgiou G (2002) Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol* **20**, 597–601.

- 19 Sawada-Hirai R, Jiang I, Wang F, Sun SM, Ncdellec R, Ruther P, Alvarez A, Millis D, Morrow PR & Kang AS (2004) Human anti-anthrax protective antigen neutralizing monoclonal antibodies derived from donors vaccinated with anthrax vaccine adsorbed. *J Immune-Based Ther Vaccines* **2**, 5.
- 20 Devaux C, Moreau E, Goyffon M, Rochat H & Billiald P (2001) Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin AaH1 from the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Eur J Biochem* **268**, 694–702.
- 21 Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodjits RA, Wilton J & Johnson KS (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* **14**, 309–314.
- 22 Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R et al. (1998) Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6157–6162.
- 23 Sblattero D & Bradbury A (2000) Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* **18**, 75–80.
- 24 Garcia C, Becerril B, Selisko B, Delepierre M & Possani LD (1997) Isolation, characterization and comparison of a novel crustacean toxin with a mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **116**, 315–322.
- 25 Sitges M, Possani LD & Bayon A (1987) Characterization of the actions of toxins II-9.2.2 and II-10 from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* on transmitter release from mouse brain synaptosomes. *J Neurochem* **48**, 1745–1752.
- 26 Kotz JD, Bond CJ & Cochran AG (2004) Phage-display as a tool for quantifying protein stability determinants. *Eur J Biochem* **271**, 1623–1629.
- 27 Zhou HX, Hoess RH & DeGrado WF (1996) *In vitro* evolution of thermodynamically stable turns. *Nat Struct Biol* **3**, 446–451.
- 28 Martin A, Sieber V & Schmid FX (2001) *In vitro* selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J Mol Biol* **309**, 717–726.
- 29 Jung S, Honegger A & Pluckthun A (1999) Selection for improved protein stability by phage display. *J Mol Biol* **294**, 163–180.
- 30 Aubrey N, Muzard J, Christophe Peter J, Rochat H, Goyffon M, Devaux C & Billiald P (2004) Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin AaH1, and functional evaluation versus other antibody fragments. *Toxicon* **43**, 233–241.
- 31 Mousli M, Devaux C, Rochat H, Goyffon M & Billiald P (1999) A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *FEBS Lett* **442**, 183–188.
- 32 Cowell LG, Kim HJ, Humaljoki T, Berek C & Kepler TB (1999) Enhanced evolvability in immunoglobulin V genes under somatic hypermutation. *J Mol Evol* **49**, 23–26.
- 33 Gonzalez-Fernandez A, Gupta SK, Pannell R, Neuberger MS & Milstein C (1994) Somatic mutation of immunoglobulin lambda chains: a segment of the major intron hypermutates as much as the complementarity-determining regions. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12614–12618.
- 34 Daugherty PS, Chen G, Iverson BL & Georgiou G (2000) Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2029–2034.
- 35 Dehesa-Davila M & Possani LD (1994) Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* **32**, 1015–1018.
- 36 Juarez-Gonzalez VR, Riaño-Umbarila L, Quintero-Hernandez V, Olamendi-Portugal T, Ortiz-Leon M, Ortiz E, Possani LD & Becerril B (2005) Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv Version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J Mol Biol* **346**, 1287–1297.
- 37 Zamudio F, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P & Possani LD (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* **204**, 281–292.
- 38 Ramirez AN, Martin BM, Gurrola GB & Possani LD (1994) Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus* Karsch. *Toxicon* **32**, 479–490.
- 39 Alagon AC, Guzman HS, Martin BM, Ramirez AN, Carbone E & Possani LD (1988) Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus* Karsch. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **89**, 153–161.
- 40 Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD & Winter G (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222**, 581–597.
- 41 Hawlisch H, Meyer zu Vilsendorf A, Bautsch W, Klos A & Kohl J (2000) Guinea pig C3-specific rabbit single chain Fv antibodies from bone marrow, spleen and blood derived phage libraries. *J Immunol Methods* **236**, 117–131.
- 42 Lou J, Marzari R, Verzillo V, Ferrero F, Pak D, Sheng M, Yang C, Sblattero D & Bradbury A (2001) Antibodies in haystacks: how selection strategy influences the outcome of selection from molecular diversity libraries. *J Immunol Methods* **253**, 233–242.

- 43 Leung DW, Chen E & Goeddel DV (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1**, 11–15.
- 44 Cadwell RC & Joyce GF (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* **2**, 28–33.
- 45 Schier R, Marks JD, Wolf EJ, Apell G, Wong C, McCartney JE, Bookman MA, Huston JS, Houston LL & Weiner LM (1995) *In vitro* and *in vivo* characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnol* **1**, 73–81.
- 46 Bai J, Sui J, Zhu RY, Tallarico AS, Gennari F, Zhang D & Marasco WA (2003) Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J Biol Chem* **278**, 1433–1442.

Supplementary material

The following material is available from <http://www.blackwellpublishing.com/products/journals/suppmat/EJB/EJB4687/EJB4687sm.htm>

Fig. S1. Expression and purification of scFv 6009F. (A) SDS/PAGE (12%). Lane 1, molecular mass markers; lane 2, antibody 6009F after affinity purification on Ni²⁺-agarose; lane 3, periplasmic extract. (B) Lane 1, antibody 6009F after Superdex 75 column purification; lane 2, molecular mass markers.

Fig. S2. Purification by molecular exclusion. (A) Superdex 75 exclusion chromatography of antibody 6009F after affinity purification on Ni²⁺-agarose. (B) Molecular mass standards: ovalbumin (43 kDa), trypsinogen (23.9 kDa). The rate flux was 0.5 mL·min⁻¹.

Dedicó muy especialmente este trabajo, a la memoria de mi amigo
Mario Rivera

En todas las pistas que visitaste y las que te faltaron, las de día y las de noche,
secas o mojadas, de principio a fin en toda carretera, siempre estaras ahí Rivera.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

