



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD
NEUTRALIZANTE DEL DÍMERO 6009F CONTRA
LA TOXINA Cn2 DEL VENENO DEL ALACRÁN *C.
noxius* MEDIANTE EVOLUCÓN DIRIGIDA

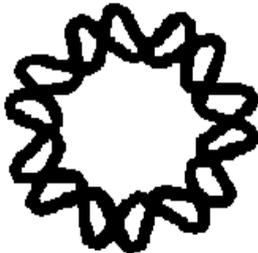
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

BIOL. EVERARDO REMI RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

TUTOR: Dr. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN



CUERNAVACA, MORELOS

2010



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.

Agradecimientos

Al Dr. Baltazar Becerril por la oportunidad de participar en su grupo y realizar este trabajo.

A la Dra. Lidia Riaño porque sin su dirección, apoyo y amistad este proyecto no hubiera existido.

A CONACyT y al IBT, UNAM por la beca y apoyo otorgado para este trabajo.

A los Drs. Brenda Valderrama y Enrique Piñera por su apoyo incondicional y la mesa que tuvieron todo el tiempo a mi disposición.

A los sinodales y revisores de la tesis Dr. Fernando Esquivel, Dr. Gerardo Corzo y Dr. Huberto Flores.

A los técnicos Biol. Sonia Rojas, M.B. Timoteo Olamendi, Biol. Cipriano Balderas por su apoyo técnico.

Al laboratorio asociado del Dr. Joseph Dubrovsky y la Dra. Svetlana Shishkova.

A los compañeros de laboratorio: Miryam, Oscar, Eleuterio, Hector, Lupita, Ricardo, Odón, Eugenio, Hugo, Andrés, Daniel, Mónica, Alejandro.

A mis amigos de cuerna Rafa, Raúl, Mauricio, Alejandra, Juan (ingeniero), Ramces, Gabriel, Yamel, Odette, Pablo, Jacobo, Benjamin, Gercho, René, Selene, Paz, Abraham, Armando.

A los del DF: Julio (manzana), Olga, Paco, Poncho, Goreti, Melisa, Julio Cesar, Benjamín, David (chino), emir.

A los payos Tavo y Pollo por aguantarme 15 años y contando.

A mi segunda casa y familia por su gran apoyo, confianza, cuidados y alegrías, así como por abrirme la puerta de su casa en todo momento: Veronica; por brindarme ese cariño tan especial (el consentido), Temiz; por las sonrisas y Tomasita; mi abuelita consentida.

A Jaime Reyes por su apoyo en todo momento.

A mis tíos Pedro y Rosa, y mis primos Picos y Ale.

A la Btortita por no dejarnos tirados.

DEDICATORIA

A mi gran familia, mamá gracias por tu confianza, apoyo y creer en mí siempre, éste éxito es tuyo también. A mi abuelita que siempre se mantiene a mi lado, cuidando y rectificando cada pasó que doy gracias por el aprendizaje y estar ahí en todo momento.

A mis hermanos Endia (yayita), Erika (yeyo), Brenda y Edgar por darme tantas sonrisas y buenos momentos, saben cuánto los quiero. A las personas que me hacen sentirme como niño de nuevo Tabitha (yeyito) y Franco. A mi papá por brindarme su apoyo incondicional. Gracias por ser parte de esto también.

A la persona que ha estado a mi lado en las buenas y en las malas apoyándome, que me anima a levantarme a cada tropiezo, así como también disfruta cada triunfo y éste es uno más, bb. A mi compañera y amiga que me hace sonreír a cada instante y me brinda su confianza a mí niña linda, Jazmín. Gracias por dejarme compartir cada momento a tu lado.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Lidia Riaño Umbarila, en el laboratorio del Dr. Baltazar Becerril Luján, dentro del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UNAM. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción	
Anticuerpos	7
Anticuerpos terapéuticos	10
Anticuerpos recombinantes	10
Fragmentos variables de cadena sencilla	11
Multímeros de scFv	12
Estabilidad de anticuerpos	14
Despliegue en fagos	15
Bancos de anticuerpos	17
Bancos inmunes	17
Bancos nativos (no-inmunes)	18
Bancos sintéticos	18
Selección de fago-anticuerpos a partir de una banco	18
Evolución dirigida	20
Antecedentes	
Importancia Médica de los anticuerpos: Antivenenos	21
Alacranismo	22
Sintomatología	23
Terapéuticos contra la picadura de alacrán	23
Efectos secundarios por el uso de anticuerpos terapéuticos	23
Cn2 y 6009F	25
Justificación	27
Hipótesis	28
Objetivo General	28
Objetivos Particulares	28
Metodología	
Materiales	29
Construcción del banco mutagénico	29
Despliegue del banco como fago-anticuerpos	30
Selección de variantes del dímero 6009F	31
Expresión de anticuerpos en placas de 96 pozos	34
Pruebas de ELISA	34
Expresión y purificación de los fragmentos de anticuerpos	35
Pruebas de estabilidad mediante ELISA	35
Pruebas de neutralización	35
Resultados	
Neutralización del dímero 6009F	36
Bancos de variantes del scFv 6009F dimérico	37
Evaluación de variantes	39
Pruebas de estabilidad por ELISA	42
Pruebas de estabilidad térmica	44

Pruebas de estabilidad durante almacenaje (vida de anaquel).....	44
Pruebas de reactividad cruzada.....	45
Pruebas de neutralización.....	46
Discusión.....	48
Conclusiones.....	57
Perspectivas.....	57
Referencias.....	58
Abreviaturas.....	67

RESUMEN

El alacranismo es un problema de salud a nivel mundial. México se encuentra ubicado entre las tres regiones con mayor número de accidentes por picadura de alacrán con 200,000 casos por año. La terapia actual contra la intoxicación por picadura de alacrán es el uso de antivenenos conocidos como Faboterápicos (Fab₂), aunque son funcionales son de origen animal.

La tecnología de anticuerpos recombinantes tiene un gran potencial para generar moléculas con uso terapéutico. Así mismo, pueden ser producidos en microorganismos lo que permite reemplazar la manera tradicional de producirlos (por inmunización). Los anticuerpos con fines terapéuticos idealmente deben cumplir con cuatro puntos fundamentales. i) Unirse específicamente y con alta afinidad al antígeno y lograr la neutralización de este, ii) Obtener grandes cantidades de proteína funcional en sistemas de expresión baratos y de fácil manejo como los bacterianos (*E. coli*), iii) Ser de origen humano con la finalidad de disminuir los efectos secundarios adversos y iv) Ser estables y mantener su funcionalidad en condiciones fisiológicas y de almacenamiento.

Actualmente se ha dado un aumento en el uso de los fragmentos variables de cadena sencilla de anticuerpo (scFv) como agentes de diagnóstico, de investigación y terapia. Esto se debe a que tienen la ventaja de mantener el sitio de interacción con el antígeno y son fácilmente manipulables para mejorar sus propiedades.

El uso de scFv humanos como alternativa para la generación de nuevos antivenenos es muy promisorio. En un trabajo previo se logró aislar el scFv 6009F de origen humano. Este scFv tiene la capacidad de neutralizar a la toxina Cn2 y al veneno completo del alacrán *Centruroides noxius* considerada la especie más tóxica de México. Los animales experimentales no presentan síntomas de intoxicación al ser aplicado el anticuerpo 6009F en presencia de la toxina o el veneno completo (Riaño *et al.*, 2005). Sin embargo, los scFvs son moléculas inestables en comparación a los Fab.

Una de las estrategias para mejorar la estabilidad de los scFvs es la generación de multímeros. En particular, los dímeros de scFv suelen ser moléculas más estables, mantienen el reconocimiento por el blanco original, en muchos casos presentan mejor afinidad y su comportamiento *in vivo* es satisfactorio. Por las cualidades mencionadas, se realizó la construcción del dímero scFv 6009F. Sin embargo, éste mostró tener una menor capacidad neutralizante en comparación con el monómero, ya que en las pruebas de neutralización se observó la aparición de síntomas de intoxicación en los animales experimentales (datos no publicados, Lab. Dr. Becerril). Esto puede deberse a un problema de estabilidad del dímero. En este trabajo se buscó aislar una variante del scFv 6009F dimérico con mejores propiedades neutralizantes, mediante el uso de las técnicas de despliegue en fagos y evolución dirigida.

Se realizó la construcción de bancos mutagénicos de scFvs diméricos por medio de EP-PCR los cuales fueron desplegados en fagos. Los bancos de fago-anticuerpos fueron sometidos a rondas de tamizado bajo diferentes presiones selectivas. Se lograron aislar dos mutantes denominadas: Dim9F-C9 y Dim9F-D4.

Mediante la caracterización de los anticuerpos diméricos aislados se encontró que la variante Dim9F-D4 mostró mejores propiedades como son: mayores niveles de expresión, estabilidad y actividad neutralizante en comparación al dímero 6009F.

INTRODUCCIÓN

En los organismos superiores, el sistema inmune está integrado por diversos tejidos y órganos, así como por células y proteínas altamente especializadas. Entre estas proteínas destacan los **anticuerpos**, cuya generación es parte de una respuesta adaptativa por la que se reconocen, neutralizan y eliminan sustancias ajenas al organismo. En general, se denomina **antígeno** a cualquier sustancia capaz de estimular la generación de anticuerpos. Un aspecto fundamental de la respuesta inmune es la presencia de anticuerpos capaces de unirse específicamente a cualquier antígeno. Lo anterior, supone que el organismo es capaz de generar una enorme diversidad estructural en las regiones de los anticuerpos que reconocen al antígeno. De esta manera pueden aislarse aquellos con la capacidad de establecer fuertes interacciones fisicoquímicas con el antígeno.

Anticuerpos.

Los anticuerpos son glicoproteínas formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos **cadena pesadas** idénticas (**H**) y dos **cadena ligeras** idénticas (**L**). Cada cadena H está formada por un **dominio variable (VH)** y tres **dominios constantes (CH)**. Asimismo, las cadenas L están formadas por un dominio variable (**VL**) y otro constante (**CL**) (Fig.1a). Los dominios VL pueden ser de dos clases, **kappa (κ)** ó **lambda (λ)**.

Los dominios VH y VL se encuentran en la porción NH₂ terminal de las cadenas, y son responsables de reconocer al antígeno. Los dominios VH y VL presentan regiones hipervariables, también conocidas como **CDRs** (*Complementarity Determining Regions*) (Fig.1a). En éstas regiones se encuentran la mayoría de los residuos que interactúan con el antígeno. Los CDRs están flanqueados por residuos que forman un **andamiaje de soporte** (*framework*). Este andamiaje está formado por una estructura β -sándwich característica de los anticuerpos que es importante para la permanencia estructural de los **dominios variable (Fv)**.

Los dominios CH se unen entre sí mediante dos puentes disulfuro, a esta región se le denomina bisagra. Así mismo, cada dominio CH interactúa mediante puentes disulfuro con la porción COOH de las regiones CL. La estructura del anticuerpo asemeja una Y, cuyos brazos se denominan **Fab** (*antigen binding fragment*) (Fig.1b). Cada Fab puede interactuar con el antígeno de manera independiente, por lo que el anticuerpo es de carácter divalente (Fig.1a). El resto de la molécula, llamado **fragmento cristalizante (Fc)**, aunque no participa en la interacción con el antígeno y es reconocido por receptores celulares específicos, es decir participa directamente en la respuesta efectora mediante la cual se elimina al antígeno.

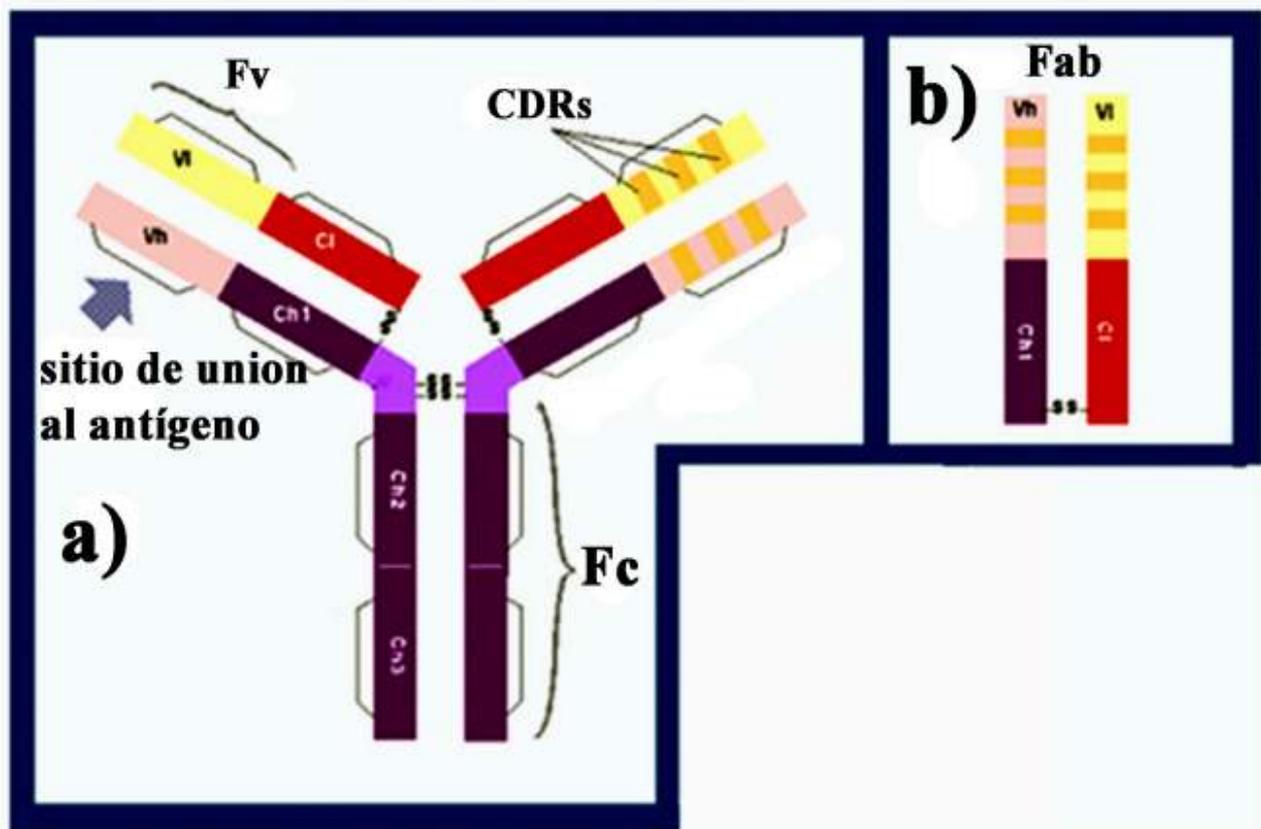


Figura 1. Representación de la estructura de un anticuerpo. a) Ubicación de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L), de los dominios variables (V) y constantes (C), y de los sitios de unión al antígeno (CDRs). b) El fragmento **Fab** del anticuerpo está formado por la cadena ligera (L) y su región equivalente de la cadena pesada (H). Este fragmento se obtiene generalmente por digestión enzimática, aunque es posible generarlo de manera recombinante (modificada de Dübel S. en *Antibody Resource Page*).

El ser humano cuenta con un número determinado de genes que contribuyen a la formación de los dominios V de los anticuerpos. La generación de diversidad en los anticuerpos ocurre principalmente por el mecanismo de **recombinación somática**. En este proceso ocurre un arreglo de los genes de los dominios V de manera aleatoria y son combinados con los dominios C (Abbas *et al.*, 2004).

La recombinación somática comienza con el arreglo de las secuencias de la cadena H, correspondientes a los genes V_H - D_H (*Diversity*)- J_H (*Joining*). La cadena L, ya sea κ ó λ , se organizan de manera similar, excepto que carece del gen D. Para la cadena κ ó λ el gen V_L codifica para los CDRs 1 y 2, así mismo para una porción del CDR3 y para tres regiones del andamiaje. El segmento J_L codifica para la porción restante del CDR3 y para la cuarta región del andamiaje. En el caso de la cadena H los genes codifican de manera similar solo que el CDR3 está conformado por los genes D_H y J_H (Rabbitts., 1967; Abbas *et al.*, 2004; Janeway *et al.*, 2005).

El repertorio en número de genes funcionales en los humanos es de:

$$V_H=50, D_H=30, J_H=6, V_K=40, J_K=5, V_L=30 \text{ y } J_L=4.$$

La recombinación somática ocurre durante el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea.

Se estima que la diversidad (combinaciones de VDJ_H y VJ_L) es de 3.5×10^6 diferentes anticuerpos. Sin embargo, esta variedad probablemente sea menor debido a que se presenta una preferencia de ciertos tipos de arreglos (Rabbitts., 1967; Abbas *et al.*, 2004).

Existe la generación de diversidad en los genes J, ya que sufren un procesamiento transcripcional (*splicing*) diferencial, lo cual se ve reflejado en el número de residuos de aminoácidos que conforman la región correspondiente al CDR3. Es necesario mencionar que el CDR3 es una región importante para el reconocimiento de los diferentes antígenos (Abbas *et al.*, 2004; Janeway *et al.*, 2005).

Un mecanismo adicional para la generación de diversidad de los anticuerpos ocurre posterior a la maduración de los linfocitos B, los cuales han migrado a órganos linfoides secundarios.

Los linfocitos B son células inmunitarias que expresan anticuerpos en la superficie para el reconocimiento del antígeno. Cuando un anticuerpo reconoce al antígeno, el linfocito B recibe estímulos para su proliferación (selección clonal). Durante la proliferación el locus del anticuerpo sufre una tasa elevada de mutación alrededor de 10^5 - 10^6 veces mayor que la tasa que se presenta en el genoma normalmente (Oprea., 1999; Abbas *et al.*, 2004; Janeway *et al.*, 2005). Las mutaciones que se presentan son principalmente sustituciones de un solo nucleótido, como inserciones o deleciones y ocurren preferentemente en los genes recombinados de VDJ_H y VJ_L . A este mecanismo se le denomina **hipermutación somática** y permite la maduración del anticuerpo, ya es posible aumentar de la especificidad y afinidad del anticuerpo por su blanco (Oprea., 1999; Abbas *et al.*, 2004; Janeway *et al.*, 2005; Odegard *et al.*, 2006). Es importante mencionar que las mutaciones solo afectan a las células inmunitarias individuales y los cambios no se transmiten a la descendencia. Sin embargo, las modificaciones en los anticuerpos son almacenadas en células de memorias del individuo las cuales en un segundo encuentro con el antígeno pueden responder rápidamente (Abbas *et al.*, 2004; Janeway *et al.*, 2005).

Gracias a la recombinación somática y la hipermutación la diversidad de anticuerpos en el humano oscila entre 10^8 y 10^9 variantes, razón por la cual se considera que podrían reconocer a cualquier antígeno.

La eficiencia del reconocimiento y la eliminación del antígeno dependen estrictamente de las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos. Tanto la estabilidad estructural del anticuerpo, como la especificidad y la afinidad de las interacciones son parámetros fundamentales para lograr la neutralización del antígeno. En este trabajo, la neutralización supone la capacidad del anticuerpo

de bloquear la actividad de una molécula dañina o tóxica, y por ende los efectos nocivos que ésta pueda causar al organismo. Una neutralización efectiva incluye la eliminación del antígeno por los mecanismos de excreción del organismo.

Anticuerpos terapéuticos.

Actualmente se emplean anticuerpos con fines terapéuticos, muchos de éstos se obtienen por la inmunización de animales como caballos, ratones y conejos, entre otros. La respuesta inmune del animal se estimula a través de inyecciones periódicas del antígeno de interés (inmunización), en ocasiones conjugados con adyuvantes potentes, para obtener anticuerpos específicos y de alta afinidad por el antígeno. Los anticuerpos generados son purificados del suero y son los más empleados en los antivenenos comerciales. Los anticuerpos obtenidos del suero son diversos en cuanto a número y epítopes que reconocen. A este grupo de anticuerpos se les denomina **policlonales**.

Pueden producirse anticuerpos capaces de reconocer un solo epítipo. Esto se logra a través de la generación de hibridomas que consisten en células de mieloma fusionados a linfocitos B de animales inmunizados. Los mielomas se cultivan de manera continua y tienen la capacidad de producir un solo tipo de anticuerpo, el cual es por definición un anticuerpo **monoclonal** (Mab, por sus siglas en inglés, *Monoclonal antibodies*).

Los anticuerpos completos tienen un peso molecular de 150 kDa, y en el organismo presentan un tiempo de permanencia de semanas (Holliger *et al.*, 2005). Estas características son favorables en algunas aplicaciones terapéuticas, como son el diagnóstico y tratamiento de ciertos tipos de cáncer, sin embargo, para el tratamiento de intoxicaciones conviene una rápida eliminación de los compuestos nocivos. Mediante digestión enzimática pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos, como Fab o (Fab')₂, los cuales conservan las regiones estructurales que reconocen al antígeno (Fig.1b y 2). En la actualidad existen las herramientas necesarias para la producción de anticuerpos o fragmentos de estos sin necesidad de inmunizar animales o personas, es la denominada tecnología de **anticuerpos recombinantes**.

Anticuerpos recombinantes.

Los avances en la Biología Molecular nos han facilitado en gran medida la manipulación de genes. Mediante técnicas de ADN recombinante es posible generar cADN (ya sea a partir de hibridomas o de un organismo) que codifica para los anticuerpos. Con las secuencias codificantes de los dominios V es posible realizar diferentes construcciones en vectores diseñados para expresarse en diferentes organismos, como células de mamíferos, levaduras y bacterias como es

Escherichia coli. Con la información genética de los anticuerpos, ha sido posible construir diferentes formatos de anticuerpo, el más conocido de ellos; **fragmento variable de cadena sencilla (scFv)**, por sus siglas en inglés *single chain variable fragment*) (Fig.2) (Bird *et al.*, 1988; Houston *et al.*, 1988; Chames *et al.*, 2009).

Uno de los microorganismos más empleados para la producción de proteínas recombinantes es la bacteria *E. coli*, debido en parte al gran conocimiento biológico del mismo. Sin embargo, no todos las proteínas pueden expresarse eficientemente en este organismo. Esto puede estar determinado por las características de la secuencia génica, eficiencia traduccional (uso diferencial de codones), plegamiento, estabilidad, la carencia de mecanismos de secreción eficientes, limitada capacidad de puentes disulfuro, así como actividad y toxicidad de la proteína para el organismo de expresión. Aun con las limitaciones de los sistemas de expresión bacterianos se han implementado estrategias para mejorar las cepas de *E. coli* con la finalidad de obtener anticuerpos funcionales.

Algunas de las grandes ventajas que conlleva esta tecnología son: altos niveles de obtención de producto, si el sistema de expresión es el correcto, fácil manipulación genética y bajo costo económico. La tecnología de anticuerpos ha crecido a pasos agigantados en los últimos años, lo cual se ve reflejado en que los anticuerpos recombinantes representan el 85% del total de inmunoterapéuticos aprobados por la FDA (*Food and Drugs Administration*) (Nelson *et al.*, 2009).

Fragmentos variables de cadena sencilla.

Los dominios VH y VL pueden ser expresados de forma individual, ya que pueden asociarse naturalmente para formar el **Fragmento variable (Fv)** (Fig.1) (Bird *et al.*, 1988; Houston *et al.*, 1988). Sin embargo, esta interacción entre dominios es poco estable y tienden a disociarse de manera rápida. Para solucionar este problema se acopló covalentemente entre las regiones variables un **péptido conector**. De tal manera que se favorezca la interacción entre las cadenas y su permanencia de forma funcional. A esta construcción se le denomina **scFv** (Fig.2) la cual tiene un tamaño de alrededor de los 30 kDa (Bird *et al.*, 1988; Houston *et al.*, 1988). El péptido conector suele estar formado por una secuencia de 15 residuos de carácter hidrofílico e incluyen los L-aminoácidos: Thr, Asp, Asn, Ala, Ser y Gly. Estos dos últimos aminoácidos son los más utilizados hasta hoy en día, en un arreglo (Ser₄-Gly)₃, debido a su flexibilidad y su composición hidrofílica, esta secuencia permite interacciones por puentes de hidrógeno con el disolvente, además de que es relativamente resistente a las proteasas. Es importante mencionar que se ha

demostrado que es la secuencia más favorecida y usada para despliegue en fagos (Holliger *et al.*, 1993; Huston *et al.*, 1991; Hudson *et al.*, 1999; Kortt *et al.*, 2001).

Los scFvs presentan diversas ventajas como son: mantienen su capacidad de reconocimiento por los antígenos a pesar de ser moléculas pequeñas. En sistemas *in vivo* tienen una penetración en los tejidos más rápida y homogénea. Así mismo, presentan un menor tiempo de retención en los tejidos que no son blanco y una rápida eliminación de la sangre.

La mayoría de los scFvs son intrínsecamente inestables y algunos pueden asociarse para formar moléculas de mayor tamaño, incluyendo dímeros y trímeros, lo cual puede complicar su selección y caracterización. Sin embargo, siguen siendo los formatos más utilizados hoy en día en investigación, diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Schmiedl *et al.*, 2000; Hale *et al.*, 2006; Brekke *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 1994).

Multímeros de scFv.

Como se mencionó, los scFv se encuentra preferentemente en forma monomérica, pero pueden agregarse para formar **multímeros** lo cual depende de varios factores como: concentración, pH, fuerza iónica y temperatura (Arndt *et al.*, 1998). Se ha determinado que un parámetro adicional que favorece la formación de multímeros es el tamaño del péptido conector. Al modificar la longitud del conector es posible generar moléculas **diméricas** (60kDa), **triméricas** (90kDa) o **tetraméricas** (120kDa) (Fig.2) (Huston *et al.*, 1991; Brüsselbach *et al.*, 1999; Kipriyanov *et al.*, 1999). Se ha demostrado que los scFvs tienden a mantener su conformación monomérica cuando la longitud del péptido conector es de 15 a 20 aminoácidos (Huston *et al.*, 1991). La formación de dímeros es favorecida cuando los conectores son menores a 10 residuos; algunos estudios muestran que péptidos conectores de entre 4 a 6 residuos son los más favorables para la generación de dímeros de scFvs funcionales *in vivo* (Huston *et al.*, 1991; Holliger *et al.*, 1993; Völkel *et al.*, 2001). Por otro lado, conectores por debajo de 3 residuos propician conformaciones triméricas, mientras existe una predominancia de tetrámeros cuando se elimina el péptido conector (Hudson *et al.*, 1999; Völkel *et al.*, 2001). Un péptido conector de tamaño corto tiene menor susceptibilidad a la degradación por proteasas debido a que es más inaccesible para estas (Kortt *et al.*, 2001).

La formación de multímeros mediante el recorte del péptido conector se debe a que no es posible que las regiones variables de cada monómero puedan interactuar entre sí, para formar un sitio de unión al antígeno, por lo que el ensamblado se lleva a cabo mediante la asociación con otro monómero. Es decir, la VL1 de un monómero debe interactuar con la VH2 de otra

molécula; en consecuencia, la VH1 interacciona con la VL2 del segundo, de esta manera se forman dos sitios de unión al antígeno orientados en direcciones opuestas.

Se ha reportado que los anticuerpos multivalentes tienen mejoras notables en sus propiedades como: la afinidad y/o estabilidad. De hecho, las primeras pruebas clínicas de fragmentos de anticuerpos de origen multivalente muestran mejor afinidad, estabilidad y distribución que los monómeros y mantienen un comportamiento satisfactoriamente eficiente en comparación con los multímeros de Fab (Holliger *et al.*, 1993; McGregor *et al.*, 1994; Katja *et al.*, 1998; Goel *et al.*, 2001; Tahtis *et al.*, 2001). Con los principios de multimerización es posible generar moléculas multiespecíficas, es decir anticuerpos que tienen la capacidad de reconocer a más de un antígeno (Fig.2) (Holliger *et al.*, 1993; Kortt *et al.*, 2000).

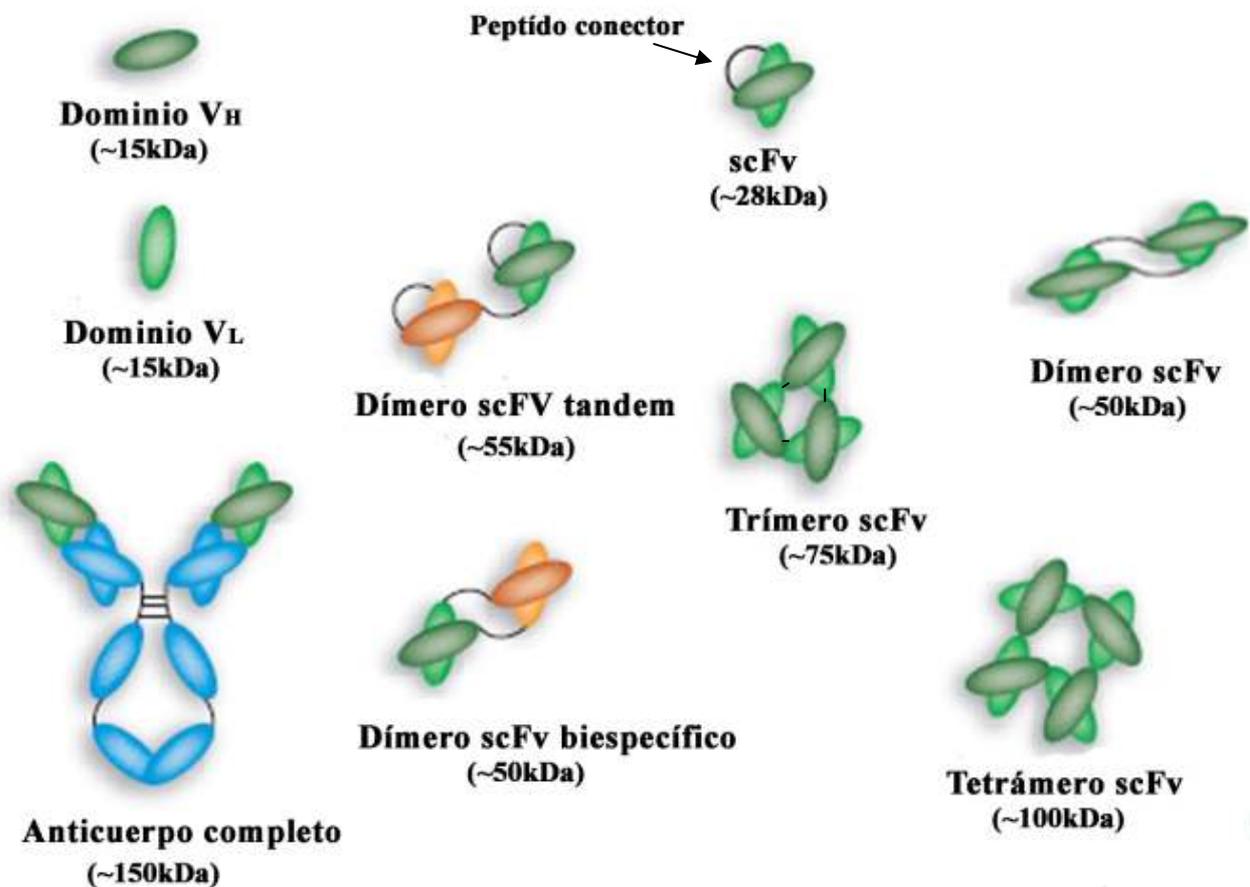


Figura 2. Multímeros de scFv. A partir de las regiones Fv del anticuerpo pueden realizarse construcciones para la formación de multímeros. Se representan dímeros, trímeros y tetrámeros de tipos multivalente o multi-específico. Pueden darse de manera espontánea, en diferentes condiciones o a través de la modificación de la longitud del péptido conector. Su utilización depende de la aplicación que se quiera; esto está íntimamente relacionado con el peso molecular de multímero (modificada de Holliger *et al.*, 2005).

Estabilidad de anticuerpos.

Como hemos descrito, se pueden utilizar diferentes formatos de anticuerpos dependiendo de las necesidades y los medios de producción con los que se cuenten. Al mantener los fragmentos variables (Fv) intactos, cuya función es el reconocimiento al antígeno, nos da la ventaja de jugar con los diferentes formatos de anticuerpos.

Existe una relación directa entre la estabilidad y la actividad biológica de cada molécula. Además, en el caso de los antivenenos el requerimiento de estabilidad es fundamental, debido a que deben pasar periodos de almacenaje y soportar cambios drásticos de condiciones.

Los formatos de anticuerpos Fab tienden a ser más estables que los scFv, lo cual se debe a que en los Fab poseen los dominios C. Es importante mencionar que otro parámetro que determina la estabilidad de los fragmentos de anticuerpos, es la cooperatividad entre la interfaz de las cadenas H y L. Asimismo, la interfaz de los Fabs es mayor que en los scFvs por los dominios C (Wörn *et al.*, 1999; Wörn y Plückthun., 2001).

La maduración *in vitro* de anticuerpos mediante evolución dirigida es una de las técnicas que permite mejorar las propiedades de las moléculas para su aplicación. Se ha determinado que al beneficiar la estabilidad de scFv por este método, hay una mejoría considerable en la funcionalidad *in vivo* (Wörn *et al.*, 1999; Wörn *et al.*, 2000; Wörn y Plückthun 2001).

Una alternativa reciente es la utilización de anticuerpos que naturalmente presentan alta estabilidad, como los provenientes de camélidos (dromedarios y llamas) o de peces cartilagosos (tiburones). Estos anticuerpos consisten en un solo dominio, llamado VHH para camélidos y V-NAR para tiburones. Los dominios son pequeños (13kDa) y pueden producirse fácilmente en bacterias y levaduras. De manera global son denominados anticuerpos de un solo dominio ó sdAbs (*single-domain antibodies*) (Hamers *et al.*, 1993; Chames *et al.*, 2009). Es sorprendente que los sdAbs son moléculas con gran estabilidad aun cuando el puente disulfuro intradominio, característico de los anticuerpos humanos, no se encuentra presente. Estas variantes se han comenzado a utilizar para conseguir anticuerpos neutralizantes contra el veneno de alacranes como el *Androctonus australis* (Medden *et al.*, 2003; Abderrazek *et al.*, 2009). Sin embargo, siguen siendo de origen animal lo que puede causar reacciones secundarias adversas cuando son utilizados.

Como propuesta viable para mejorar la estabilidad de los scFvs humanos, como agentes terapéuticos, puede ser la multimerización.

Despliegue en fagos.

La técnica de despliegue en fagos (*phage display*), comenzó a desarrollarse hace más de 20 años, cuando se demostró su viabilidad como herramienta en la investigación molecular.

El despliegue en fagos es una técnica, en la que diversas proteínas pueden expresarse en la superficie de los fagos, de tal forma que los fagos se convierten en el vehículo que contiene la información genética para la expresión, mientras que expone la proteína de interés en la superficie y mantiene la capacidad de replicarse (McCafferty *et al.*, 1990). El despliegue se logra por la incorporación de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de interés fusionada al gen que codifica para una proteína de la cubierta viral dentro del genoma del fago. Esta fusión traduccional asegura que al ensamblarse el fago la proteína foránea sea desplegada en la superficie del fago maduro. El acoplamiento entre fenotipo y el genotipo es el elemento que sustenta la tecnología. De esta manera se pueden expresar y desplegar una gran cantidad de variantes de secuencias nucleotídicas (alrededor de 10^9) dentro de una población de fagos. A partir de las poblaciones de fagos pueden realizarse selecciones con la finalidad de obtener moléculas con las características deseadas (McCafferty *et al.*, 1990) (Fig. 3).

Como alternativa al sistema de despliegue descrito se crearon sistemas basados en fagémidos. La diferencia radica en que la secuencia de la proteína de interés se introduce a un fagémido, el cual es el vector que contiene un gen para la proteína de la cubierta (*pIII* ó *pVIII*), bajo un promotor (generalmente *Lac*). El fagémido tiene dos orígenes de replicación, uno viral y otro de replicación plasmídico, además de un gen marcador de resistencia a algún antibiótico. La producción de fago-proteína se realiza cuando las células que contienen el fagémido, son infectadas con un fago ayudador (*Helper*), en cual contiene la información genética para expresar las proteínas necesarias para la morfogénesis del fago. Los fagos ayudadores más usados son los derivados del fago M13. La replicación del ADN del fago ayudador es menos eficiente que la del fagémido, lo que permite que el ADN del fagémido sea más abundante y empacado preferencialmente en la partícula viral. Debido a que el fago ayudador también genera proteínas de la cubierta silvestres, el despliegue de la proteína de interés es prácticamente monovalente ya que los fagos se ensamblan tanto con proteínas de cubierta silvestres como fusionadas. Este sistema presenta ventajas con respecto al sistema de fago como: la fácil manipulación, la estabilidad genética y la obtención de anticuerpos solubles (Bradbury *et al.*, 2004; Hoogenboom *et al.*, 1998).

El despliegue en fagos es una herramienta muy poderosa para aislar péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpos que tengan propiedades específicas de unión dentro de un gran número

de variantes. La técnica se utiliza principalmente en pruebas moleculares contra blancos específicos, así como, para el análisis y manipulación de las interacciones proteína-ligando.

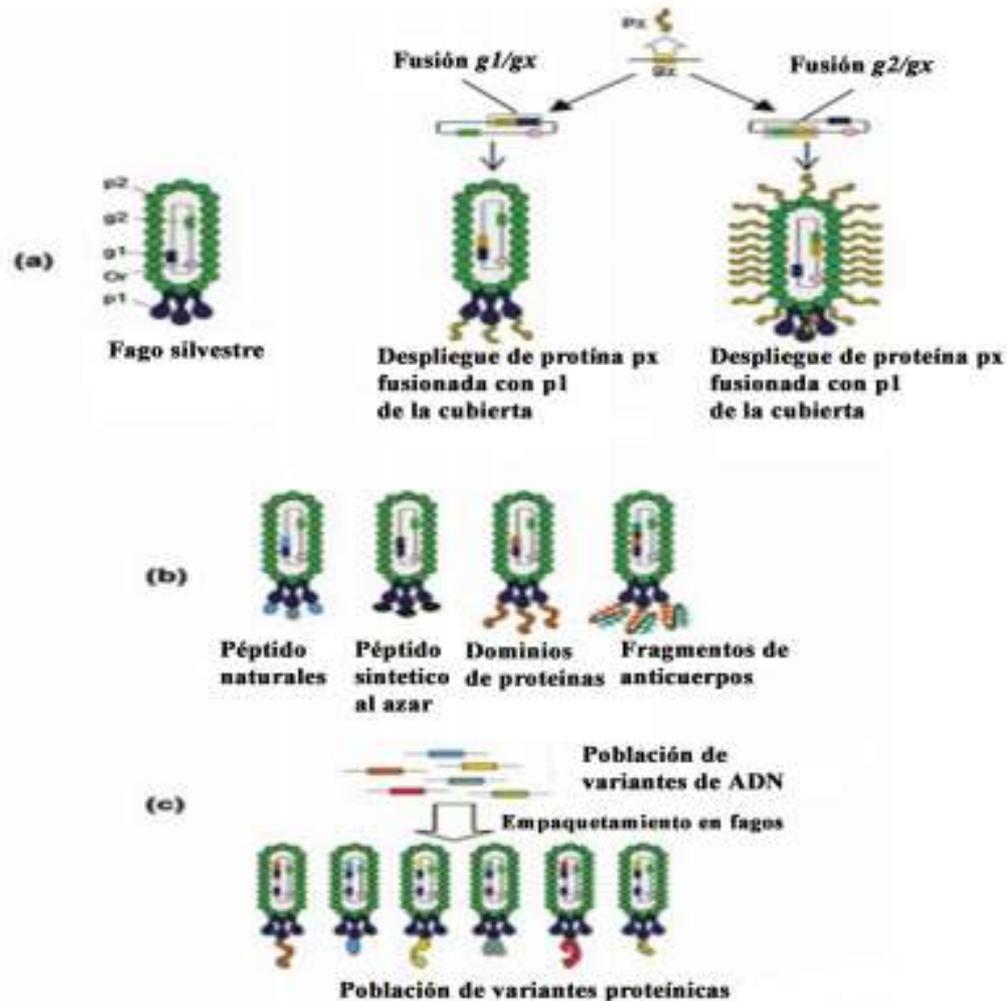


Figura 3. Técnica de despliegue en fagos. a) Fago base, que muestra un origen de replicación (Or) y genes ($g1$ y $g2$), que codifican para las proteínas de la cubierta $p1$ y $p2$, respectivamente. Una proteína exógena px codificada por el gen gx puede ser desplegada en la superficie por la fusión traduccional de gx con algún gen de proteína de la cubierta. b) Éste principio es aplicado para la expresión de péptidos naturales o sintéticos, dominios de proteínas o proteína completa y fragmentos de anticuerpos. c) A partir de una población de variantes nucleotídicas se generan bancos con una diversidad de proteínas desplegadas (modificada de William *et al.*, 2002).

El despliegue en fagos tiene la ventaja de que todo el proceso puede realizarse *in vitro*. Además, durante la evaluación de los fago-anticuerpos por pruebas de ELISA las señales son más intensas que utilizando proteína soluble. Esto se debe a que el anticuerpo secundario reconoce a las proteínas de la cubierta del fago (2800 copias), por lo que la cantidad de anticuerpo desplegado necesario para ser detectado es menor que la cantidad de anticuerpo soluble. Así mismo, el tiempo requerido para producir un anticuerpo recombinante específico es menor en comparación a los hibridomas (unas semanas comparadas con varios meses) y como ya se

mencionó es una herramienta eficiente para la selección de proteínas de interés, además de ser un proceso es relativamente simple, no necesita equipamiento especial y es barata.

Bancos de anticuerpos.

Los bancos de anticuerpos (fago-anticuerpos) se construyen a partir de una diversidad de secuencias, ya sea de un solo organismo o de una población. La diversidad se obtiene a partir de los linfocitos B extraídos de órganos linfáticos como timo, bazo, médula o de sangre periférica. Se realiza la recuperación del ARN total que contiene mensajeros maduros de las secuencias de anticuerpos. Por medio de RT-PCR (reacción con la enzima transcriptasa reversa) se genera cADN, del cual se recuperan las secuencias codificantes de las regiones VH y VL ó V λ ó V κ (Orlandi *et al.*, 1989). La información contenida en el cADN es amplificada usando oligonucleótidos específicos para familias de VHs y VLs. Las secuencias pueden ser combinadas aleatoriamente y clonadas para formar bancos de fragmentos de anticuerpos; scFv o Fab. Las variantes genéticas se clonan en los vectores de despliegue (fago o fagémido), como ya se describió (Fig. 3 y 4). Existen tres tipos de bancos de anticuerpos: inmune, nativo y sintético.

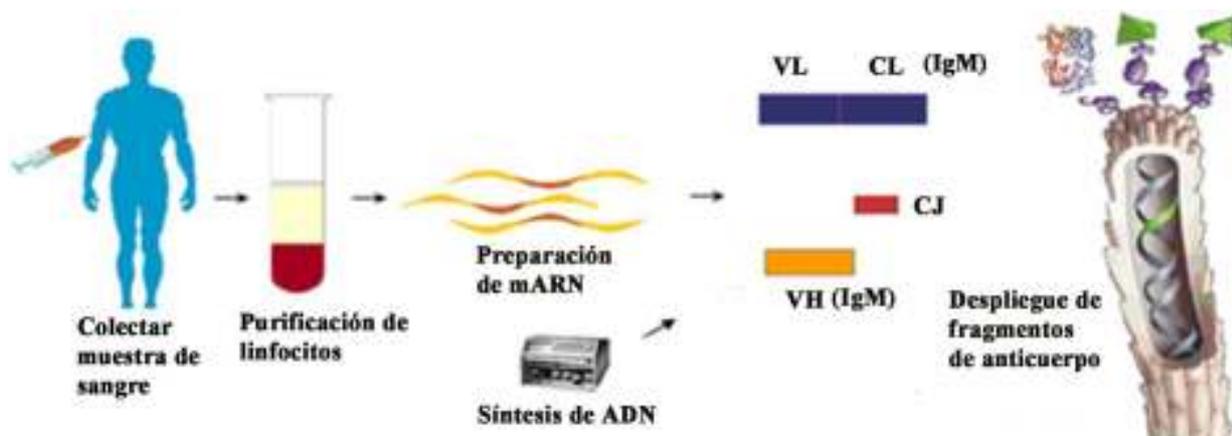


Figura 4. Metodología básica para la construcción de bancos de fago-anticuerpos. Se realiza mediante la obtención de sangre de donadores, la purificación de linfocitos B y combinaciones aleatorias de los dominios VH y VL, previamente amplificados mediante RT-PCR. Posteriormente se clonan para el despliegue y/o expresión.

Bancos inmunes.

La diversidad se crea a partir de los genes de anticuerpos de isotipo G (IgG) presente en los linfocitos B de organismos inmunizados con el antígeno deseado. La población de anticuerpos está enriquecida con variantes que reconocen al antígeno específicamente y presentan alta afinidad debido al proceso de maduración del sistema inmune (Clackson *et al.*, 1991). La construcción de estos bancos permite tener una gran diversidad de anticuerpos específicos y de alta afinidad, a partir de una inmunización, además de tener acceso fácil al material para una

rápida manipulación y producción de ellos. La gran ventaja es que no se requieren bancos de gran tamaño. Sin embargo, existe la desventaja de que la inmunización no siempre es posible debido a la tolerancia hacia el antígeno, por su toxicidad así como a principios éticos.

Bancos nativos (no-inmune).

La diversidad de anticuerpos proviene de IgGs e IgMs, los cuales tienen el potencial de reconocer a una gran variedad de antígenos. Un banco nativo suficientemente grande y diverso permite aislar anticuerpos, contra diversos antígenos, incluyendo aquellos que no son tóxicos o inmunogénicos, es decir, aquellos que no estimulan la respuesta inmunológica natural (Marks *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1997; Vaughan *et al.*, 1996). La afinidad de los anticuerpos seleccionados de un banco nativo es proporcional al tamaño del banco; los rangos van desde 10^{6-7} M^{-1} para un banco con 3×10^7 clonas hasta 10^{8-10} M^{-1} para un banco con un número de clonas mayor a 3×10^9 . Los bancos de scFv humanos llegan a ser de entre 6.7×10^7 a 4.1×10^{10} (Klein *et al.*, 1997; Vaughan *et al.*, 1996; Hoogenboom *et al.*, 1998).

Bancos sintéticos.

Los bancos sintéticos se construyen artificialmente, por medio de un ensamblaje *in vitro* de las secuencias de los dominios V, por ejemplo, por medio de la introducción de secuencias aleatorias en la región de los CDRs (Hoogenboom *et al.*, 1998).

Selección de fago-anticuerpos a partir de un banco.

Una vez que el banco ha sido construido, la tarea es hacer un proceso de selección de clonas específicas que serán analizadas a detalle. Este proceso de manipulación del ADN para la creación de bancos, el despliegue en fagos y la subsecuente selección (rondas de tamizados) es el protocolo básico del despliegue en fagos y se acuñó como “ciclo de despliegue en fagos” (*phage display cycle*) (Hoogenboom *et al.*, 1998). Los pasos del proceso se describen en la figura 5.

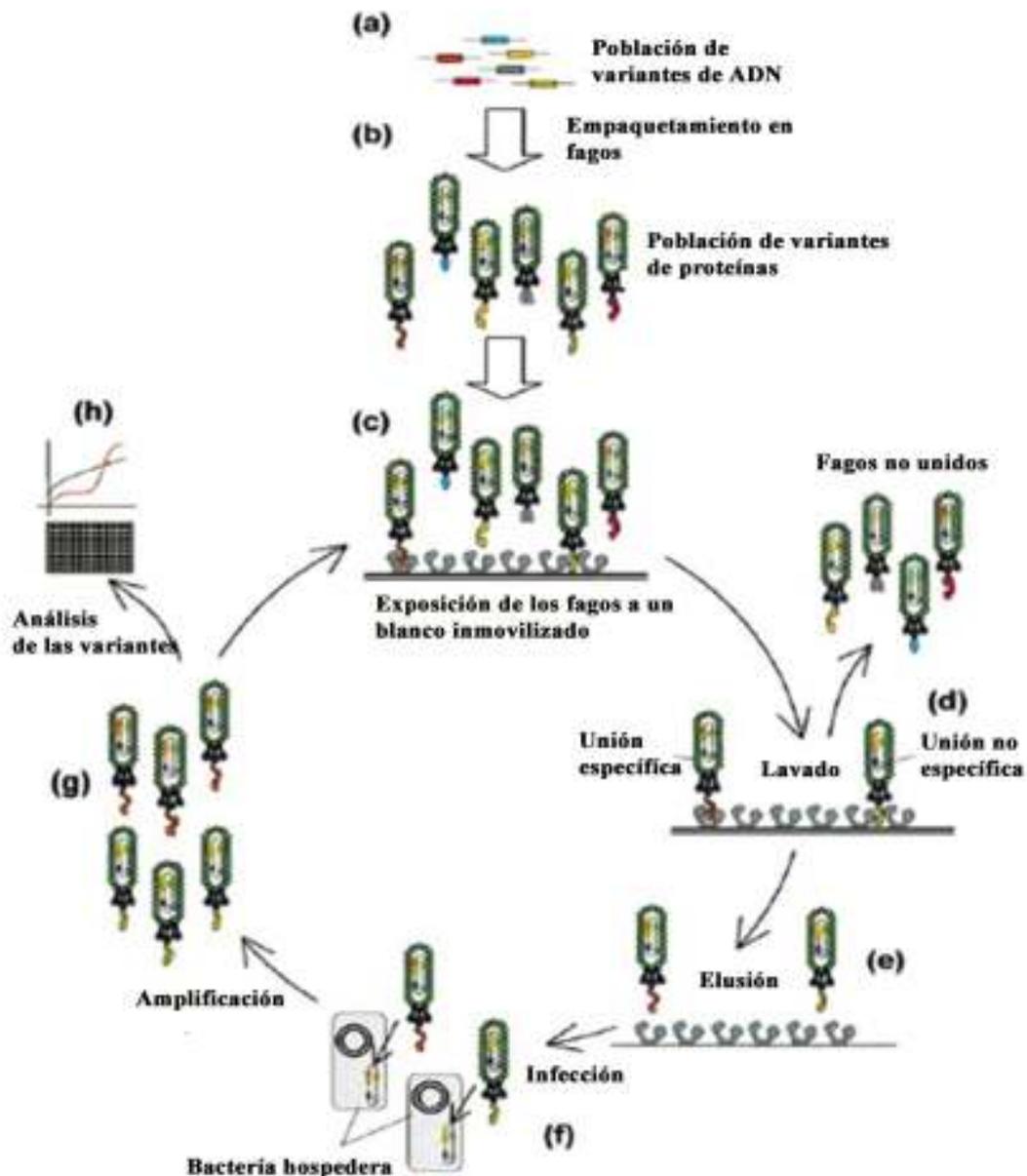


Figura 5. Ciclo de despliegue en fagos. a) Un grupo de variantes de secuencias de ADN que codifican para un anticuerpo completo o fragmento son obtenidas o generadas. b) Se realiza la clonación dentro del genoma del fago o fagémido, fusionados traduccionalmente con el gen de la proteína de interés de la cubierta, para la obtención del banco. c) El banco de fago-anticuerpos es expuesto a un antígeno inmovilizado. d) Los fago-anticuerpos que no presentaron unión o interacciones inespecíficas son lavados. e) Los fago-anticuerpos unidos son eluidos mediante condiciones que rompan la interacción entre el anticuerpo desplegado y el antígeno. f) La población de fago-anticuerpos recuperados son tomados para la infección de bacterias y ser amplificados, a esta primera parte del proceso de selección se le denomina ronda de tamizado. g) Los fago-anticuerpos amplificados forman una segunda población de moléculas específicas contra el antígeno. La ronda de tamizado puede ser repetida para disminuir el número de variantes y obtener un enriquecimiento de las mejores variantes de anticuerpo. h) Posteriormente, un proceso de selección individual (análisis de las variantes aisladas), es necesario para quedarse con los mejores anticuerpos (modificada de William *et al.*, 2002).

Durante los ciclos de tamizados (Fig.5) es posible realizar modificaciones en las condiciones de cada ronda para favorecer la selección de variantes con mejores propiedades, como son estabilidad y/o afinidad.

Después de realizar varios ciclos de tamizado deben realizarse pruebas de evaluación mediante ensayos de reconocimiento al antígeno, para lograr aislar anticuerpos individuales. Si los anticuerpos son específicos contra el antígeno pero no presentan niveles satisfactorios de afinidad y/o estabilidad, se puede recurrir a la evolución dirigida, para madurar el anticuerpo seleccionado.

La importancia de la utilización del despliegue en fagos de fragmentos de anticuerpos se ve avalada por el porcentaje del total de anticuerpos aprobados (80%) por la FDA para uso terapéutico aislados por esta técnica (Nelson *et al.*, 2009).

Evolución Dirigida.

La evolución dirigida es un proceso empleado en la modificación de proteínas, mediante el cual se realizan cambios a nivel de la secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés, generando variabilidad. La población de variantes es sometida a selección mediante el uso de presiones selectivas para aislar aquellas moléculas con mejores características. Para generar variabilidad en una secuencia puede realizarse la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). La EP-PCR (*error prone-PCR*) se basa en modificar las condiciones normales de reacción, con la finalidad de incrementar la tasa mutagénica de la *Taq* polimerasa. Los productos de PCR son clonados en vectores de despliegue y sometidos a procesos de selección, en los que se busca obtener proteínas con mejores propiedades, por ejemplo: la estabilidad y/o afinidad. Estas tecnologías han permitido seleccionar scFv con propiedades mejoradas tales como afinidades fentomolares ($1 \times 10^{-15} \text{M}$), entre otras (Boder *et al.*, 2000).

La evolución dirigida al ser aplicada en anticuerpos puede ser comparable con la respuesta del sistema inmune donde ocurre los procesos de hipermutación somática y selección clonal, previamente descritos.

ANTECEDENTES

Importancia Médica de los anticuerpos: Antivenenos.

Durante el pasado siglo el uso de anticuerpos ha venido creciendo a pasos agigantados en los campos de la investigación, diagnóstico y tratamiento de diferentes padecimientos. Particularmente, el uso de anticuerpos se ha desarrollado ampliamente como tratamiento para el envenenamiento contra la picadura de animales ponzoñosos (antivenenos). En sus comienzos, la preparación de antivenenos involucraba la inmunización de animales con el veneno completo, posteriormente se extraía el suero y era liofilizado para ser utilizado (Chippaux *et al.*, 1998; Theakston *et al.*, 2003; Espino *et al.*, 2009). Esta práctica traía muchos problemas como eran las reacciones secundarias adversas por la presencia de proteínas accesorias en el suero, como la albumina. Para la segunda generación de antivenenos, se realizaba el aislamiento de los anticuerpos y estos eran utilizados para el tratamiento. Sin embargo, seguían apareciendo reacciones secundarias adversas por la aplicación de estos (Chippaux *et al.*, 1998; Theakston *et al.*, 2003; Espino *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, se realizaron investigaciones para encontrar la causa de esta problemática y se observó que las reacciones estaban relacionadas con el fragmento Fc. A partir de ahí surgió la tercera generación de antivenenos, formados por Fab y conocidos como faboterápicos, los cuales son muy utilizados hoy en día (Chippaux *et al.*, 1998; Theakston *et al.*, 2003; Espino *et al.*, 2009). Estos anticuerpos carecen del fragmento Fc pero contienen anticuerpos específicos contra el antígeno con el cual fue inmunizado el organismo así como contra otras moléculas, es por esto que este tipo de sueros son poco específicos. La cuarta generación se enfocó en obtener anticuerpos que reconocieran solo a los componentes más abundantes y tóxicos de los venenos (Espino *et al.*, 2009). No obstante, estos seguían siendo producto de la inmunización de animales. Una de las características principales de la cuarta generación es la construcción de anticuerpos humanizados o quiméricos los cuales contenían andamiajes y el fragmento Fc de humano cuyos detalles se explicaran más adelante, esto con el fin de disminuir las reacciones secundarias (Theakston *et al.*, 2003; Espino *et al.*, 2009). En la quinta generación, que es la más reciente; se trabaja principalmente con fragmentos de anticuerpos como los scFv, debido que contiene los Fv y se pueden derivatizarse en otros formatos. Los anticuerpos son seleccionados por métodos *in vitro* contra antígenos específicos del veneno. En los últimos años se han generado scFvs de origen humano que facilitarían su uso terapéutico. La construcción de los scFvs se realizó a partir de material genético obtenido de sangre humana y mediante técnicas de biología molecular se clonaron y expresaron en bacterias (McCafferty *et al.*, 1990). Debido a que es imposible inmunizar humanos, se utilizan otras

estrategias para generar variantes y seleccionar anticuerpos específicos como las técnicas de despliegue en fagos y evolución dirigida (McCafferty *et al.*, 1990; Riaño *et al.*, 2005). Estas dos últimas generaciones aun no han sido sometidas a pruebas clínicas sin embargo, se encuentran en fases experimentales avanzadas y como propuestas alternativas para el mejoramiento de los antivenenos.

Alacranismo.

El envenenamiento por picadura de alacrán es un problema de salud en las regiones tropicales y subtropicales del mundo debido a la ocurrencia y severidad de los problemas que causan. Las áreas con mayor incidencia son: África, Sur de la India, Medio Oriente, México y Sudamérica (al Este de los Andes). El número de accidentes reportado por año a nivel mundial supera los 1.2 millones (Chippaux *et al.*, 2008). Estos datos son sorprendentes aun cuando no se tienen registros completos. México se encuentra dentro de las tres regiones con mayor número de accidente ocasionados por alacranes a nivel mundial (Chippaux *et al.*, 2008).

En México habitan aproximadamente 134 especies y subespecies de alacranes pero sólo 8 son de importancia médica para el hombre, todas pertenecientes al género *Centruroides* y generalmente son responsables de la mayoría de accidentes (Hoffman C., 1936; Hoffman *et al.*, 1939; Dehesa *et al.*, 1994).

Centruroides noxius es la especie más peligrosa del país, debido a la alta toxicidad de su veneno. Es endémica del estado de Nayarit donde, coincidentemente, se presentan el mayor número de muertes por picadura de alacrán (Celis *et al.*, 2007; Sistema Nacional de Acceso a la Información en Salud, SINAIS).

En México se ha reportado que el número promedio anual de picaduras es de 200,000 (hasta 2007). Así mismo, se tienen reportadas 6247 defunciones hasta el 2008 (70% niños), sin embargo, se cree que hay una subestimación por un factor de 2 ó 3 (Dehesa *et al.*, 1994; Celis *et al.*, 2007). Aunque en los últimos 20 años la mortalidad por picadura de alacrán ha disminuido sigue siendo un problema importante de salud. Los grupos de edades más afectados son los niños y los ancianos (Celis *et al.*, 2007). Aunado, la mayor cantidad de picaduras ocurre en personas menores 15 años durante la noche en el hogar (90%) (Choweel *et al.*, 2005; SINAIS).

El desenlace clínico del envenenamiento por picadura de alacrán depende de múltiples factores, algunos del artrópodo y otros de la víctima. En la mayoría de los casos el tiempo de aparición de los primeros síntomas de intoxicación y el desarrollo de reacciones graves posterior a la picadura puede ser muy corto; en la mayoría de los casos varía entre 5 y 30 minutos (Dehesa *et al.*, 1994; Celis *et al.*, 2007).

Sintomatología.

Los síntomas pueden ser de tipo locales y sistémicos. Los síntomas locales se manifiestan en el lugar de la picadura e incluyen dolor intenso, irritación, hormigueo (prurito), hipersensibilidad (hiperestesia) e inflamación.

Los síntomas sistémicos varían y no tienen una aparición secuencial, pero incluyen taquicardia, náuseas, vómito, prurito en todo el cuerpo, excesiva salivación (sialorrea), pérdida de coordinación motora (ataxia), dificultad respiratoria, irritabilidad, ceguera pasajera, dolor abdominal, convulsiones, coma, alteraciones en la presión arterial (hipertensión o hipotensión), falla cardíaca, fallo circulatorio, paro cardíaco y edema pulmonar, estos últimos son normalmente los causantes de la muerte del individuo.

Uno de los factores que afectan la aparición de estos síntomas es la velocidad de distribución del veneno, la aplicación por vía intravenosa, en ratones, tiene tiempos de diseminación que van de 4 a 7 minutos (Dehesa *et al.*, 1994).

Terapia contra la picadura de alacrán.

Actualmente existen dos tratamientos contra el envenenamiento por picadura de alacrán; los antivenenos y el tratamiento sintomático.

En México existe el antiveneno contra la picadura de alacrán de carácter polivalente para el género *Centruroides*. Este antiveneno es producido por inmunización en caballo con la mezcla de macerado de glándulas venenosas de 4 de las especies más nocivas del país (*C. noxius*, *C. limpidus limpidus*, *C. l. tecomanus*, y *C. suffusus suffusus*). Los anticuerpos son aislados y digeridos, por la proteasa pepsina, para obtener los fragmentos F(ab')₂ y posteriormente liofilizarlos. Este antiveneno es un faboterápico de carácter bivalente.

Existen dos compañías que producen y comercializan el suero. Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México (BIRMEX), que producen el suero antialacrán y el Instituto BIOCLON, que produce Alacramyn™ (Dehesa *et al.*, 1994).

El uso de estos antivenenos es efectivo sin embargo, no se descarta la posibilidad de que su utilización puede ocasionar reacciones secundarias adversas importantes.

Efectos secundarios por el uso de anticuerpos terapéuticos.

La gran limitante del uso de anticuerpos de origen no-humano como terapéuticos son las repercusiones secundarias adversas que estos pueden causar. Debido, a que la presencia de moléculas ajenas al organismo pueden producir reacciones en los individuos desde leves a muy graves. De forma inmediata, existen respuestas adversas como algunos tipos de

hipersensibilidad, con el uso de Alacramyn™ puede presentarse de Tipo I y III. La hipersensibilidad de tipo I se presenta de manera rápida, es producida por respuesta alérgica a los componentes administrados. Este tipo de respuesta se encuentra mediada por la sobre producción de anticuerpos IgE y se caracteriza por ocasionar síntomas como vasodilatación, inflamación, asma y anafilaxia lo cual puede ser fatal (Gell *et al.*, 1963; Abbas *et al.*, 2004; Black *et al.*, 2007). La hipersensibilidad de tipo III se presenta de manera tardía y la aparición de los síntomas puede variar de días hasta semanas. Esta hipersensibilidad se caracteriza por la formación de inmunocomplejos, es decir agregados de anticuerpos IgG e IgM unidos al antígeno, los cuales debido a su gran tamaño no pueden ser eliminados y se depositan en órganos y tejidos como el riñón, hígado, articulaciones y piel. La acumulación de los complejos ocasiona la activación de la respuesta inmune complementaria, atacando a los tejidos y órganos afectados. La respuesta por hipersensibilidad tipo de III causa problemas como la enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide (Gell *et al.*, 1963; Abbas *et al.*, 2004; Black *et al.*, 2007). Aunque estos fenómenos se presentan en baja proporción no dejan de ser un punto de crucial importancia para la utilización de anticuerpos terapéuticos

Los fenómenos de hipersensibilidad están relacionados con la **inmunogenicidad** que presentan los anticuerpos terapéuticos que no son de origen humano. Es decir, la respuestas del sistema inmunológico contra los anticuerpos de uso terapéutico no-humanos, mediante la producción de anticuerpos anti-anticuerpos terapéuticos.

En los últimos 20 años los esfuerzos se han enfocado en mimetizar la estructura de los anticuerpos no-humanos para evitar las reacciones secundarias adversas. Por un lado mediante la quimerización, que es la suplantación de los dominios V del anticuerpo de origen no-humano a un andamiaje de anticuerpo humano. Otra alternativa, es la humanización en la cual se trasplantan solo los CDR no-humanos en un andamiaje humano. Sin embargo, los anticuerpos quiméricos o humanizados no siempre mantienen el reconocimiento o afinidad de los anticuerpos originales (Chames *et al.*, 2009).

En la actualidad una de las principales fuentes de obtención de anticuerpos son los ratones (murinos). Los anticuerpos murinos son muy útiles para la investigación y diagnóstico, sin embargo, para el uso terapéutico en humanos no son los más ideales. Debido a que favorecen la activación de la respuesta inmune, produciendo anticuerpos anti-anticuerpos murinos (HAMA por sus siglas en ingles *human anti-murine antibody*) limitando su utilización como terapéutico, es decir su funcionalidad puede llegar a ser afectada por la respuesta inmune del individuo u ocasionar reacciones adversas que pueden ser fatales como las ya mencionadas (He *et al.*, 2002; Selisko *et al.*, 2004; Hudson y Souriau, 2003).

Aun cuando existen modificaciones en los anticuerpos murinos como la quimerización o la humanización la respuesta inmunogénica no siempre es abatida. Hwang y Foote (2005) observaron la aparición de la respuesta HAMA, la respuesta anti-anticuerpos quiméricos (HACA, por sus siglas en inglés *human anti-chimeric antibody*) y la respuesta anti-anticuerpos humanizados (HAHA, por sus siglas en inglés *human anti-humanized antibody*) en pacientes tratados con anticuerpos terapéuticos con estas características. Los autores reportaron que existe una disminución significativa de la inmunogenicidad al usar anticuerpos humanizados; sin embargo, pueden presentarse problemas leves asociados a hipersensibilidad.

Swann y colaboradores (2008) mostraron resultados similares a los autores anteriores e hicieron dos grandes aportaciones en su trabajo, una de ellas fue la introducción a su estudio de fragmentos de anticuerpos, Fab y scFv, aunque de origen murino. La utilización de estos fragmentos de anticuerpos mostró una disminución de alrededor del 80% en la inmunogenicidad en comparación a anticuerpos completos murinos, pero la inmunogenicidad sigue siendo significativa. La segunda aportación fue la observación de los efectos causados por el uso de anticuerpos humanos en el cual la disminución de la inmunogenicidad es notable, alrededor del 96%, en relación a la respuesta HAMA. Por lo tanto el uso terapéutico de anticuerpos de origen no-humano requiere de mayores modificaciones para ser de uso confiable. Estos estudios nos hablan sobre el rumbo que se debe de tomar para la generación de futuros inmunoterapéuticos. Gracias a las nuevas tecnologías es posible la obtención de anticuerpos de origen humano los cuales se pueden manipular para obtener diferentes formatos. Actualmente los antivenenos comerciales utilizados contra la picadura de alacrán, son obtenidos de caballo y los efectos secundarios como la inmunogenicidad puede ser similares a los observados por el uso de anticuerpos de origen murino (Hwang y Foote, 2005; Swann *et al.*, 2008).

Cn2 y 6009F

El veneno de los alacranes es una mezcla compleja de componentes en su mayoría poli-péptidos neurotóxicos. Estas neurotoxinas afectan la actividad de los canales celulares excitables y no excitables del sistema nervioso. El efecto de las toxinas es bloquear algunas funciones fisiológicas vitales lo cual puede dar resultados fatales.

La toxina denominada Cn2 fue aislada a partir del veneno total del alacrán *C. noxius* y es el componente más abundante (6.8% del veneno total) y peligroso para los mamíferos, entre ellos el hombre. Cn2 es una β -toxina que actúa sobre los canales de sodio y cuya estructura es similar a otras toxinas caracterizadas de alacrán. Está conformada por tres hebras- β y una hélice- α , adicionalmente presenta 4 puentes disulfuro que la hacen muy estable (Pintar *et al.*, 1999).

En los grupos de investigación del Dr. Becerril y del Dr. Possani (IBT, UNAM) se demostró que al neutralizar la toxina Cn2 es posible abatir la toxicidad del veneno total del alacrán *C. noxius*. En una primera etapa se buscó un anticuerpo que lograra cumplir con este objetivo, obteniendo el anticuerpo denominado BCF2 de origen murino (Pintar *et al.*, 1999; Licea *et al.*, 1996; Selisko *et al.*, 2004). Sin embargo, el gran avance se dio con la generación de un scFv de origen humano, el cual se aisló a partir de un banco de scFvs humanos desplegados en fagos. El aislamiento se hizo mediante 4 rondas de tamizando de un banco de fago-anticuerpos humanos, al finalizar estas rondas se encontraron dos variantes, denominadas C1 y 3F que reconocen a la toxina Cn2 específicamente, pero con baja afinidad. El anticuerpo 3F, fue mejorado mediante 3 ciclos de maduración *in vitro*, utilizando la evolución dirigida. La mejor variante aislada mostró tener la capacidad de neutralizar a la toxina Cn2 y al veneno total del alacrán *C. noxius* sin la aparición de síntomas visibles, además de tener una alta afinidad (410pM). Al scFv se le denominó 6009F (Riaño *et al.*, 2005). Es importante recordar que el scFv 6009F es de origen humano, por lo que es poco probable que su aplicación terapéutica desencadene reacciones adversas. Estudios más recientes muestran que el anticuerpo 6009F tiene la capacidad de neutralizar 2 Dosis Letales medias (DL₅₀) del veneno total, en pruebas de rescate, es decir, cuando se aplica el anticuerpo de 7 a 10 minutos posteriores a la administración del veneno; es notorio la disminución de los síntomas y la supervivencia de los individuos (comunicación personal Dra. Riaño L.).

JUSTIFICACIÓN

La capacidad neutralizante de los scFv, los hacen buenos prospectos para su uso como antivenenos sin embargo, presentan una rápida eliminación y degradación en el organismo comparadas con los Fab o anticuerpos completos. Lo que nos hace considerar el empleo de otros formatos con un tamaño intermedio entre los scFv y Fab, como las formas dimericas de scFvs. Por las características ya mencionadas enfatizamos que un anticuerpo ideal como tratamiento contra el envenenamiento por la picadura de alacrán, debe tener: a) una rápida, homogénea penetración y distribución, esto por la rápida distribución del veneno de alacrán, b) bajo tiempo de retención en los tejidos que no son blancos, c) rápida eliminación de la sangre, d) alta estabilidad en condiciones fisiológicas y e) alta afinidad. Los parámetros mencionados pueden ser cumplidos por las moléculas dimericas de scFvs, así mismo, se han realizado construcciones de scFv divalentes de las cuales se ha observado un aumento en la afinidad, mejor estabilidad y una mayor capacidad neutralizante en comparación a los monómeros (Huston *et al.*, 1991; Holliger *et al.*, 1993; Brüsselbach *et al.*, 1999; Kipriyanov *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Tahtis *et al.*, 2001; Völkel *et al.*, 2001; Goel *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Aubrey *et al.*, 2003). Específicamente, se han observado mejoras importantes en estabilidad y afinidad en dímeros de scFv con péptidos conectores de 5 residuos (Holliger *et al.*, 1993; Völkel *et al.*, 2001).

En el laboratorio del Dr. Becerril se realizó la construcción de la molécula dimerica, del scFv 6009F, disminuyendo la longitud del péptido conector a 5 residuos de aminoácidos (Gly₄-Ser) (Dra. L. Riaño, datos no publicados) (Fig. 2). Los ensayos de protección en ratones muestran que su capacidad neutralizante no es la adecuada, debido a que en las pruebas se observan síntomas de intoxicación en los ratones. Los síntomas aparecen 4 horas después de la aplicación, aunque todos los animales sobreviven (ver Tabla IV). Este comportamiento contrasta con la forma monomérica del scFv 6009F con el cual no se observan síntomas. Aun cuando se ha reportado que las moléculas dimericas de anticuerpos suelen presentar un mejor comportamiento que las monoméricas, en este caso no fue así. Adicionalmente, se ha observado en pruebas de neutralización que anticuerpos con baja estabilidad pueden ocasionar la aparición de síntomas de intoxicaciones más severos al mediano plazo (comunicación personal, Dra. L. Riaño). La disminución en la capacidad neutralizante del dímero 6009F puede deberse a que el recorte del conector generó una molécula con problemas de estabilidad funcional. Debido a que en pruebas de reconocimiento el dímero muestra un comportamiento similar al monómero 6009F.

La generación de dímeros de scFv se considera una buena alternativa para mejorar las propiedades de los anticuerpos. Sin embargo, no ocurre en todos los casos como el scFv 6009F dimérico. En este trabajo se buscó, primordialmente, mejorar las propiedades neutralizantes del dímero 6009F mediante las metodologías descritas; evolución dirigida y despliegue en fagos.

HIPÓTESIS

A través de evolución dirigida y despliegue en fagos es posible generar y aislar una variante del dímero 6009F que mejore sus propiedades neutralizantes contra la toxina Cn2 y el veneno total de *C. noxius*.

OBJETIVO GENERAL

Aislar una variante del dímero scFv 6009F que tenga un mejor comportamiento neutralizante contra la toxina Cn2 por medio de evolución dirigida y despliegue en fagos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Someter a evolución dirigida el dímero scFv 6009F; creando bancos mutagénicos.
- Someter a diferentes presiones selectivas a los bancos mutagénicos mediante condiciones desnaturalizantes en presencia de la toxina Cn2.
- Caracterizar las variantes seleccionadas de la siguiente manera:
 - Secuencia
 - Reconocimiento
 - Neutralización
 - Estabilidad

METODOLOGIA

Materiales. La cepa utilizada para este trabajo fue *Escherichia coli* TG1 [F'*traD36 proAB lacI_qZAM15*]. Esta cepa es la más recomendable para la técnica de despliegue en fagos. El plásmido *Psyn2* (Ap^r) se utilizó para el despliegue en fagos de los anticuerpos diméricos. Así mismo, el plásmido *Psyn1* se usó para expresión de las proteínas. A menos que se mencione otra cosa *E. coli* se cultivó en medio YT2X (NaCl 171mM, Extracto de levadura 10g/L, Bacto-triptona 16g/L) líquido suplementado con Ampicilina (Ap; 200 µg/ml) y glucosa (2%). En algunas ocasiones el medio fue complementado con Kanamicina (Kn; 50 µg/ml). A menos que se indique otra cosa, los cultivos líquidos se incubaron en condiciones aeróbicas (con agitación a 250rpm) a 37°C. Para el protocolo de despliegue en fagos, así como para lavados y como disolvente de los anticuerpos se utilizó solución salina amortiguada por fosfatos (PBS); (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 7.4mM). En algunos lavados el PBS se complementó con detergente *Tween* (laurato de sorbitan POE20; 0.1%). Para la recuperación de los fago-anticuerpos por precipitación se utilizó la mezcla de polietilenglicol 8000 (PEG 40%) con NaCl (2M).

Para la selección y evaluación se realizó la inmovilización de la toxina Cn2 tanto en los inmuntubos como en placas de ELISA mediante la dilución previa de la toxina en solución de carbonatos (50mM Na₂CO₃ pH9). A una concentración definida (tablas II y III) se colocó la toxina Cn2 en los inmuntubos o en cada pozo de la placa de ELISA y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS-*Tween* y se añadió agente bloqueador (1% BSA, leche o gelatina en PBS), y se incubó por 2 horas a 37°C. Todos los químicos se obtuvieron de J.T Baker, Sigma-Aldrich o Merck.

Construcción del banco mutagénico. La generación de sustituciones a lo largo de la secuencia nucleotídica del dímero 6009F se logró mediante EP-PCR con base en los protocolos de Lueng *et al.* (1989) y Cadwell *et al.* (1992). Mediante estos protocolos es posible manejar diferentes tasas de error (mayor al 1%) de la *Taq* polimerasa.

Se utilizaron tres tipos de reacciones para la obtención de alta, media y baja tasa de mutaciones bajo las siguientes condiciones (Tabla I).

TABLA I
Condiciones de reacción para la EP-PCR.

Tasa mutagénica	Alta	Media	Baja
Agua	23 μ l	34 μ l	39 μ l
Buffer polimerasa (10X)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
*dNTPs desbalanceados	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Oligo directo (10pM)	4 μ l	4 μ l	4 μ l
Oligo reverso (10pM)	4 μ l	4 μ l	4 μ l
MgCl ₂ (25mM)	28 μ l	28 μ l	28 μ l
β -mercaptoetanol (1M)	1 μ l	--	--
DMSO	10 μ l	--	--
**ADN templado	1 μ l	1 μ l	1 μ l
MnCl ₂ (1M)	5 μ l	5 μ l	--
Taq polimerasa	4U (4 μ l)	4U (4 μ l)	4U (4 μ l)
Volumen final	100 μ l	100 μ l	100 μ l

*dNTPs desbalanceados: dGTP (2mM), dATP (2mM), dCTP (10mM) y dTTP (10mM).

**Como templado se utilizó el ADN correspondientes al dímero scFv 6009F.

Las reacciones de amplificación se realizaron bajo los siguientes parámetros: 1 ciclo inicial de desnaturalización, a 95°C por 5 min; 30 ciclos de amplificación (95°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min); 1 ciclo terminal de extensión, a 72°C por 10 min.

Los productos de EP-PCR se purificaron de geles de agarosa al 1% y digeridos con las enzimas *SfiI* y *NotI* (New England Biolabs, Beverly MA, USA). El producto de la digestión se ligó al vector de despliegue *Psyn2* cortado con las mismas enzimas. Los bancos se utilizaron para transformar células de la cepa TG1 por electroporación. Se realizaron diluciones 1:100 y sembraron en medio sólido YT2X-ampicilina-glucosa para determinar el tamaño del banco. También se tomaron 10 colonias al azar de cada banco a las cuales se les purificó el plásmido (Kit Roche) y se secuenciaron para realizar la estimación de la tasa mutagénica. La secuenciación de ADN se llevó a cabo en la unidad de secuencia del IBT, UNAM con un secuenciador ABI Prism 3700 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer).

Despliegue del banco de anticuerpos en fagos. El proceso de despliegue en fagos de los bancos se realizó en dos etapas. La primera etapa implicó el crecimiento y despliegue de los anticuerpos en la superficie de los fagos. La segunda etapa radicó en la recuperación de las moléculas virales (fago-anticuerpos).

Para la amplificación y despliegue de los anticuerpos se inocularon los bancos en 15 ml de medio YT2X-ampicilina-glucosa e incubaron con agitación constante hasta tener un crecimiento bacteriano con una $DO_{600nm}=0.7-1$. Se adicionó el fago ayudador (*helper*) en una relación de 20:1

fagos:bacterias e incubó sin agitación por 30 min, posteriormente 30 min con agitación. Los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm (rotor JA-20, Beckman) por 15 min a 4°C. Se resuspendió el botón celular en medio YT2X- kanamicina-ampicilina, en un volumen final de 50 ml en un matraz de 250 ml. Se incubó a 37°C por 30 min en agitación continua y posteriormente a 30°C en agitación continua toda la noche.

La segunda etapa de recuperación de los fago-anticuerpos se realizó mediante la centrifugación de los cultivos a 4000 rpm (rotor JA-20, Beckman) por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionó 5 ml de mezcla PEG-NaCl por cada 25ml de sobrenadante e incubaron durante 15 min en hielo. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm (rotor JA-20, Beckman) por 20 min a 4°C. Se resuspendió el botón celular en 20 ml PBS estéril y 4 ml de PEG-NaCl la mezcla se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 6000 rpm (rotor JA-20, Beckman) por 20 min a 4°C y se desecho el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 2.5 ml de PBS y centrifugo a 13,000 rpm (rotor 16F6-38, Eppendorf). El sobrenadante se filtró por membrana de 0.45 µm para ser utilizado o almacenado a 4°C.

Posteriormente, se realizó la titulación de las poblaciones mediante diluciones seriales e infección de células TG1. Se sembraron 100 µl en cajas de medio sólido YT2X-ampicilina-glucosa. Las cajas se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se contaron las colonias y calcularon los títulos de fago-anticuerpos.

Selección de variantes del dímero 6009F. Para el aislamiento de variantes de anticuerpos se siguió el protocolo de selección descrito por Marks (1991). Utilizando pre-tratamientos de los fago-anticuerpos en presencia de agentes desnaturizantes como: cloruro de guanidinio (GdnHCl) y altas temperaturas, los detalles se resumen en las tablas II y III.

Se colocó 1 ml de toxina Cn2 en los inmunotubos en diferentes concentraciones (ver tabla II y III). Se realizaron dos procesos de selección independientes en diferentes condiciones de pre-incubación (Tabla II y III). En el primer proceso se hicieron 5 rondas de tamizado y mientras en el segundo proceso se realizaron 2 rondas de tamizado. La figura 6 muestra el resumen del protocolo general que se realizó para las rondas de tamizado.

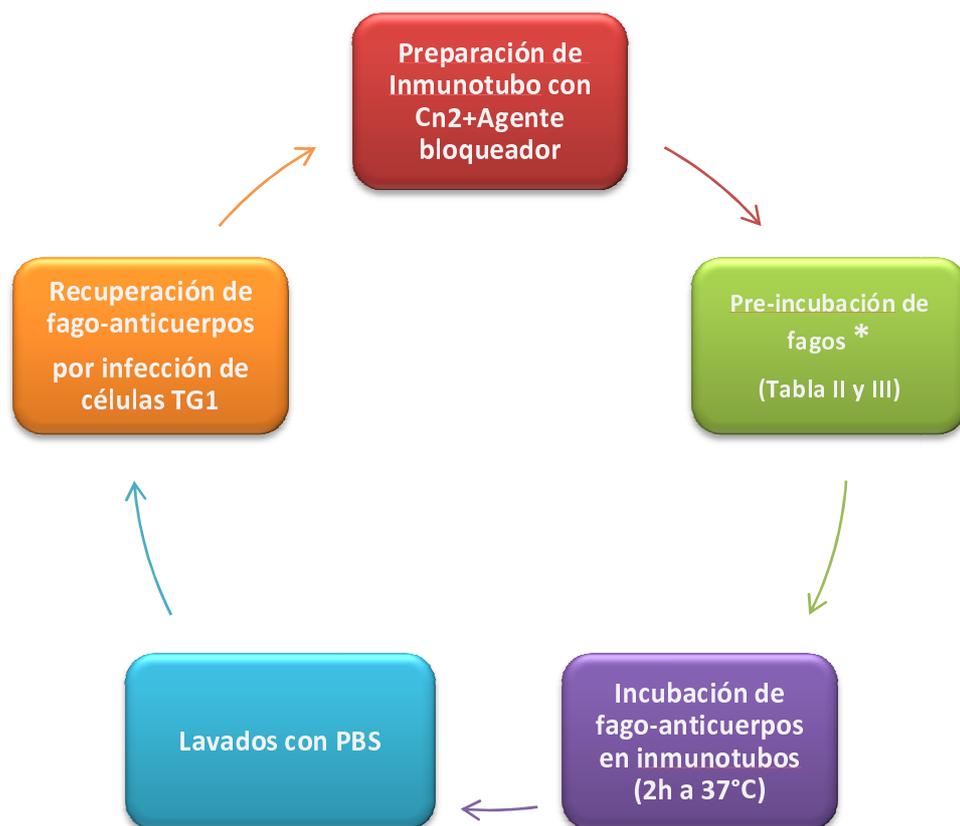


Figura 6. Protocolo para cada ronda de tamizado. El diagrama que describe el protocolo general que se utilizó para selección de variantes del dímero 6009F. Cada uno de estos ciclos lo denominamos ronda de tamizado.

*Los detalles de cada ronda de tamizado se muestra en las tablas II y III.

***TABLA II**

Condiciones usadas para cada ronda de tamizado durante el primer proceso de selección.

Ronda tamizado	de	[Cn2] (ng/ml)	Pre-tratamiento de fago-anticuerpos		
			Temp. (°C)	[GdnHCl] (M)	Tiempo (h)
1 ^a		1000	-----	-----	1
2 ^a		500	40	2	1
			50	---	1
3 ^a		50	40	4	0.5
			50	---	1
4 ^a		5	40	5	0.5
			45	5	0.5
			50	5	0.5
			60	--	1
			70	--	1
5 ^a +		1	50	5	1
			60	--	0.5

***TABLA III**

Condiciones usadas para cada ronda de tamizado durante el segundo proceso de selección.

Ronda de tamizado	[Cn2] (ng/ml)	Pre-tratamiento de fago-anticuerpos	
		Temp. (°C)	Tiempo (h)
1 ^a ⁺	500	-----	1
2 ^a ⁺	50	60	0.5

Las tablas muestran las rondas de tamizado que se realizaron en cada proceso de selección. En un primer proceso se realizaron 5 rondas de tamizado, mientras que en el segundo proceso se hicieron 2 rondas (pre-tratamiento solo con temperatura). Así mismo, se muestran las particularidades de cada ronda de tamizado como: concentración de Cn2 inmovilizada, temperatura, concentración de GdnHCl y tiempo de pre-incubación. El procedimiento de cada ronda de tamizado se muestra en la figura 6.

⁺Lavado con TEA

Posterior al tiempo de incubación de los inmunotubos con los fago-anticuerpos fueron lavados en 20 ocasiones con PBS-*Tween* y 20 repeticiones más con PBS. En algunos casos se realizaron lavados con trietilamina 0.1M (TEA)⁺, por triplicado en un tiempo no mayor a 10 minutos, seguido de lavados con PBS .

Para la recuperación o elución de los fago-anticuerpos que mantuvieron reconocimiento por la toxina se agregó 1ml de cultivo de células TG1 ($DO_{600nm}=0.7$). Para permitir la infección, el inmunotubo se incubó a 37°C sin agitación por 30 min y posteriormente a 37°C con agitación por 30 min. Las células se sembraron en medio sólido YT2X-Ampicilina-glucosa e incubaron toda la noche. Al día siguiente, se cosecharon las células para amplificar, recuperar y titular fago-anticuerpos siguiendo los protocolos antes mencionados. Los fago-anticuerpos recuperados fueron sometidos a una nueva ronda de tamizado. En un primer proceso de selección se realizaron 5 rondas de tamizado (Tabla II), mientras en el segundo proceso se realizaron 2 rondas (Tabla III).

Al finalizar las rondas de tamizado se tomaron colonias para expresar proteína en placa de cultivo de 96 pozos. Se utilizaron los anticuerpos solubles para realizar pruebas de reconocimiento del anticuerpo contra la toxina Cn2 por medio de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Expresión de anticuerpos en placas de 96 pozos. Se realizó la expresión de proteína soluble en placa de cultivo de 96 pozos (Constar, Corning NY, USA). Se inocularon colonias aisladas en pozos con 150µl de medio líquido YT2X-ampicilina-glucosa. Las placas se incubaron en agitación por 3 horas. Posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm (rotor 1645, Hettich) por 15 min. El botón celular fue resuspendido en 150µl de medio YT2X-ampicilina-isopropil-β-D-1-tiogalactósido (IPTG 1mM). Las placas se incubaron a 30°C en agitación continua durante toda la noche. Al día siguiente las placas fueron centrifugadas a 3500 rpm (rotor 1645, Hettich) por 15 min y se tomaron 100 µl de sobrenadante para pruebas de ELISA.

Pruebas de ELISA. Con la finalidad de aislar clonas positivas se realizaron pruebas de reconocimiento por ELISA indirecta. Se inmovilizó la toxina Cn2 (1.5µg/ml) en placas de ELISA de 96 pozos (Corning NY, USA).

Las pruebas de ELISA se realizaron con el anticuerpo soluble proveniente del sobrenadante o purificado en solución PBS. Se colocó un volumen de 100µl por pozo de anticuerpo (1.5µg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora. Se realizaron 3 lavados con PBS-*Tween*. Posteriormente, se colocaron 100µl por pozo de anticuerpo anti-*Cmyc* en una relación 1:2000 y se incubaron a 37°C por 1 hora. El anticuerpo de ratón anti-*Cmyc* tiene la capacidad de reconocer una secuencia marcadora específica (*Cmyc*) presente en los anticuerpos. Es decir, este anticuerpo se unirá a los anticuerpos que mantuvieron unión con la toxina Cn2 presente en la placa. Se repitieron 3 lavados con PBS-*Tween* y fueron colocados 100µl por pozo del segundo anticuerpo, cabra anti-ratón, y se incubó a 37°C por 1 hora. El reconocimiento de esta molécula es específico contra el anticuerpo anti-*Cmyc*. Posteriormente se repitieron los lavados para remover el pegado inespecífico. El anticuerpo de cabra anti-ratón se encuentra acoplado a la enzima peroxidasa, cuya reacción con el sustrato provoca una coloración que nos ayudará al seguimiento del reconocimiento. Gracias a esto, se observará coloración en los pozos cuyo primer anticuerpo haya mantenido reconocimiento por la toxina Cn2 inmovilizada en la placa. El revelado se realizó añadiendo 100µl del reactivo colorante el cual contiene al sustrato, (100mM NaHPO₄ pH5, H₂O₂ 6%, o-fenildiamina 8.1µM) y se incubó por 10 min. La reacción se detuvo con HCl (6N) y se determinó la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 492nm.

A partir de las clonas con señal positiva de reconocimiento se extrajeron los plásmidos para obtener la secuencia de los fragmentos de anticuerpos. Las variantes importantes se subclonaron en el vector de expresión *Psyn1* y se transformaron en células de la cepa TG1 por electroporación.

Expresión y purificación de los fragmentos de anticuerpo. El procedimiento de obtención de anticuerpo se realizó con células recién crecidas. Los subsiguientes pasos de expresión y purificación se realizaron basados en el protocolo descrito por Riaño *et al.* (2005).

Pruebas de estabilidad mediante ELISA. Para hacer una estimación de la estabilidad funcional se hicieron experimentos de reconocimiento por pruebas de ELISA. Se realizaron dos ensayos; el primero se realizó sometiendo a los anticuerpos (1.5µg/ml) a pre-incubación a diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio (GdnHCl; 1-3M) y su posterior colocación en la placa sin quitar o disminuir la cantidad agente desnaturizante.

La segunda prueba se realizó sometiendo a diferentes temperaturas a los scFv diméricos por 1 hora previo a la colocación en la placa. Los siguientes pasos del procedimiento se siguieron conforme al protocolo ya descrito.

Pruebas de Neutralización. Se realizaron las pruebas de neutralización en ratones CD1 (hembras de 4 semanas de edad). Se inyectó 1 ó 2 Dosis Letales medias (DL₅₀) de la toxina Cn2. La cantidad equivalente a 1DL₅₀ de Cn2 es de 0.25µg por cada 20 g de peso del ratón de la cepa CD1. Así mismo, se utilizaron 1 ó 2 DL₅₀ del veneno total de *C. noxius*. La cantidad equivalente a 1DL₅₀ de veneno es de 2.5µg por cada 20 g de peso de ratón de la cepa CD1.

Los grupos controles fueron tratados solo con la toxina o el veneno. En los grupos experimentales se realizó la mezcla de la toxina o el veneno con el anticuerpo en una relación molar 1:5; toxina:anticuerpo y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente, se hizo la inyección en los ratones intraperitoneal y fueron observados por 48 horas.

RESULTADOS

Neutralización del dímero 6009F

Existe evidencia que muestra que las formas diméricas de los scFv pueden tener más eficiencia funcional (mayor afinidad y estabilidad) que las formas monoméricas (Huston *et al.*, 1991; Holliger *et al.*, 1993; Brüsselbach *et al.*, 1999; Kipriyanov *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Tahtis *et al.*, 2001; Völkel *et al.*, 2001; Aubrey *et al.*, 2003; Kotermann *et al.*, 2003). Debido a esto, la forma dimérica del scFv 6009F fue construida previamente en el laboratorio por la Dra. Lidia Riaño (datos no publicados). Contrario a lo esperado, esta forma dimérica mostró ser menos funcional que la forma monomérica.

La primera parte de este trabajo fue confirmar la secuencia esperada del scFv 6009F presente en el vector *Psyn1*. A través de la secuencia se confirmó que la construcción del scFv 6009F dimérica correspondía a la secuencia nucleotídica del monómero 6009F pero con el péptido conector de 5 residuos de aminoácidos. El ADN de la construcción dimérica se utilizó para transformar células TG1 y posteriormente expresar el anticuerpo dimérico.

La proteína recuperada se empleó en pruebas de neutralización contra la toxina Cn2. Con estas pruebas se buscó observar la capacidad protectora del dímero 6009F y compararlo con la capacidad neutralizante reportada para el monómero 6009F (Riaño *et al.*, 2005). La tabla IV muestra las condiciones y resultados del comportamiento protector solo del dímero 6009F contra la toxina Cn2, en dos diferentes temperaturas de incubación.

TABLA IV
Pruebas de neutralización del dímero 6009F contra Cn2.

Temp. de Incubación		Toxina Cn2	Relación molar Cn2:anticuerpo	Sobrevivencia/total ratones	Síntomas
Ambiente	Control	1DL ₅₀	1:0	3/8	SI
	Dímero 6009F	1DL ₅₀	1:5	8/8	SI
37°C	Control	1DL ₅₀	1:0	3/5	SI
	Dímero 6009F	1DL ₅₀	1:5	5/5	SI

Se muestran los detalles de la prueba de neutralización de la toxina Cn2 utilizando el dímero 6009F.

La relación molar usada 1:5 (toxina:anticuerpo) es equivalente a la reportada para pruebas de neutralización con la forma monomérica 6009F 1:10 (Riaño *et al.*, 2005). La equivalencia se debe a que la molécula es dimérica y contiene dos sitios de unión al antígeno.

Los ratones del grupo control (solo con toxina Cn2) presentaron síntomas de intoxicación severos después de 15 minutos de la administración de la toxina, la muerte de los individuos se presentó en un periodo no mayor a las 4 horas. Algunos de los síntomas de intoxicación observados durante la prueba fueron: salivación excesiva, pérdida de coordinación motora, dificultad respiratoria, irritabilidad, cambio en la coloración de los ojos y la cola. Los síntomas mencionados son característicos de intoxicación con la toxina Cn2. Los individuos que no mueren presentan los síntomas descritos durante un periodo de 7 horas, después de lo cual comienza una recuperación de los animales.

En el grupo protegido, al que se le aplicó la mezcla toxina:anticuerpo dimérico presentó síntomas leves como: irritabilidad y leve ataxia en las primeras 3 horas después la aplicación y alrededor de las 4 a 6 horas se presentaron algunos síntomas más severos, como pérdida total de coordinación motora y dificultad respiratoria sin llegar a la muerte. Al día siguiente los individuos presentaron parálisis parcial en las patas posteriores y al cabo de 24 horas se recuperaron totalmente.

Los resultados mostraron que el dímero 6009F protegió a los animales debido a que se presenta la sobrevivencia del 100%, sin embargo no es capaz de neutralizar completamente ya que se observan síntomas de intoxicación.

Debido a que en pruebas de reconocimiento por la toxina Cn2 el dímero scFv 6009F mantiene el mismo comportamiento que el monómero, la explicación posible a la falta de capacidad neutralizante puede radicar en que la forma dimérica bajo condiciones fisiológicas pierde parcialmente su actividad por la pérdida de la estabilidad funcional. Es decir, es probable que no tenga la capacidad de mantener su conformación dimérica necesaria para la permanencia de los sitios de reconocimiento y por ende conseguir la neutralización completa de la toxina. Lo cual ocasiona que una parte de las moléculas de la toxina Cn2 lleguen a sus blancos generando los síntomas descritos a partir de las 4 horas posteriores a la aplicación. Es por esto que se recurrió a la evolución dirigida del dímero 6009F con la finalidad de mejorar sus propiedades neutralizantes.

Banco de variantes del scFv 6009F dimérico.

Se aisló ADN correspondiente al dímero scFv 6009F, a partir del cual se construyeron 3 bancos mutagénicos por medio de EP-PCR con la finalidad de introducir cambios a nivel de secuencia

del dímero 6009F (Fig.7). Cada banco estaba conformado por una mezcla, en proporciones no definidas de productos de PCR de alta, media y baja tasa mutagénica. Los tamaños de los bancos fueron de 5×10^6 , 3.4×10^7 y 2×10^6 transformantes, la tasa mutagénica promedio estimada fue de 0.17%.

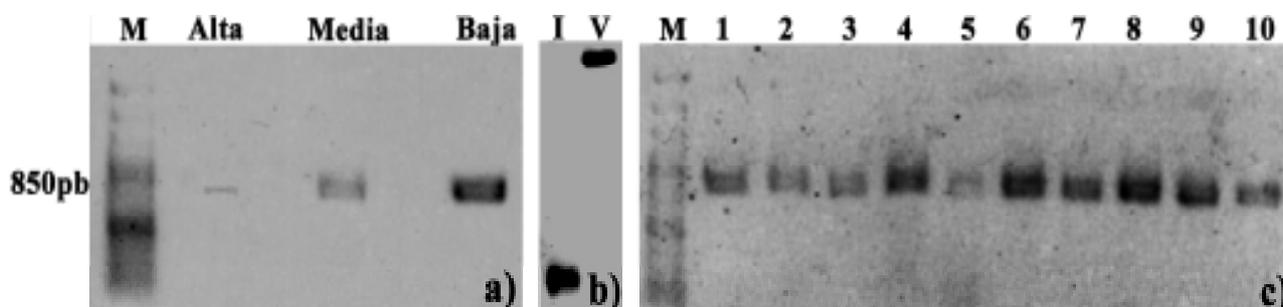


Figura 7. Geles de agarosa con los productos de la EP-PCR. a) En orden de izq. a der. Marcador de peso (M), producto de PCR de tasa alta, media y baja mutaciones. **b)** Producto de doble digestión de los productos de EP-PCR (I) y el vector de despliegue *Psyn2* (V). **c)** Producto de PCR de colonias tomadas al azar (1-10) para observar si la clonación se dio de manera correcta, las bandas corresponden al tamaño del inserto (850pb) esperado.

Los bancos de variantes del dímero fueron desplegados en fagos y sometidos a 2 procesos de selección, en los cuales se realizaron rondas de tamizados bajo condiciones desnaturalizantes con la finalidad de encontrar una variante con mejor estabilidad que el dímero 6009F (ver tabla II y III, metodología). Específicamente, los fago-anticuerpos se sometieron a diferentes temperaturas y concentraciones de GdnHCl para comprometer la viabilidad de los anticuerpos y seleccionar poblaciones con mayor estabilidad que el parental. Los resultados de las poblaciones obtenidas del primer y segundo proceso de selección se muestran en la tabla V y VI respectivamente.

TABLA V.
Títulos obtenidos durante el primer proceso de selección

Ronda de tamizado	Pre-tratamiento con Temperatura	Salida(Ø/ml)	Pre-tratamiento con GdnHCl + Temperatura	
	Entrada(Ø/ml)		Entrada (Ø/ml)	Salida (Ø/ml)
1 ^a	5.4×10^{12}	800,000	-----	-----
2 ^a	3×10^{13}	1×10^6	3×10^{13}	500,000
3 ^a	3×10^{13}	1.3×10^7	6×10^{13}	8.4×10^7
4 ^a	$60^\circ\text{C } 9 \times 10^{13}$ $70^\circ\text{C } 9 \times 10^{13}$	$60^\circ\text{C } 1.4 \times 10^8$ $70^\circ\text{C } 0$	2.2×10^{13}	$40^\circ\text{C } 2 \times 10^7$ $45^\circ\text{C } 1.3 \times 10^7$ $50^\circ\text{C } 3 \times 10^6$
5 ^a	5.6×10^{13}	1×10^8	2.2×10^{13}	2.8×10^6

Se muestran los títulos de fago-anticuerpos (Ø/ml) que fueron sometidos a tamizado (entrada) y los que se recuperaron (salida). La columna de temperatura corresponde a los fago-anticuerpos que fueron sometidos a pre-tratamiento con esta, el mismo caso se presenta en las columnas de GdnHCl + Temperatura los detalles se pueden ver en las tablas II y III (metodología). En algunas ocasiones, se realizaron lavados con TEA.

TABLA VI**Títulos obtenidos durante el segundo proceso de selección**

Ronda de tamizado		
	Entrada (Ø/ml)	Salida (Ø/ml)
1^a	2.8×10^{13}	100,000
	Pre-tratamiento	Temperatura (60°C)
2^a	4.9×10^{12}	5×10^6

Se muestran los títulos de fago-anticuerpos (Ø/ml) que fueron sometidos a tamizado (entrada) y los que se recuperaron (salida). En algunas ocasiones, se realizaron lavados con TEA (Ver tabla II y III, metodología).

Los datos mostrados en las tablas V y VI nos permiten dar un seguimiento de las poblaciones, con esto podemos saber si bajo las condiciones establecidas durante cada ronda de tamizado las poblaciones de fago-anticuerpos mantienen la capacidad de interaccionar con la toxina Cn2.

Evaluación de variantes

Se tomaron colonias al azar y se expresaron anticuerpos en placas de 96 pozos, el sobrenadante que contiene al anticuerpo se utilizó para la evaluación. La evaluación de las clonas se realizó mediante pruebas de reconocimiento hacia Cn2 por ensayos de ELISA. Se tomaron colonias provenientes de la 4^a ronda de tamizado (45°C) y 5^a ronda (50°C y 60°C) correspondientes al primer proceso de selección, así como colonias de la 2^a ronda de tamizado del segundo proceso de selección.

Con base en las pruebas cualitativas por ELISA se descartaron las variantes que presentaran señales de reconocimiento menores a la del dímero 6009F. Las colonias que mostraron una señal similar o mayor al dímero fueron caracterizadas.

Se observó una gran diferencia, entre los dos procesos de selección, debido a que el número de colonias positivas de la 4^a y 5^a rondas de tamizado del primer proceso de selección fueron menores que las provenientes de la 2^a ronda de tamizado del segundo proceso. La disminución en las señales puede deberse a que las condiciones usadas durante el primer proceso de selección fueron más severas y al mayor número de rondas de tamizado en comparación con el segundo proceso. Las variantes elegidas fueron evaluadas en tres ocasiones para confirmar su nivel de reconocimiento. Las clonas con mejor reconocimiento fueron secuenciadas para determinar los cambios respecto al dímero 6009F original.

Sólo dos variantes tuvieron cambios a nivel de residuos de aminoácidos, las clonas restantes presentaron mutaciones silenciosas y/o codones de paro (ámbar: UAG y ópalo: UGA). El uso de estos, se encuentra íntimamente relacionado con la cepa TG1 debido a que es supresora del codón ámbar (Lu *et al.*, 1995; Cárcamo *et al.*, 1998; Tate *et al.*, 1999).

Se observó la presencia de cambios silenciosos en varias de las secuencias seleccionadas dentro de los que encontraron con mayor frecuencia el ácido glutámico (E) de las posiciones 30, 53 y 203, cuyos codones cambiaron de GAG a GAA. La selección de estas clonas pudo deberse a el uso preferencial de codones, ya que se mejoran los niveles de expresión por lo tanto al ser evaluados la señal de reconocimiento es mayor en comparación con el dímero 6009F. Esta observación se confirmó en las bases de datos (*gcua*, *kasuza*, y *microbial genetics*) y según lo mencionado por Maloy *et al.* (1996). Los reportes muestran que la frecuencia de uso del codón GAG (1.9%) es menor que el triplete GAA (4.4%) en *E. coli*.

Las variantes que presentaron cambios a nivel de aminoácidos fueron denominadas; Dim9F-**C9**, proveniente de la 4ª ronda de tamizado (del primer proceso de selección) y la variante Dim9F-**D4**, aislada de la 2ª ronda de tamizado (del segundo proceso de selección). Llamadas así por proceder del dímero (Dim) del anticuerpo 6009F (9F) variantes **C9** y **D4**.

Los cambios correspondientes son:

Dim9F-**C9**: E123G, este es el primer residuo de la cadena ligera (VL).

Dim9F-**D4**: E43G, este residuo se encuentra ubicado en el andamiaje (*framework*) 2 de la cadena pesada (VH).

Fue llamativo que las dos variantes seleccionadas presentaron cambios que corresponden a los mismos residuos, E por G. En la figura 8 se muestra la ubicación de los cambios por el alineamiento de los residuos de aminoácidos.

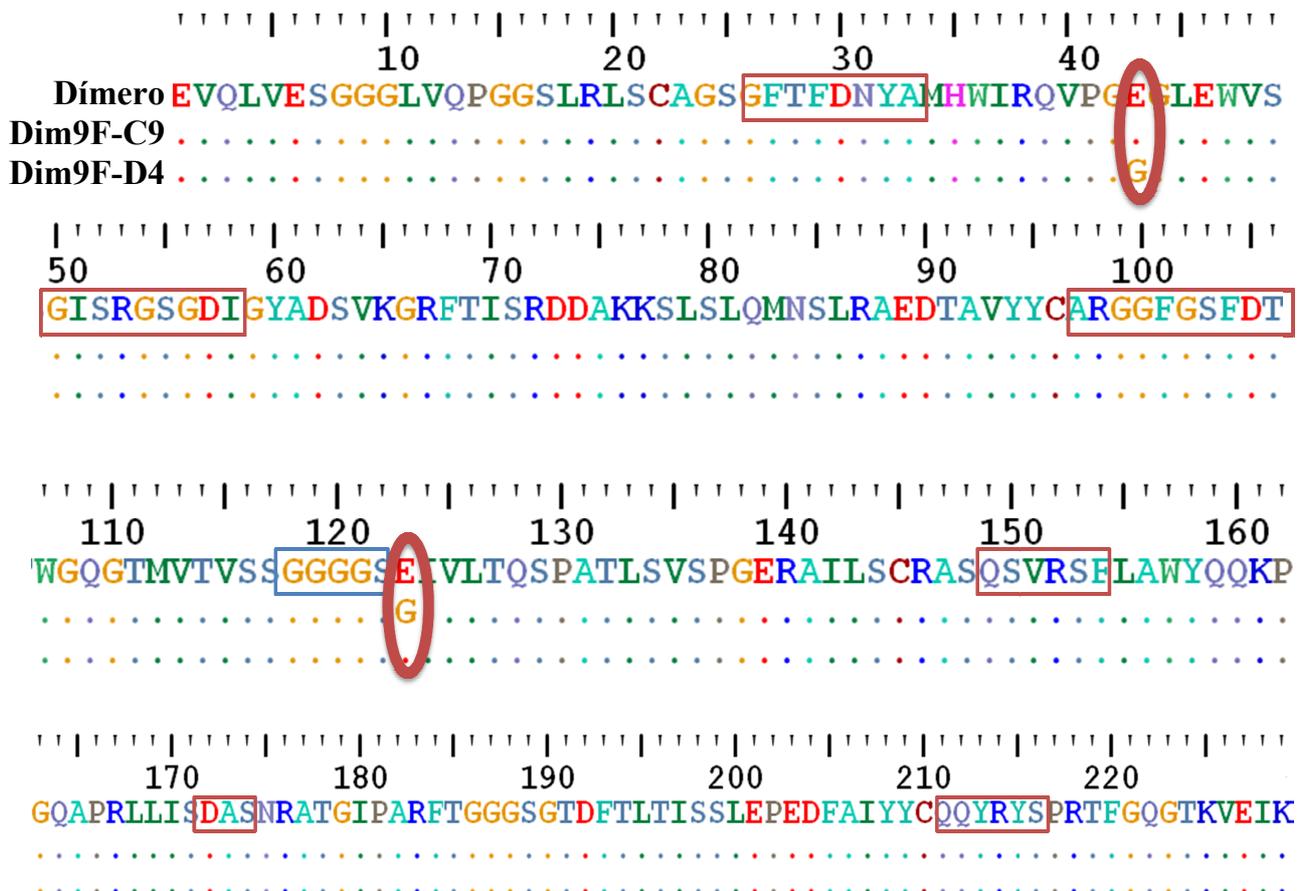


Figura 8. Alineamiento de secuencias de los anticuerpos. Se muestra el alineamiento de las secuencias de residuos de los aminoácidos correspondientes al dímero 6009F, Dim9F-C9 y Dim9F-D4. Los recuadros rojos muestran los residuos que constituyen los CDRs y el recuadro azul los residuos correspondientes al péptido conector. Los cambios de cada variante se muestran en los óvalos de color rojo.

Las variantes Dim9F-C9 y Dim9F-D4 fueron subclonadas en el vector de expresión *Psyn 1*, para expresar y purificar las proteínas. Estas construcciones se encuentran bajo el operon *Lac*, contienen el *Cmyc* y una secuencia repetida que codifica para 6 residuos de histidinas (H) repetidas de manera consecutiva (cola de H's). Gracias a la cola de H's es posible realizar un primer proceso de purificación por afinidad (Ni^{2+} -NTA agarosa). Posteriormente, se realiza un segundo paso de purificación por exclusión molecular por medio de FPLC (*Fast performance liquid chromatography*). Durante la segunda etapa de purificación fue posible observar en los cromatogramas una clara diferencia en la cantidad de proteína obtenida de las variantes diméricas (Fig.9).

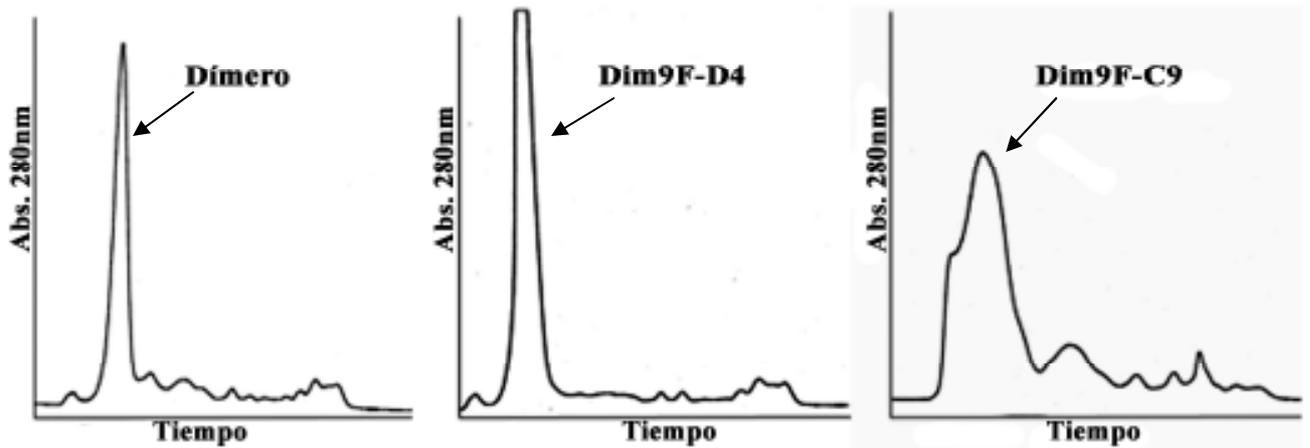


Figura 9. Purificación de anticuerpos por FPLC. Se muestran los cromatogramas obtenidos al purificar el dímero 6009F (izq.), la variante Dim9F-D4 (centro) y Dim9F-C9 (der.). Se inyectó 1ml de cada muestra. El volumen de medio de cultivo utilizado para la expresión fue de 1.5L en cada caso. La sensibilidad del equipo fue de 0.5 a un flujo de 0.5ml/min. Los picos mayoritarios corresponden al tiempo de elusión (20.5 min.) de la molécula scFv dimérica.

El rendimiento calculado fue de 572.15 $\mu\text{g/L}$ del dímero 6009F, 150 $\mu\text{g/L}$ de la variante Dim9F-C9 y 1114.96 $\mu\text{g/L}$ de la mutante Dim9F-D4. Es claro, que el mayor nivel de expresión fue de la variante Dim9F-D4 lo que puede estar relacionado con su estabilidad.

Pruebas de estabilidad por ELISA

Se realizaron pruebas de reconocimiento hacia la toxina Cn2 por ELISA en presencia de diferentes concentraciones de GdnHCl, como agente desnaturizante, con la finalidad de comparar la estabilidad funcional de los anticuerpos aislados contra el dímero parental. En la figura 10 se observa que la variante Dim9F-D4 presentó la mejor señal de reconocimiento comparado con Dim9F-C9 y el dímero 6009F, e incluso, mayor que la forma monomérica 6009F bajo las condiciones de desnaturización probadas. De manera sorprendente Dim9F-C9 fue la variante de menor estabilidad incluso que el dímero 6009F.

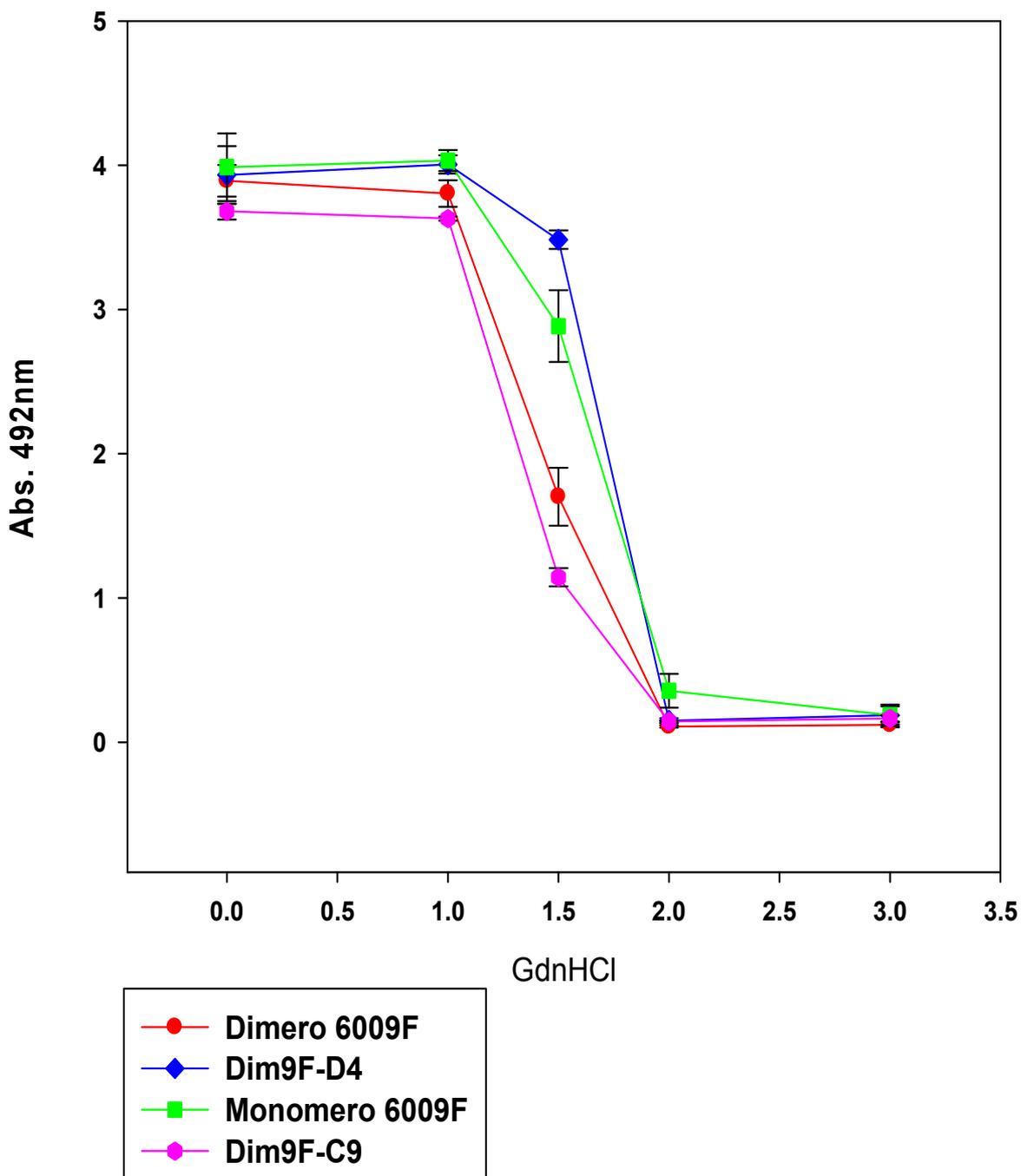


Figura 10. Pruebas de estabilidad de los anticuerpos en presencia de cloruro de guanidino. Se observan los valores obtenidos de absorbancia, producto del reconocimiento de los anticuerpos dímero 6009F (rojo), Dim9F-D4 (azul), Dim9F-C9 (rosa) y la molécula monomérica 6009F (verde), contra la toxina Cn2, en presencia de GdnHCl. Las pruebas se realizaron por tetraplicado a excepción de la variante C9 debido a la poca cantidad obtenida de esta y se utilizó una concentración de 1.5µg de toxina y 1.5µg de anticuerpo. Los valores obtenidos fueron graficados con el programa *Sigmaplot*. Cada punto muestra el valor promedio y las barras correspondientes al error estándar.

Dada la baja expresión y la estabilidad en presencia de GdnHCl de la variante Dim9F-C9 se decidió seguir con la caracterización de la variante Dim9F-D4.

Pruebas de estabilidad térmica

Se realizó una prueba de ELISA contra la toxina Cn2 en la cual se probó la tolerancia de los anticuerpos a diferentes temperaturas. Los anticuerpos 6009F dimérico, monomérico y la variante Dim9F-D4 se incubaron a temperaturas entre los 4°-80°C por 1 hora. Con las muestras pre-tratadas se siguió el procedimiento descrito para pruebas de ELISA (ver metodología). Las señales de reconocimiento se muestran en la figura 12.

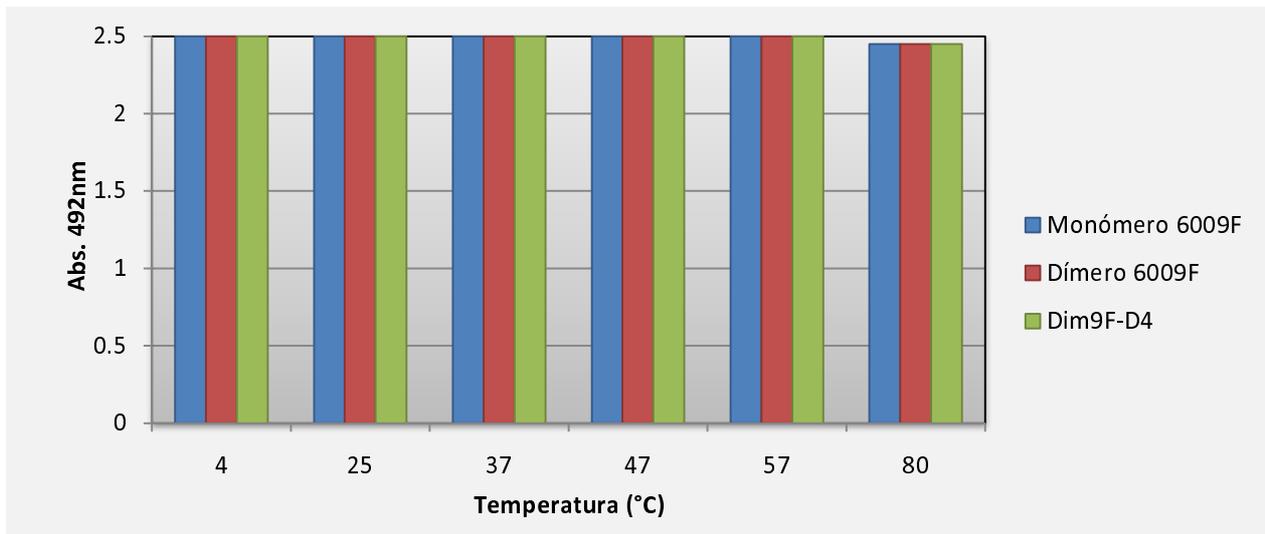


Figura 12. Pruebas de tolerancia de los anticuerpos a altas temperaturas. Se muestran las señales de reconocimiento de los anticuerpos diméricos y monomérico 6009F así como la variante Dim9F-D4. Todos los anticuerpos fueron pre-tratados a diferentes temperaturas por 1 h y posteriormente puestos en contacto con la toxina Cn2 e incubados a 37°C. Se utilizó 1.5µg de toxina y 1.5µg de cada anticuerpo. La prueba se realizó por tetraplicado.

Se observó que el pre-tratamiento de los anticuerpos entre 4°-57°C por 1 hora no causó una disminución en la señal de reconocimiento hacia Cn2. Es interesante, que aún a 80°C su efecto negativo es mínimo en todos los anticuerpos monoméricos y diméricos evaluados.

Prueba de estabilidad durante almacenaje (vida de anaquel).

Se realizó una prueba más de reconocimiento por ELISA con muestras del dímero 6009F y la variante Dim9F-D4 almacenadas a 4°C por un periodo de 15 días y un mes. Los anticuerpos no mostraron diferencias o disminución en la señal de reconocimiento aun después de un periodo de almacenaje de un mes en solución PBS.

Pruebas de reactividad cruzada

Se realizó una prueba de reactividad cruzada usando toxinas de otras especies del género *Centruroides* así como proteínas irrelevantes (Fig.11).

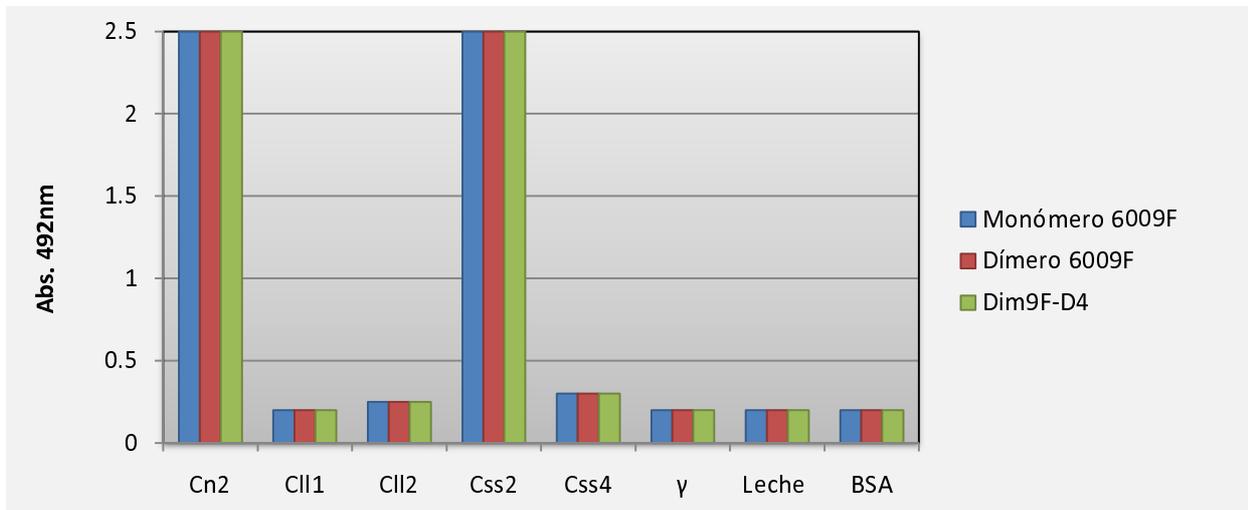


Figura 11. Reactividad cruzada de los anticuerpos. Se muestran las señales de reconocimiento de los anticuerpos 6009F monomérico, el dímero 6009F y la variante Dim9F-D4 contra diferentes blancos. Las concentraciones de cada anticuerpo fue de 1.5µg por pozo.

La variante Dim9F-D4 mantiene la especificidad tanto del dímero 6009F como de la forma monomérica. El reconocimiento del anticuerpo 6009F contra la toxina C_{ss2} del alacrán *C. sulffusus sulffusus* fue determinado recientemente por la Dra. Riaño (datos no publicados).

Pruebas de neutralización

La evaluación final y más importante de este trabajo fue determinar la capacidad protectora del anticuerpo Dim9F-D4 *in vivo*. Las pruebas de neutralización se realizaron siguiendo el procedimiento ya descrito (ver metodología). Los resultados de las pruebas se presentan en las tablas VII, VIII y IX.

TABLA VII

Prueba de neutralización del dímero 6009F y Dim9F-D4 contra la toxina Cn2.

	DL ₅₀	ANTICUERPO	RELACIÓN MOLAR Cn2:Anticuerpo	SOBREVIVIENTES/ TOTAL RATONES	SINTOMAS
Cn2	1	-----	1:0	3/6*	SI
Cn2	1	Dímero 6009F	1:5	6/6*	SI
Cn2	1	Dim9F-D4	1:5	6/6*	NO
Cn2	2	-----	1:0	2/6	SI
Cn2	2	Dímero 6009F	1:5	6/6	SI
Cn2	2	Dim9F-D4	1:5	6/6	NO

*Promedio de 3 repeticiones.

Se usó una relación molar 1:5 toxina:anticuerpo antes mencionada. La tabla resume el proceso de caracterización *in vivo* y las diferencias entre el dímero parental y el Dim9F-D4 contra la toxina Cn2.

TABLA VIII

Pruebas de neutralización del Dim9F-D4 contra la toxina Cn2.

	DL ₅₀	ANTICUERPO	RELACIÓN MOLAR Cn2:Anticuerpo	SOBREVIVIENTES/ TOTAL RATONES	SINTOMAS
Cn2	2	-----	1:0	0/5	SI
Cn2	2	Dim9F-D4	1:5	5/5	NO
Cn2	2	Dim9F-D4	1:2.5	5/5	NO
Cn2	2	Dim9F-D4	1:1	3/5	SI

Se muestran los datos obtenidos de pruebas de neutralización con la variante Dim9F-D4 con diferentes relaciones moleculares toxina:anticuerpo utilizando 2DL₅₀ de la toxina Cn2.

TABLA IX

Pruebas de neutralización del dímero 6009F y Dim9F-D4 contra el veneno total de *C. noxius*.

	DL ₅₀	ANTICUERPO	RELACIÓN MOLAR Cn2:Anticuerpo	SOBREVIVIENTES/ TOTAL RATONES	SINTOMAS
Veneno	2	-----	1:0	0/6	SI
Veneno	2	Dímero 6009F	1:5	6/6	SI
Veneno	2	Dim9F-D4	1:5	6/6	NO

Se utilizó la relación molar 1:5 toxina:anticuerpo antes mencionada. La tabla sintetiza el proceso de caracterización *in vivo* de los anticuerpos diméricos de interés contra el veneno total de *C. noxius*.

Los resultados de las pruebas de neutralización utilizando $1DL_{50}$ de Cn2 muestran que tanto el dímero 6009F como la variante Dim9F-D4 tuvieron la capacidad de neutralizar debido a que todos los ratones protegidos sobrevivieron (Tabla VII). Sin embargo, el comportamiento de los individuos con cada anticuerpo fue diferente. Los ratones protegidos con el dímero 6009F presentaron síntomas de intoxicación alrededor de 3 a 4 horas posteriores a la aplicación, mientras que los ratones protegidos con la variante Dim9F-D4 no presentaron síntomas visibles. Por su comportamiento protector es equiparable al monómero 6009F.

Se decidió realizar pruebas de neutralización más exigentes incrementando la cantidad de toxina a $2DL_{50}$. El comportamiento fue similar a la prueba anterior, ya que los individuos protegidos con el dímero 6009F mostraron síntomas de intoxicación mientras que con el Dim9F-D4 la neutralización fue total (ausencia de síntomas).

Se realizaron pruebas de neutralización más severas utilizando $2DL_{50}$ de la toxina Cn2 con la finalidad de estimar la eficiencia de neutralización del Dim9F-D4 se utilizaron diferentes relaciones molares (toxina:anticuerpo) menores a las establecidas (Tabla VIII). Se observó que el Dim9F-D4 con una relación molar 1:5 y 1:2.5, toxina:anticuerpo mantuvieron un comportamiento satisfactorio. Es decir, sobrevivieron todos los individuos y no se observó la aparición de síntomas. Sin embargo, con la relación 1:1 la capacidad del anticuerpo no fue suficiente para la sobrevivencia de todos los individuos pero se observó un retraso en la aparición de los síntomas (3 horas) y en la muerte de los individuos (4 horas).

Finalmente se probó la neutralización del veneno completo del alacrán *C. noxius* (ver Tabla IX). Los dos anticuerpos permitieron la sobrevivencia de los animales pero únicamente la variante Dim9F-D4 fue la que eliminó la aparición de síntomas de intoxicación producidos por el veneno.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue la optimización de la capacidad protectora *in vivo* del anticuerpo scFv 6009F dimérico. Aunque en las pruebas de neutralización aunque se observa la sobrevivencia de los animales experimentales, al transcurrir un periodo de 3 a 4 horas posteriores a la aplicación, se observan síntomas de intoxicación típicos de la presencia de la toxina Cn2 (ver Tabla IV). La aparición de los síntomas puede deberse a que durante las primeras horas el complejo dímero-Cn2 se mantiene y posteriormente la toxina es liberada en el organismo, es decir, la interacción del anticuerpo con la toxina ocurre pero no con la eficiencia requerida para lograr la inhibición total de sintomatología.

En la molécula monomérica 6009F, cuyo conector es largo (15 residuos), se permite de manera eficiente la formación estructural del sitio de interacción con el antígeno. Es por esto que la interacción con la toxina Cn2 se mantiene de manera constante y se logra un efecto permanente de neutralización. Mientras que la forma dimérica con un conector de 5 aminoácidos requiere que dos moléculas idénticas puedan interactuar y generar dos sitios de unión. Por lo tanto, la exigencia es diferente y no siempre resulta exitosa. Dímero 6009F sigue reconociendo y uniéndose a la toxina Cn2 de forma similar que el monómero, sin embargo no con la eficiencia requerida para lograr la inhibición total de los síntomas, esto nos hace pensar en un problema de **estabilidad funcional** en condiciones *in vivo*. Definiendo la disminución de la estabilidad funcional como la pérdida de conformación dimérica funcional del anticuerpo y por ende su capacidad de reconocimiento y neutralización en condiciones fisiológicas

Hoy en día existen estrategias como la manipulación de genes y la evolución molecular que han permitido mejorar las propiedades particulares de los anticuerpos como son: especificidad, estabilidad, afinidad, niveles de expresión, entre otras.

Wörn y Plückthun (2001) proponen dos estrategias experimentales para mejorar la estabilidad de los scFv. La primera se denomina método **racional** y la segunda **aproximación evolutiva**. Para la estrategia racional es necesario tener el conocimiento previo de la estructura o contar con un modelo estructural del anticuerpo. A partir de la estructura es posible realizar un análisis que permita predecir los cambios puntuales que mejoren la estabilidad global de la molécula. Las modificaciones se realizan principalmente por mutaciones sitio dirigidas. La estrategia racional cuenta con diversos ejemplos que buscan la estabilización de los dominios variables (VH y VL) mediante mutaciones diseñadas principalmente en la zona de la interfaz (Tan *et al.*, 1998; Jespers *et al.*, 2004; Barthelemy *et al.*, 2007). Existen varios reportes en los cuales se diseñó la sustitución de residuos por cisteínas con la finalidad de generar enlaces disulfuro interdominio de tal manera que con la unión covalente se obtienen anticuerpos más

estables. A estas construcciones se les denomina dsFvs. Para que los dsFvs sea una alternativa exitosa se requiere contar con un sistema de expresión que permita el correcto plegamiento (levadura) (Reiter *et al.*, 1996; Bera *et al.*, 1998; Schmiedl *et al.*, 2000; Schmiedl *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2008; Saerens *et al.*, 2008).

Inicialmente con el dímero 6009F se realizó la sustitución de los residuos 43 de la VH y 101 de la VL, por cisteínas. El anticuerpo es funcional pero el nivel de expresión en *E. coli* es muy baja (Lab. Dr. Becerril, datos no publicados).

La estrategia elegida para este trabajo fue la **aproximación evolutiva**, ya que existen numerosos trabajos (Huston *et al.*, 1991; Marks., 1991; Holliger *et al.*, 1993; Mcgregor *et al.*, 1994; Boder *et al.*, 2000; Boder *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2001; Hanes *et al.*, 2001; Wörn *et al.*, 2001; Poon *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2002; Hudson *et al.*, 2003; Riaño *et al.*, 2005; Goswami *et al.*, 2009) y la experiencia propia del grupo que han demostrado el éxito en la obtención de variantes de anticuerpos con las características deseadas por este método. La aproximación evolutiva se basa en la generación de bancos de variantes de proteínas y la subsecuente selección en condiciones que favorezcan el aislamiento de anticuerpos con las propiedades buscadas. En este trabajo se buscó un scFv dímérico con una mayor estabilidad funcional que el dímero 6009F.

Mediante EP-PCR se generaron tres bancos de variantes del dímero 6009F, previamente descritos. Para aislar de esta gran diversidad a los anticuerpos que tuvieran mejor estabilidad se utilizó el sistema de despliegue en fagos. Los tamizados (ver resultados y metodología) se realizaron en condiciones desnaturalizantes en presencia GdnHCl y altas temperatura. En trabajos previos (Jung *et al.*, 1999; Brokmann *et al.*, 2005) se demostró que la combinación de temperatura y GdnHCl, son elementos clave para la selección de variantes más estables. Adicionalmente, se realizó la disminución progresiva de la concentración de toxina durante cada ronda de tamizado lo que favorece el enriquecimiento de anticuerpos con alta afinidad, lo cual se debe a que se propicia un aumento en la competencia y permitirá recuperar variantes con propiedades importantes.

El primer proceso de selección se realizó siguiendo el protocolo descrito (Tabla II, metodología). En una última ronda de tamizado se hicieron lavados con TEA (0.1M). Esta solución provoca un cambio drástico de pH (de 7.4 a 12) de tal manera que los fago-anticuerpos recuperados son más estables y además mantienen una fuerte interacción con la toxina Cn2. Para cada ronda de tamizado se realizó la titulación de los fago-anticuerpos antes y después de cada proceso de tamizado (ver Tablas V, resultados). Durante la primeras rondas de tamizado el título de fago-anticuerpos disminuyó considerablemente esto pudo deberse a que se empleó una baja

concentración de toxina (1µg y 0.5µg), aunado a que probablemente varios cambios presentes en las variantes del banco generado no fueron favorables para el reconocimiento (no son funcionales por la presencia de: codones de paro, mutaciones sin sentido, deleciones, inserciones, entre otras) o no son viables en el sistema de despliegue en fagos. Debido a los puntos mencionados, las primeras rondas de tamizado no se sometieron a condiciones de estrés. En contraste, las rondas sucesivas presentaron títulos de fago-anticuerpos mayores a pesar de la disminución en la concentración de toxina lo que nos habla de un enriquecimiento de las poblaciones que reconocen a la toxina Cn2.

Las clonas obtenidas del primer proceso de selección se evaluaron por medio de pruebas de reconocimiento por ELISA de anticuerpo soluble. Este paso fue fundamental debido a que el comportamiento de los anticuerpos varía al estar solos o fusionado a la proteína pIII de la cubierta del fago. Ya que se ha reportado que la proteína pIII tiene un efecto estabilizador de las proteínas desplegadas, modificando su comportamiento tanto a nivel de reconocimiento, afinidad así como de estabilidad (Wörn *et al.*, 2001; Poon *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2002; Goswami *et al.*, 2009).

Con el proceso de evaluación se encontraron pocas clonas cuyas variantes de anticuerpos presentaron reconocimiento por la toxina Cn2 y en su mayoría los valores de absorbancia fueron menores que la del dímero 6009F. Por lo cual se decidió realizar un segundo proceso de selección con un menor número de rondas de tamizado y condiciones menos drásticas (ver Tabla III, metodología y Tabla VI, resultados).

En la evaluación del segundo proceso de selección se presentó un mayor número de clonas positivas que incluso superaban la señal de reconocimiento en comparación con el dímero 6009F. Al secuenciar varias clonas se determinó que muchas de ellas (aproximadamente 50%) presentaron mutaciones silenciosas que probablemente mejoraron la expresión de la proteína en la cepa TG1 de *E. coli*.

Mediante los procesos de selección se aislaron las variantes diméricas scFv denominadas; **Dim9F-C9** y **Dim9F-D4**.

La caracterización de las variantes mostró que el anticuerpo dímérico Dim9F-D4 presentó mejores características tanto a nivel de expresión (Fig.9), estabilidad (Fig.10) y capacidad de neutralización (Tabla VII). Es de resaltar que el cambio de un único residuo (E43G) fue capaz de mejorar las propiedades del dímero 6009F. En cuanto al nivel de expresión y capacidad neutralizante el anticuerpo Dim9F-D4 es equiparable al monómero 6009F, sin embargo el dímero presentó una mayor estabilidad funcional. Debido a que no se realizaron mediciones de estabilidad termodinámica, definimos nuevamente a la estabilidad funcional como el parámetro que nos permitió observar la capacidad de mantener la funcionalidad del anticuerpo bajo las

condiciones fisiológicas y desnaturizantes probadas.

No es de asombrarse que con sólo dos rondas de tamizado, una de ellas pre-incubación a alta temperatura (60°C), se lograra aislar una variante con mejores características, ya que se ha determinado que para la obtención de anticuerpos más estables seleccionados por despliegue en fagos, la temperatura puede jugar un papel de mayor importancia en comparación con el GdnHCl (Jung *et al.*, 1999).

Las pruebas en condiciones desnaturizantes, con GdnHCl, permitió darnos una idea real del incremento de la estabilidad funcional de la molécula Dim9F-D4. Debido a que se evaluó el reconocimiento del anticuerpo por la toxina Cn2 en condiciones desnaturizantes. Las señales de reconocimiento de los anticuerpos disminuyeron al incrementar la concentración de GdnHCl y fue claro observar que a la concentración de 1.5M de GdnHCl la variante Dim9F-D4 mantuvo la mejor señal de reconocimiento, superior al dímero parental e incluso que el monómero 6009F (Fig.10). La utilización de GdnHCl se debió a que es un desnaturizante muy fuerte, además es el más utilizado para estudios de estabilidad de proteínas y se ha mostrado que cualquier proteína pierde totalmente su conformación terciaria al someterlas a altas concentraciones de GdnHCl (6-5M) (Lapange., 1978).

Otra prueba interesante que se realizó para observar la estabilidad de los anticuerpos fue la evaluación del efecto de la temperatura en los anticuerpos monitoreando el reconocimiento por la toxina Cn2. Los scFvs son caracterizados por ser moléculas de poca estabilidad dentro de la diversidad de formatos de anticuerpos y especialmente los de origen humano y fue sorprendente que no se observó una disminución significativa del reconocimiento por Cn2 en ninguno de los anticuerpos analizados, incluso después del pre-tratamiento de 1 h a las temperaturas de 60° y 80°C (Fig.12). La tolerancia a estas temperaturas se le adjudica a fragmentos de anticuerpos más estables como: los scFv de pollo, los VHH de camélidos y V-NAR de tiburones (Hamers *et al.*, 1993; Chames *et al.*, 2009). En el caso de los anticuerpos de camélidos se conoce que los residuos correspondientes a las posiciones 39, 43, 44 y 47, denominada tétrada estructural, están involucrados con la estabilidad y niveles de expresión de la molécula. De hecho, se han encontrado scFv humanos que al modificar la VH en la región de la interfaz entre los residuos 43 a 47, equivalentes a la tétrada estructural de VHHs de camélidos, mejoran significativamente la estabilidad hasta llegar a ser equiparable termodinámicamente a las VHHs de camélidos (Tan *et al.*, 1998; Jespersers *et al.*, 2004; Barthelemy *et al.*, 2007). Es posible que el cambio en el residuo 43 del Dim9F-D4 tenga la misma repercusión en la estabilidad que observada en la tétrada de camélidos. Adicionalmente se evaluaron muestras almacenadas por periodos de dos semanas y un mes con la finalidad de observar si ocurría alguna disminución en el reconocimiento de los

anticuerpos por su blanco. El resultado de la prueba de ELISA mostró que los anticuerpos probados son moléculas promisorias como agentes terapéuticos ya que son principios activos estables y esto se optimizará cuando sea diseñado un vehículo (excipiente) para tal fin. Lo cual garantiza que tendrán una larga vida de anaquel como en el caso de los antivenenos comerciales.

Es importante mencionar que aunque con las pruebas de estabilidad por GdnHCl y temperatura no se obtuvieron determinaciones termodinámicas, los experimentos nos permiten ver contundentemente el aumento de la estabilidad de la variante Dim9F-D4. Sin embargo estamos obligados a realizar a futuro una evaluación termodinámica.

Es necesario recordar que la formación de un dímero scFv funcional radica no solo en el tamaño del conector, sino también que se encuentren en la concentración necesaria para que ocurra la conjunción de los monómeros. Cuando las moléculas se encuentran en bajas proporciones la probabilidad de encontrarse y formar anticuerpos dimericos funcionales disminuyen, este fenómeno ocurre tanto en solución como al ser administrado a los ratones en pruebas *in vivo*. Por lo tanto, la estabilidad del complejo monómero-monómero es un parámetro de gran importancia para obtener anticuerpo funcional, tanto en los procesos de expresión como para un comportamiento satisfactorio durante el proceso de neutralización.

En este nivel podemos comentar que la mejora en los niveles de expresión puede deberse a la estabilidad del anticuerpo. Las proteínas con poca estabilidad como el dímero 6009F propician un mayor número de monómeros libres y desplegados, por lo cual son más susceptibles a degradación. Por el contrario, proteínas con mayor estabilidad propician una mayor cantidad de moléculas asociadas, plegadas correctamente y funcionales como en el caso de la variante Dim9F-D4.

La prueba de caracterización que más nos interesó siguiendo el objetivo principal de este proyecto fue el comportamiento de los anticuerpos *in vivo*. La variante Dim9F-D4, mostró ser totalmente neutralizante (ver Tablas VII y IX, resultados), debido a que los individuos protegidos no presentaron síntomas visibles de intoxicación aún después de un periodo largo de observación, comparado con el dímero 6009F.

Para valorar la capacidad neutralizante de Dim9F-D4 se disminuyó la cantidad de anticuerpo en la neutralización de $2DL_{50}$ de Cn2 y se observó que con la relación 1:2.5 (toxina:anticuerpo) el Dim9F-D4 es aún capaz de neutralizar totalmente el efecto de la toxina (ver Tabla VIII, resultados).

Los resultados más contundentes, son las pruebas realizadas contra $2DL_{50}$ del veneno total las cuales confirmaron que el dímero Dim9F-D4 recuperó la actividad neutralizante equiparable al scFv 6009F monomérico (Riaño *et al.*, 2005) con las ventajas de ser divalente y ser más estable..

Es importante decir que debido a la manipulación de los ratones o a que la respuesta de estos es impredecible la validación de los datos dependerá estrictamente de la repetición y reproducibilidad de los mismos. Es por eso que dentro de las 5 repeticiones de las pruebas de neutralización con el dímero 6009F (ver tabla IV y VII), concluimos que la capacidad neutralizante de este anticuerpo no es la óptima. Mientras que en las 3 repeticiones ($1DL_{50}$ de Cn2) realizadas con el Dim9F-D4 su comportamiento fue constante, contundente y satisfactorio, aún más notorio en las pruebas realizadas con el veneno completo (ver Tabla IX).

La modificación de un solo residuo en una proteína puede ocasionar grandes efectos biofísico y ser biológicamente significativos modificando tanto el nivel de estabilidad y actividad (Guo *et al.*, 2004). En este caso una sola mutación mejoró notablemente la estabilidad y actividad neutralizante de la variante Dim9F-D4.

En el anticuerpo Dim9F-D4 el cambio E43G es drástico ya que las propiedades individuales de estos residuos son diferentes. El ácido glutámico presenta carga negativa en condiciones fisiológicas debido a que contiene un ácido carboxílico en su cadena lateral además de ser polar. A diferencia de la glicina que es un aminoácido pequeño y se considera de tipo alifático por su cadena lateral que contiene solo un átomo de hidrógeno además, de que la molécula es no polar.

Para entender el posible efecto del cambio E43G en el contexto estructural de la proteína se recurrió al modelo del scFv 6009F monomérico (Mónica Domínguez, datos no publicados) (Fig 13). En el modelo se observa que el residuo G43 se encuentra en el andamiaje 2 (*framework 2*) en la zona de la interfaz entre los dominios VH y VL; esta región está íntimamente relacionada con la estabilidad de la molécula. Justo esta posición ha sido una de las regiones más exploradas en trabajos que buscan la estabilización de Fvs, además como ya lo habíamos mencionado, es la zona (posiciones 40 a 44) en la cual se han realizado sustituciones por cisteína, así como en su región complementaria de la VL (residuos del 220 al 225) para generar puentes disulfuro estabilizantes de la molécula (Reiter *et al.*, 1996; Bera *et al.*, 1998; Schmiedl *et al.*, 2000; Schmiedl *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2008; Saerens *et al.*, 2008).

Con ayuda del modelo del scFv 6009 monomérico, podemos observar los residuos que se encuentran en un radio de 4 Å alrededor de la G43, para entender el efecto de la mutación a nivel estructural. Uno de los residuos de aminoácidos cercanos que más llamó la atención fue la Y209 en la VL, debido a que la Y presenta una cadena lateral de gran tamaño, el cambio de E por G posiblemente facilita el acomodamiento de la Y en la interfaz entre las dos dominios, aunado al aumento de la hidrofobicidad de la región por medio de la G. Se ha observado que al realizar mutaciones en la zona de la interfaz de los Fv, disminuyendo la hidrofiliidad, se propicia un mejor empaquetamiento de estos. Este tipo de “rigidez” intermolecular aumenta la estabilidad de

los anticuerpos y directamente su funcionalidad *in vivo* (Dottotini *et al.*, 2004; Jespers *et al.*, 2004). Se conoce que una compactación de las proteínas propicia una mejora en la estabilidad, sin embargo, esto repercute en la flexibilidad de las moléculas y se ha reportado que en el caso de los dímeros de scFv este es un parámetro importante. Los dímeros de scFv cuya flexibilidad es mayor muestran un aumento considerable en la estabilidad y afinidad debido a su fácil adaptabilidad para no perder la unión con el antígeno, en comparación con los dímeros de Fabs cuya flexibilidad estructural es mucho menor (Lawrence *et al.*, 1998). Basados en estas ideas y como explicación alternativa podemos decir que la mutación G43, debido a que el residuo es de un tamaño pequeño, puede ocasionar una mejora considerable la flexibilidad de los Fvs, optimizando su funcionalidad *in vivo* en comparación con el dímero parental. Sin embargo, hablamos del modelo estructural del scFv 6009F monomérico por lo que será necesario realizar un análisis estructural profundo generado un modelo de la estructura dimérica o con la estructura cristalográfica para entender un poco más del efecto de este cambio.

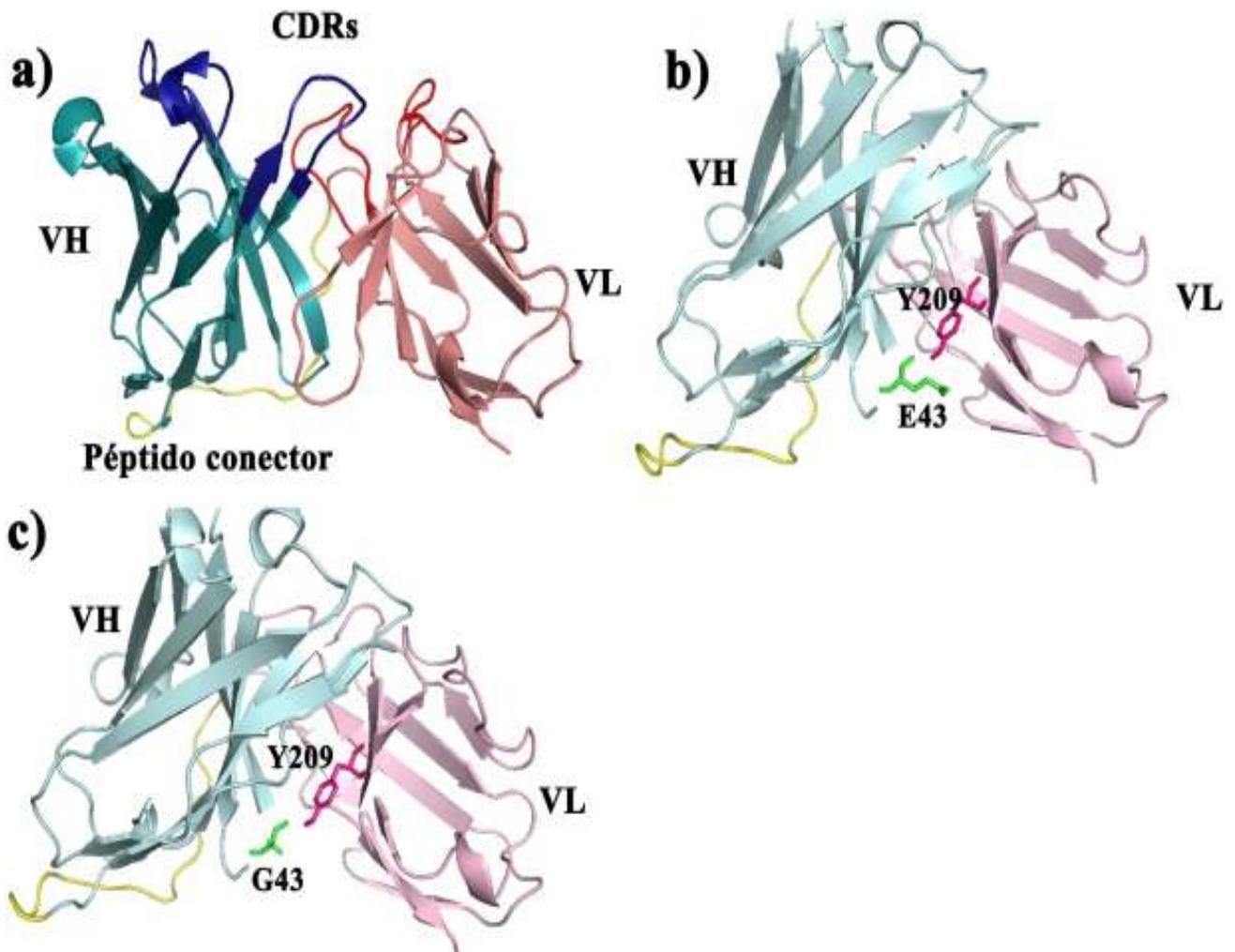


Fig. 13. Modelo estructural del scFv 6009F monomérico. **a)** Se muestran el modelo tridimensional del anticuerpo scFv 6009F monomérico. Se muestran las cadenas VH (cian), VL (magenta) y los CDRs en su respectiva cadena (azul y rojo), así como el péptido conector (amarillo). **b)** Se observa la ubicación del residuo E43 en la cadena VH y su cercanía con la Y209 de la cadena VL en el scFv 6009F. **c)** Se muestra la ubicación de la mutación G43 en la cadena VH presente en la variante Dim9F-D4 y la cercanía con la Y209 en la VL. El análisis se realizó buscando los residuos que se encontraran en un radio máximo de 4Å del residuo 43, mediante el programa PyMOL.

Para conocer si la G43 se encuentra representada en los anticuerpos humanos reportados se realizó un alineamiento (BLAST X) (datos no mostrados). Así mismo, la comparación con las líneas germinales de las diferentes VHs humanas, particularmente con las secuencias de residuos en la región del andamiaje 2 (*FR2*) y prestando atención en las VH3 presente en el Dim9F-D4 (Fig.14). Fue sorprendente, que en la posición 43 ninguna de las VHs de la línea germinal, ni en el alineamiento con anticuerpos humanos reportados (BLAST X) se observó identidad con la variante Dim9F-D4. En la posición 43 se encontró predominantemente la presencia del residuo básico lisina (K), esto nos permite proponer la construcción de otra variante K43 y determinar el efecto de este aminoácidos consenso.

FR2			
43			
	H1-H2	Locus	
VH1	1-3	1-02	WVRQAPG Q GLEWMG
	1-3	1-03	WVRQAPG Q RLEWMG
	1-3	1-08	WVRQATG Q GLEWMG
	1-2	1-18	WVRQAPG Q GLEWMG
	1-3	1-46	WVRQAPG Q GLEWMG
	1-3	1-58	WVRQARG Q RLEWIG
	1-2	1-69	WVRQAPG Q GLEWMG
	1-2	1-e	WVRQAPG Q GLEWMG
	1-2	1-f	WVQAPG K GLEWMG
	VH2	3-1/2-1	2-05
3-1		2-26	WIRQPPG K ALEWLA
3-1		2-70	WIRQPPG K ALEWLA
VH3	1-3	3-07	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-09	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-11	WIRQAPGKGLEWVS
	1-1	3-13	WVRQATGKGLEWVS
	1-U	3-15	WVRQAPGKGLEWVG
	1-3	3-20	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-21	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-23	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-30	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-30.3	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-30.5	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-33	WVRQAPGKGLEWVA
	1-3	3-43	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-48	WVRQAPGKGLEWVS
	1-U	3-49	WVRQAPGKGLEWVG
	1-1	3-53	WVRQAPGKGLEWVS
	1-3	3-64	WVRQAPGKGLEYVS
	1-1	3-66	WVRQAPGKGLEWVS
	1-4	3-72	WVRQAPGKGLEWVG
	1-4	3-73	WVRQASGKGLEWVG
1-3	3-74	WVRQAPGKGLVWVS	
1-6	3-d	WVRQAPGKGLEWVS	
VH4	2-1/1-1	4-04	WVRQPPG K GLEWIG
	2-1	4-28	WIRQPPG K GLEWIG
	3-1	4-30.1	WIRQH P G K GLEWIG
	3-1	4-30.2	WIRQPPG K GLEWIG
	3-1	4-31	WIRQH P G K GLEWIG
	1-1	4-34	WIRQPPG K GLEWIG
	3-1	4-39	WIRQPPG K GLEWIG
	1-1	4-59	WIRQPPG K GLEWIG
	2-1	4-b	WIRQPPG K GLEWIG
VH5	1-2	5-51	WVRQMPG K GLEWMG
	1-2	5-a	WVRQMPG K GLEWMG
VH6	3-5	6-01	WIRQSP S RGLEWLG
VH7	1-2	7-4.1	WVRQAPG Q GLEWMG

Figura14. Alineamiento de las diferentes líneas germinales de VHs. Se muestra la región correspondiente a los FR2 de las distintas VHs de la línea germinal humana. En rojo se observa la posición 43 de las VH3, esta familia de cadenas VH está presente en el anticuerpo Dim9F-D4 seleccionado. En ninguna de las secuencias se encuentra presente glicina en esta posición.

CONCLUSIONES

La generación de diversidad de anticuerpos por medio de la construcción de bancos mutagénicos y el despliegue en fagos de estos para su posterior selección por medio de diferentes presiones selectivas, permitió aislar a la variantes dimérica, Dim9F-D4, cuya capacidad neutralizante contra la toxina Cn2 y el veneno completo del alacrán *C. noxius* fue satisfactoria. Así mismo, se encontró que estas técnicas nos permitieron aislar un anticuerpo con mejor nivel de expresión y estabilidad en comparación al dímero 6009F.

Puntualmente se resalta que:

- ✓ Se construyeron tres bancos mutagénicos del 6009F dimérico.
- ✓ Se logró aislar las variantes Dim9F-C9 y Dim9F-D4 mediante selección bajo diferentes condiciones desnaturalizantes.
- ✓ La mutante Dim9F-D4 presentó un solo cambio que mejoró notablemente la capacidad de neutralización, así como los niveles de expresión y estabilidad funcional comparada con el dímero 6009F.
- ✓ Es posible que la sustitución del residuo 43 por Glicina pueda aportar mejorías en estabilidad en los scFv humanos.

PERSPECTIVAS

- Caracterización termodinámica del dímero 6009F y la variante Dim9F-D4.
- Determinar las constantes de afinidad por BIACORE.
- Pruebas de rescate en ratones (aplicación de anticuerpo posterior a la inyección de la toxina o veneno).
- Análisis estructural: determinación de la estructura mediante cristalografía.
- Realizar sustituciones a saturación en la posición 43 de la VH, especialmente el cambio por lisina. Caracterizar las variantes.
- Evaluar el efecto de la G43 en el monómero 6009F.

REFERENCIAS

- Abbas A., A. Lichtman.** 2004. Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System. Second edition. W.B. Saunders company
- Abderrazek R., L. Hmila, C. Vincke, Z. Benlasfar, M. Pellis, H. Dabbek, D. Saerens, M. El Ayeb, S. Muyldermans, B. Bouhaouala-Zahar.** 2009. Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. *Biochem J.* **424 (2):** 263-272.
- Arndt K., K. Müller, A. Plückthun.** 1998. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain fragment. *Biochemistry.* **37:** 12918-12926.
- Aubrey N., C. Devaux, P. Sizaret, H. Rochat, M. Goyffon, P. Billiald.** 2003. Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell Mol Life Sci.* **60 (3):** 617-628.
- Abroug F., S. ElAtrous, S. Nouira, H. Haguiga, N. Touzi, S. Bouchoucha.** 1999. Serotherapy in scorpion envenomation; randomized controlled trial. *Lancet.* **354 (9182):** 906-909.
- Atwell J., L. Pearce, M. Lah, L. Gruen, A. Kortt, P. Hudson.** 1996. Design and expression of a stable bispecific scFv dimer with affinity for both glycoprotein and N9 neuraminidase. *Mol Immunology.* **33 (17):** 1301-1312.
- Barthelemy P., H. Raab, B. Appleton, C. Bond, P. Wu, C. Wiesmann, S. Sidhu.** 2007. Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of antonomus human Vh domains. *J Biol Chem.* **283 (6):** 3639-3654.
- Bird R, K., Hardman, J. Jacobson, S. Johnson, B. Kaufman, S. Lee, T. Lee, S. Pope, G. Riordan, M. Whitlow.** 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242:** 423-426.
- Becerril B., L. Riaño.** 2008. Quinta generación de antivenenos contra picadura de alacrán. *Hypia.* **16:** 29-30.
- Bennett M., S. Choe, D. Eisenberg.** 1994. Domain Swapping: Entangling alliance between proteins (diphtheria toxin/ evolution of oligomers). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91:** 3127-3131.
- Bennett M., M. Schlunegger, D. Eisenberg.** 1995. 3D Domain swapping: A mechanism for oligomer assembly. *Protein Science.* **4:** 2455-2468.
- Black C.A.** 1999. Delayed type hypersensitivity: Current theories with and historic perspective. *J. Dermatol.* **5(1):** 7-12.
- Boder E., K. Midelfort, K. Wittrup.** 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97:** 10701-107005.
- Bradbury A., J. Marks.** 2004. Antibodies from phage antibody libraries. *J. Immunol Methods.* **290:** 29-49.
- Brekke, O. Loset, G.** 2003. New technologies in therapeutic antibody development. *Current Opinion in Pharmacology.* **3:** 544-550.

- Brockmann E., M. Cooper, N. Strömsten, M. Vehniäinen, P. Saviranta.** 2005. Selecting for antibody scFv fragment with improved stability using phage display with denaturation under reducing conditions. *J. Immunol. Methods.* **296**: 159-170.
- Brüsselbach S., T. Korn, T. Völkel, R. Müller, R. Kontermann.** 1999. Enzyme recruitment and tumor cell killing *in vitro* by a secreted bispecific single-chain diabody. *Tumor Targeting.* **4**: 115-123
- Cadwell R., G. Joyce.** 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods and Applications.* **2**: 28-33
- Calderon- Aranda E., M. Dehesa-Dávila, A. Chávez-Haro, L. Possani.** 1996. Scorpion stings and their treatment in Mexico. En: Bon C, Goyffon M, eds. *Envenoming and their treatments.* Lyon: Fondation Macel Merieux. 311-320.
- Cárcamo J., W. Ravera, R. Brissette, O. Dedova, J. Beasley, A. Alam-Moghé, C. Wan, A. Blume, W. Mandecki.** 1998. Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage display peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 11146-11151.
- Carmichael A., B. Power, T. Garrett, P. Yazaki, J. Shively, A. Raubischek, A. Wu, P. Hudson.** 2003. The Crystal structure of an anti-CEA scFv diabody assembled from T84.66 scFvs in V(L)-to-V(H) orientation: implications for diabody flexibility. *J Mol Biol* **326**: 341-351.
- Celis A., R. Gaxiola, E. Sevilla, M. Orozco, J. Armas.** 2007. Tendencia de la mortalidad por picaduras de alacrán en México, 1979-2003. *Rev Panam Salud Publica / Pan Am J Public Health.* **21(6)**: 373-380.
- Chames P., M. Van Regenmortel, E. Weiss, D. Baty.** 2009. Themed section: vector design and drug delivery. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British J pharmacology.* **157**: 220-233.
- Chippaux J., M. Goyffon.** 1998. Venoms , antivenoms and immunotherapy. *Toxicon.* **36(6)**: 823-846.
- Chippaux J., M. Goyffon.** 2008. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta tropica.* **107**: 71-79.
- Chowell G., J. Hyman, P. Díaz, N. Hengartner.** 2005. Predicting scorpion sting incidence in an endemic region using climatological variables. *Int J environ Health Res.* **15(5)**: 425-335.
- Clackson T., R. Hoogenboom, H. Griffiths, A. Winter.** 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-628.
- Dehesa-Dávila M., L. Possani.** 1994. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon.* **32 (9)**: 1015-1018.
- De Graaf M., I. van der Meulen-Muileman, H. Pinedo, H. Haisman.** 2002. Expression of scFvs and scFv fusion proteins in eukaryotic cells. *Methods Mol. Biol.* **178**: 379-387.
- DePrieto M., D. Weinreich, D. Hartl.** 2005. Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution. *Nature reviews.* **6**: 678-687.

- Devaux C., B. Jouirou, M. Krifi, O. Clot-Faybesse, M. El Ayeb, H. Rochat.** 2004. Quantitative variability in the biodistribution and in toxicokinetic studies of the three main alpha toxins from *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon*. **41**: 661-669.
- Dolezal O., R. De Gori, M. Walter, L. Doughty, M. Hattarki, P. Hudson, A. Kortt.** 2003. Single-chain Fv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: residue at position 15 in the V(L) domain of the scFv-0 (V(L)-V(H)) molecule is primarily responsible for formation of a tetramer-trimer equilibrium. *Protein Eng.* **16**: 47-56.
- Dottorini T., C. Vaughan, M. Walsh, P. LoSurdo, M. Sollazzo.** 2004. Crystal structure of human VH: requirements for maintaining a monomer fragment. *Biochemistry*. **43**: 622-628.
- Espino S. G., L. Riaño, B. Becerril, L. Possani.** 2009. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospective. *J. Proteomics*. **72**: 183-199.
- Gell P., R. Coombs.** 1963. Clinical aspects of immunology. 1ed. Oxford, England; Blackwell.
- Goswami P., D. Saini, S. Sinha.** 2009. Phage displayed scFv: pIII scaffold may fine tune binding specificity. *Hibridoma*. **28 (5)**: 327-331.
- Guo, H. Choe, J. Loeb, L.** 2004. Protein tolerance to random amino acid change. *Proc. Natl Acad. Sci.* **101**: 9205-9210
- Hale G.** 2006. Therapeutic antibodies. Delivering the promise?. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **58**: 633-639.
- Hamers-Casterman C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. Songa, N. Bendahman, R. Hamers.** 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. **363**: 446-448.
- Hanes J., C. Schaffitzel, A. Knappik, A. Pluckthun.** 2000. Picomolar affinity antibodies from fully synthetic naïve library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol.* **18**: 1287-1292.
- He Y., W. Honnen, P. Krachmarov, M. Burkhardt, S. Kayman, J. Corvalan, A. Pinter.** 2002. Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *The journal of immunology*. **169**: 595-605.
- Hoffman N., L. Howland, G. Flomenbaum.** 2007. Goldfrank's manual of toxicologic emergencies. USA. McGraw hill ed. 912 pp.
- Hoogenboom H. R., A. P. de Bruïne, S. E. Hufton, R. M. Hoet, J. Arends, R. C. Roovers.** 1998. Antibody phage display and its applications. *Immunotechnology* **4**: 1-20.
- Holliger P., T. Prospero, G. Winter.** 1993. "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6444-6448.
- Holliger P., P. Hudson.** 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnol.* **23 (9)**: 1126-1136.

Huang B., S. Davern, S. Kennel. 2006. Mono and bivalent binding of scfv and covalent diabody to murine laminin-1 using radiolabeled proteins and SPR measurements: Effects on tissue retention *in vivo*.*Journal of Immunological Methods.* **313**: 149-160.

Hudson P., A. Kortt. 1999. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J. Immunol. Methods.* **231**: 177-190.

Hudson P., C. Souriau. 2003. Engineered antibodies. *Nature medicine.* **9** (1): 129-134.

Huston J., M. Mudgett-Hunter, M. Tai, J. McCartney, F. Warren, E. Haber, H. Oppermann. 1991. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymo.* **203**: 46-88.

Houston J., D. Levinson, M. Mudgett, M. Tai, J. Novotny, M. Margolies, R. Ridge, R. Bruccoleri, E. Haber, R. Crea. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an antidigoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. USA.* **85**: 5879-5883.

Hwang W., J. Foote. 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods.* **36**: 3-10.

<http://gcu.schoedl.de/>. Base de datos uso de condones.

<http://openwetware.org>. Base de datos uso de codones.

<http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Base de datos uso de codones.

http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html. Base de datos uso de codones.

<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/>. Base de datos uso de condones

http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/34595.htm. Instituto BIOCLON S.A. de C.V. Faboterápico Antialacrán. Alacramyn™.

Jensen K., M. Larsen, J. Pedersen, P. Christensen, L. Vallina, S. Goletz, B. Clark, P. Kristensen. 2002. Functional improvement of antibody fragments using a novel phage coat protein III fusion system. *Biochem Biophys Research Commun.* **298**: 566-573.

Janeway C.A., P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. 2005. Immunobiology., 6ed. Garland Science.

Jespersen L., O. Schon, L. James, D. Veprintsev, G. Winter. 2004. Crystal structure of HEL4, a soluble, refoldable human V(H) single domain with a germ-line scaffold. *J Mol Biol.* **337**: 893-903.

Jia L., H. Song, X. Liu, W. Ma, Y. Xu, C. Zhang, S. Dong, Q. Li. 2008. Screening of human antibody Fab fragment against HBsAg and the construction of its dsFv form. *Int. J. Biol. Sci.* **4** (2): 103-110.

Juarez V., L. Riaño, V. Quintero, T. Olamendi, M. Ortiz, E. Ortiz, L. Possani, B. Becerril. 2005. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralizing properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J Mol Biol.* **346**: 1287-1297.

- Jun S., A. Honegger, A. Plückthun.** 1999. Selection for improved protein stability by phage display. *J.Mol.Biol.* **294**: 163-180.
- Katja M., K. Müller, A. Plückthum.** 1998. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry.* **37**: 12918-12926.
- Kay K.B., J. Winter, J. McCafferty.** 1996. Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. Academic press. U.S.A.
- Kipriyanov S., G. Moldenhauer, J. Schumacher, B. Cochlovius, C. Von der Lieth, U. Klein, R. Küppers, K. Rajewsky.** 1997. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B-cells in humans. *Blood.* **89**: 1288-1298.
- Kölher G.** 1981. *Immunol. Meth.* **2**: 285-298.
- Kotermann R., T. Völkel, T. Korn.** 2003. Production of recombinant bispecific antibodies. *Methods in molecular biology.* **248**: 227-242.
- Kortt A., O. Dolezal, B. Power, P. Hudson.** 2001. Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomolecular Engineering.* **18**: 95-108.
- Kurtzman A.** 2001. Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. *Curr opin biotechnol.* **12**: 361-370.
- Kortt A., R. Malby, B. Caldwell, C. Gruen, N. Ivancic, M. Lawrence, G. Howlett, R. Webster, P. Hudson, P. Colman.** 1994. Recombinant anti-sialidase single-chain variable fragment antibody. Characterization, formation of dimer and higher-molecular-mass multimers and the solution of crystal structure of the single-chain variable fragment/sialidase complex. *Eur J Biochem.* **221**: 151-157.
- Gavilondo Cowley J.** 1995. Anticuerpos Monoclonales. Elfos Scientiae. Cuba.
- Garcia C., E. Calderón, G. Anguiano, B. Becerril, L. Possani.** 2003. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon.* **41**: 417-427.
- Goel A., J. Baranowska, S. Hinrichs, J. Wisecarver, G. Pavlinkova, S. Augustine, D. Colcher, B. Booth, S. Batra.** 2001. ^{99m}Tc-Labeled divalent and tetravalent CC49 single chain Fv's: Novel imaging agents for rapid *in vivo* localization of human colon carcinoma. *The journal of nuclear medicine.* **42 (10)**: 1519-1527.
- Goyffon M., M. Vachon, N. Broglio.** 1982. Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon.* **20**: 337-344.
- Griffiths A.D., S.C. Williams, O. Hartley, I.M. Tomlinson, P. Waterhouse, W.L. Crosby, R. Kontermann, P.T. Jones, N.M. Low, T.J. Allison, T.D. Prospero, H.R. Hoogenboom, A. Nissim, J.P. Cox, J.L. Harrison, M. Zaccolo, E. Gherardi, G. Winter.** 1994 Isolation of high affinity antibodies directly from large synthetic repertoires. *J.EMBO* **13**: 3245–3260.
- Lapange S.** 1978. Physicochemical aspects of protein denaturation. New York. Wiley.

Lawrence L., A. Kortt, P. Iliadesa, P. Tulloch, P. Hudson. 1998. Orientation of antigen binding sites in dimeric and trimeric single chain Fv antibody fragments. *FEBS Letters.* **425 (3):** 479-484.

Le Gall F., U. Reusch, M. Little, S. Kipriyanov. 2004. Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody. *Protein Eng Des Sel.* **17:** 357-366.

Lee Y., M. Boehm, K. Chester, R. Begent, S. Perkins. 2002. Reversible dimer formation and stability of the antitumor single-chain Fv antibody MFE-23 by neutron scattering, analytical ultracentrifugation, and NMR and FT-IR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **320:** 107-127.

Lehninger A. L., D.L. Nelson, M. M. Cox. 2000. Principles of biochemistry. (3^a ed). Worth Publishers Inc. Nueva York.

Leung D., E. Chen, D. Goeddel. 1989. A method for random mutagenesis of defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Journal of methods in cell and molecular biology.* **1 (1):** 11-15.

Licea A., B. Becerril, L. Possani. 1996. Fab fragment of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon.* **34:** 843-847.

Lin Y., J. Pagel, D. Axworthy, A. Pantelias, N. Hedin. Pries W. 2006 A genetically engineered anti- Cd45 single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted radioimmunotherapy of hematologic malignancies. *Cancer Research.* **66:** 3884-3892.

Litman G.W., J.P. Rast, M.J. Shablott. 1993, Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol. Biol. Evol.* **10 (1):** 60-72.

Lu K., F. Rhonde, R. Thomason, C. Kenney, H. Lu. 1995. Mistranslation of a TGA termination codon as tryptophan in recombinant platelet-derived growth expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J.* **399:** 411-417.

Maloy S., V. Stewart, R. Taylor. 1996. Genetic analysis of pathogenic bacteria. Cold spring Harbor Laboratory Press, NY.

Marks D. J., R. Hoogenboom, H. Bonnert, J. McCafferty, D. A. Griffiths, G. Winter. 1991. By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J.Mol.Biol.* **222:** 581-597.

Martínez Peña J. 2003. Tratado de Inmunología e Inmunopatología. España. Phadia

Matys E., M. Little. 1999. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J Mol. Biol.* **293 (1):** 41-56.

McCafferty J., A.D. Griffiths, G. Winter, D.J. Chiswell. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348:** 552-554.

Mcgregor P., E. Molloy, C. Cunningham, W. Harris. 1994. Spontaneous assembly of bivalent single chain antibody fragments in *Escherichia coli*. *Mol immunology.* **31 (3):** 219-226.

- Meddeb F., B. Bouhaouala, Z. Benlasfar, J. Hammadi, T. Meiri, M. Moslah.** 2003. Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing *Androctonus australis* hector scorpion toxins. *Toxicon*. **42** (7): 785-791.
- Meier J., J. White.** 1995. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. USA. CRC ed. 233pp.
- Nelson A., J. Reicjert.** 2009. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nature Biotech.* **27** (4): 331-337.
- Nielsen S., G. Adams, L. Weiner, J. Marks.** 2000. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res.* **60**: 6434-6440.
- Odegard V.H.** 2006. Targeting of somatic hypermutation. *Nat.Rev. Immunol.* **6** (8): 573-583.
- Oprea M.** 1999. Antibody Repertoires and pathogen recognition: The role of germline diversity and somatic hypermutation. University of Leeds Books.
- Orlandi R., D. Gussow, P. Jones, G. Winter.** 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**: 3833-3837.
- Pack P., K. Müller, R. Zahn, A. Plückthun.** 1995. Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **246**: 28-34.
- Pintar A., L. Possani, M. Delepierre.** 1999. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol.* **287**: 359-367.
- Quintero V., V. Juárez, M. Ortiz, R. Sanchez, L. Possani, B. Becerril.** 2007. The change of the scFv into Fab format improves the stability and *in vivo* toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. *Molecular Immunology.* **44**: 1307-1315.
- Reiter Y., U. Brinkmann, L. Byungkook, I. Pastan.** 1996. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: Disulfide-stabilized Fv fragment. *Nature Biotechnology.* **14**: 1239-1245.
- Riaño Umbarila L.** 2005. Aislamiento y caracterización de anticuerpos humanos contra la toxina Cn2 del veneno del alacrán *Centruroides noxius* a partir de una biblioteca de despliegue de scFvc. Tesis de doctorado, Instituto de biotecnología, UNAM
- Riaño L., V. Juárez, T. Olamendi, M. Ortiz, L. Possani, B. Becerril.** 2005. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *The FEBS journal.* **272**: 2591- 2601.
- Rodi D.J., L. Makowski.** 1999. Phage-display technology—finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 87–93.
- Rodriguez de la Vega R., L. Possani.** 2007. Novel paradigms of scorpion toxins that affect the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon.* **49**: 171-180.

- Saerens, D. Conrath, K. Govaert, J. Muyldermans.** 2008. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *J. Mol. Biol.* **377**: 478-488.
- Schinmiedl A., F. Breitling, S. Dübel.** 2000. Expresion of a bispecific dsFv-dsFv' antibody fragment in *Escherichia coli*. *Protein Engineering.* **113 (10)**: 725-734.
- Schultz J., Y. Lin, J. Sanderson, Y. Zuo, D. Stone, R. Mallett, S. Wilbert, D. Axworhty.** 2000. Atetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy. *Cancer Research.* **60**: 6663-6669.
- Scott N., B. Reynolds, M. Wright, O. Qazi, N. Fairwehther, M. Deonarain.** 2008. Single-chain Fv phage display propensity exhibits strong positive correlation with overall expression levels. *BMC Biotechnology.* **8 (97)**: 1-10.
- Selisko B., G. Cosío, C. García, B. Becerril, L. Possani, E. Horjales.** 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* Hoffman. *Toxicon.* **43**: 43-50.
- Sidhu S.S.** 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol. Engin.* **18**: 57–63.
- Skerra A., A. Plückthun.** 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**: 1038-1041.
- Stork R., E. Campigna, B. Robert, D. Müller, R. Kontermann.** 2009. Biodistribution of bispecific single-chain diabody and its half-life extended derivatives. *J Biol Chem.* **284**: 25612-25619.
- Swann P., M. Tolnay, S. Muthukkumar, M. Shapiro, B. Rellaham, K. Clouse.** 2008 Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunology.* **20**: 493-499.
- Tan P., B. Sandaier, P. Stayton.** 1998. Contributions of highly conserved VH/VL hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency. *Biophysical J.* **75**: 1473-1482.
- Tate W., J. Mansell, S. Mannering, J. Rivine, L. Major, D. Wilson.** 1999. UGA: a dual signal for “stop” and for recording in protein synthesis. *Biochem J.* **64(12)**: 1593-1606.
- Tahtis K., F. Lee, F. Smyth, B. Power, C. Renner, M. Brechbiel, L. Old, J. Hudson, A. Scorr.** 2001. Biodistribution properties of 111-indium-labeled C-functionalized *trans*-Cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3s193 diabody and F(ab')₂ constructs in breast carcionoma xenograft model. *Clin Cancer Res.* **12**: 220-228.
- Theakson R.D., D. A. Warrell, E. Griffiths.** 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* **41**: 541-557.
- Thie H., S. Binius, T. Schirrmann, M. Hust, S. Dübel.** 2009. Multimerization domains for antibody phage displae and antibody production. *New biotech.* in press.

Touloun O., T. Slimain, A. Boumezzough. 2001. Epidemiological survey of scorpion envenomations in southwest Morocco. *J Venom Anim Toxins.* **7**: 199-218.

Vaughan J. T., J. Williams, K. Pritchard, K. Osbourn, R. Pope, C. Earnshaw, J. McCafferty, A. R. Hodits, J.S. Wilton, S.K. Johnson. 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol.* **14**: 309-314.

Vázquez H., A. Chávez, W. García, R. Mancilla, J. Paniagua, A. Alagón, C. Sevcik. 2005. Pharmacokinetics of a F(ab')₂ scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon.* **46**: 797-805.

Völkel T., T. Korn, M. Bach, R. Müller, E. Kontermann. 2001. Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain diabodies. *Protein Eng.* **14 (10)**: 815-823.

William G., T. Willats. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology* **50**: 837-854.

Winter G., A.D. Griffiths, R.E. Hawkins, H.R. Hoogenboom. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 433-455

Wörn A., A. Auf der Maur, D. Escher, A. Honegger, A. Barberis, A. Plückthun. 2000. Correlation between *in vitro* stability and *in vivo* performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors. *J. Biol. Chem.* **275**: 2795-2803.

Wörn A., A. Plückthun. 1999. Different Equilibrium Stability Behavior of scFv Fragments: Identification, Classification, and Improvement by protein engineering. *Biochemistry.* **38**: 8739-8750.

Wörn A., A. Plückthun. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **395**: 989-1010.

Abreviaturas

Å: Angstroms

BSA: Suero albumina bovina (*bovine serum albumin*)

°C: Grados centígrados

C: Dominio constantede un anticuerpo

CH: Dominio constante de la cadena pesada de un anticuerpo

CL: Dominio constante de la cadena ligera de un anticuerpo

CDR: Regiones Determinantes de complementariedad (*Complementarity Determining Regions*)

dNTP: Deoxiribonucleotido trifosfato

Da: Dalton

DL₅₀: Dosis letal media

DO_{600nm}: Densidad Óptica a 600 nanómetros

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa propensa a error (*error-prone polymerase reaction*)

Fab: Formato de anticuerpo denominado Fragmento de unión al antígeno el cual corresponde a los dominios CH, CL, VH y VL (*antigen binding fragment*).

FV: Fragmento variable de un anticuerpo, correspondientes a los VH y VL.

g: Gramos

GdnHCl: Cloruro de guanidinio

H: Cadena pesada

Ig: Inmunoglobulina

kDa: Kilo daltones

L: Cadena ligera

M: Molar

mg: Miligramos

Min: Minutos

ml: Mililitro

mM: Milimolar

N: Normal

nm: Nanómetros

PBS: Solución salina amortiguada por fosfatos (*Phosphate buffered saline solution*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

pM: Picomolar

rpm: Revoluciones por minuto

rtPCR: Reacción en cadena de la polimerasa por medio de la enzima transcriptasa reversa (ARN-ADN)

scFv: Fragmento variables de cadena sencilla de un anticuerpo (*single chain variable fragment*)

V: Dominio variable de un anticuerpo

VH: Dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo

VL: Dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo

µg: Microgramos

µl: Microlitros

µM: Micromolar

TEA: Trietilamina