



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Obtención de anticuerpos de origen humano que neutralicen la  
toxina Ts1 del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

**M. C. ITZEL AMARO ESTRADA**

TUTOR PRINCIPAL

**DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**DR. FERNANDO R. ESQUIVEL GUADARRAMA**  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, UNAM

MÉXICO D. F. Enero 2015



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.

Este trabajo se realizó en el  
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos  
del Instituto de Biotecnología de la UNAM  
bajo la dirección del Dr. Lourival D. Possani Postay

Esta tesis fue parcialmente financiada por donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (IN200113) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT 153496) concedidos al laboratorio del Dr. Lourival D. Possani.

La estudiante fue becaria del programa de apoyo a estudios de posgrado del CONACyT, número de beca 16266.

*A mis Papás:*

Como una humilde muestra de mi infinito agradecimiento, amor  
y respeto.

*A Isayuvi e Iván:*

Como un sencillo agradecimiento por su cariño y apoyo  
incondicional.

*... Gracias a Dios por ustedes*

# AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a todos los que hacen posible su existencia y excelencia.

A mi tutor, el Dr. Lourival Possani, por brindarme el privilegio de formar parte de su grupo de trabajo, por el ejemplo que nos brinda todos los días y muy especialmente por su paciencia para conmigo. Mi agradecimiento y admiración.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Baltazar Becerril y Dr. Fernando Esquivel, por su interés y gran apoyo para que los objetivos se alcanzaran de la mejor manera.

A los integrantes del jurado de examen: Dra. Isabel Gómez, Dra. Adela Rodríguez, Dra. Martha Pedraza, Dra. Georgina Estrada y Dr. Lorenzo Segovia, por sus contribuciones para mejorar este documento, por valorar el trabajo realizado y por sus enseñanzas que enriquecieron mi formación científica.

A la unidad de Docencia del IBt: Gloria, Jalil y Antonio, por la eficiencia y disponibilidad con que siempre nos apoyan.

A mis compañeros de los grupos: Becerril-Corzo-Possani, siempre extrañaré esta gran familia. Mucho éxito, amigos.

A todas las personas importantes en mi vida, las que siempre han estado, las que se fueron, las que llegaron y las que seguirán; porque esta aventura académica se convirtió en una lección de vida y no tendría razón de ser de no haberla compartido con ustedes.

*Gracias*

# CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>10</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1 Alacranismo .....	11
1.2 Anticuerpos recombinantes y antivenenos .....	13
1.3 Despliegue en fagos filamentosos .....	17
1.4 Anticuerpos desplegados en fagos .....	19
1.5 El género <i>Tityus</i> y el escorpionismo en Brasil .....	22
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo general .....	25
3.2 Objetivos particulares .....	25
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Cepas y plásmidos usados en la clonación y expresión .....	26
4.2. Soluciones y medios de cultivo .....	27
4.3 Antígenos .....	28
4.4 Despliegue en fagos de los scFv's .....	28
4.4.1 Construcción de una nueva biblioteca .....	29
4.5 Selección .....	29
4.6 ELISA .....	29
4.7 Producción de fago-anticuerpos para ELISA .....	30
4.8 Subclonación .....	31
4.9 Expresión de scFv .....	31

4.10 Purificación del anticuerpo .....	<b>32</b>
4.11 Detección del scFv (Western blot) .....	<b>32</b>
4.12 Error-prone PCR .....	<b>33</b>
4.13 Determinación de LD <sub>50</sub> .....	<b>34</b>
4.14 Pruebas de neutralización .....	<b>34</b>
4.15 Modelado molecular del scFv .....	<b>34</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
5.1 Obtención de scFv's que reconocen Ts1 .....	<b>35</b>
5.2 Caracterización de scFv's seleccionados .....	<b>43</b>
5.3 Determinación de LD <sub>50</sub> de Ts1 vía intraperitoneal .....	<b>46</b>
5.4 Ensayos de neutralización y maduración de 15e .....	<b>46</b>
5.5 Reactividad cruzada de 15e .....	<b>47</b>
5.6 Modelado molecular de 15e .....	<b>50</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>54</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>55</b>
<b>APÉNDICE A. Publicación en revista arbitrada</b> .....	<b>61</b>

## Índice de figuras

Figura 1 Distribución geográfica de los alacranes..	11
Figura 2 Inmunoglobulina IgG humana.	14
Figura 3 Inmunoglobulina IgG y formatos derivados	15
Figura 4. Ciclo infeccioso de un bacteriofago filamentosos	18
Figura 5. Esquema de un fago filamentosos	19
Figura 6. Esquema de una ronda de tamizado.	21
Figura 7. Estructura tridimensional de la toxina Ts1.	23
Figura 8. Plásmidos utilizados para despliegue y expresión	27
Figura 9. Digestión con BstNI.	35
Figura 10. Amplificación de clonas recuperadas en los tamizados	37
Figura 11 Recuperación de scFv's	38
Figura 12 Amplificación de los insertos de colonias obtenidas en la ronda de tamizado 1RAM.	40
Figura 13. ELISA de fago-anticuerpos	41
Figura 14. Alineamiento de aminoácidos de los scFv 15e y 71d.	42
Figura 15. ELISA de los fago anticuerpos 15e y 71d.	42
Figura 16. SDS-PAGE e inmunodetección de scFv 15e.	44
Figura 17. ELISA de especificidad de scFv purificados.	45
Figura 18. Secuencia de aminoácidos del scFv 15e.	45
Figura 19. Reactividad cruzada del anticuerpo 15e	45
Figura 20. Modelado molecular del scFv 15e.	49



## Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
CDR	Región determinante de complementariedad
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FR	Región de andamiaje de los anticuerpos
Km	Kanamicina
LD <sub>50</sub>	Dosis letal para el 50 % de la población
mAb	Anticuerpo monoclonal
OPD	o-fenildiamina
PBS	Tampón de fosfatos
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
Tc	Tetraciclina
ufc	Unidades formadoras de colonias

## Abstract

Scorpion stings are a common event that occurs in tropical and subtropical areas of the world, being a public health problem in certain countries. In most places, medical treatment relies on antivenoms obtained from the sera of hyper-immunized horses, however some efforts are being made to prepare specific antibodies of human origin, using phage display methodology. In this work, we describe the strategy followed for obtaining a protective human single chain antibody (scFv) capable of partially neutralizing the effect of Ts1, the major toxin isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. Phage display technique allowed the isolation of scFv 15e from a human library of antibodies, after four rounds of selection against Ts1. This clone codes for 124 amino acids belonging to the family VH6 and 114 amino acids of family VK4. This scFv also recognizes toxins from the scorpions *Tityus packyurus* and *Tityus cambridgei* from the Amazonian region but not toxin from mexican scorpion. Mice challenged with a LD50 (median lethal dosis) of Ts1 in the presence of this scFv were substantially resistant to intoxication. ScFv 15e is a leading compound for the development of better anti-scorpion antidotes. However, this scFv needs to be improved.

## Resumen

El escorpionismo es un problema de salud pública en varias regiones del mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. El veneno de los alacranes es una compleja mezcla de componentes, sin embargo, se sabe que los malestares y efectos nocivos son causados por la acción de péptidos tóxicos presentes en el veneno. A la fecha, la única alternativa de eficacia comprobada para contrarrestar los signos y síntomas de intoxicación por picadura de alacrán es la aplicación de antivenenos. Actualmente, la preparación de antivenenos implica la inmunización de animales con macerados de la glándula venenosa y su formulación final está compuesta de fragmentos derivados de la digestión enzimática de las inmunoglobulinas. Aunque algunos de ellos han probado ser eficientes, se buscan nuevas alternativas que mejoren sus propiedades de difusión, sean más seguros para los pacientes y, a nivel farmacéutico, que disminuyan los costos y tiempos de producción. El objetivo de este trabajo fue aislar un fragmento de anticuerpo a partir de un repertorio de origen humano utilizando la tecnología de despliegue en fagos. Se obtuvo un anticuerpo (15e) en formato de cadena sencilla (scFv) que neutraliza parcialmente los efectos letales de la toxina Ts1 (principal componente tóxico del veneno del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*). Aun cuando el anticuerpo 15e no es completamente neutralizante, se observó una disminución importante en la sintomatología de la intoxicación, tanto en la intensidad como en el tiempo de aparición de los signos. El scFv aislado mostró que puede reconocer parcialmente a toxinas similares de alacranes del mismo género. Sin embargo, una estrategia de evolución dirigida debe implementarse para optimizar el anticuerpo o bien otras condiciones de selección deben ser consideradas para aislar nuevos anticuerpos con mayor capacidad neutralizante para la toxina Ts1 y otros componentes del veneno.

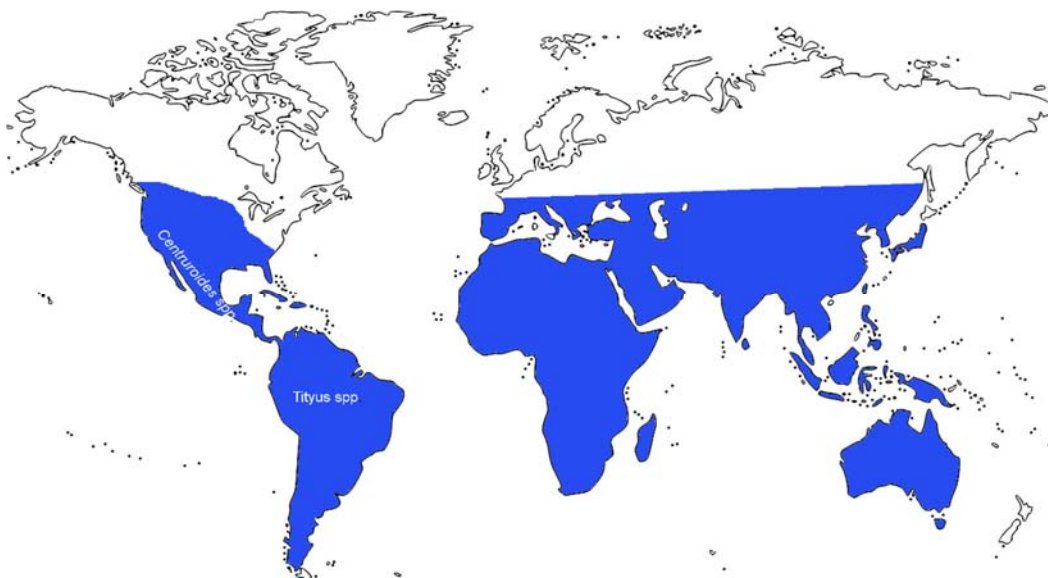
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Alacranismo

Anualmente, en el mundo se registran cerca de cinco millones de accidentes por animales ponzoñosos, entre ellos se contabilizan los ocasionados por los alacranes. Con una existencia aproximada de 360 millones de años, los alacranes son los organismos terrestres más antiguos hasta ahora identificados, de los cuales se conocen más de 2,000 especies agrupados en al menos 18 familias (Prendini 2011). En general, se distribuyen en todos los continentes exceptuando la Antártida y regiones extremadamente frías, en su mayoría habitan en las regiones tropicales y subtropicales (**¡Error! La autreferencia al marcador no es válida.**). Por la potencia de su veneno, las especies consideradas como las más peligrosas pertenecen a la familia Buthidae, de las cuales, alrededor de 30 especies representan peligro para mamíferos (Chippaux & Goyffon 2008).

Las reacciones a la intoxicación por alacranismo van de leves o moderadas (dolor, edema localizado, parestesia, vómito, diarrea, sialorrea, hipertensión, fiebre, taquicardia) a graves, en que se llega a complicaciones cardiovasculares, pulmonares y neurológicas que pueden

*Figura 1 Distribución geográfica de los alacranes.* Distribución de alacranes en las zonas tropicales y subtropicales, también se indican los géneros que habitan el continente Americano.



ocasionar la muerte del individuo.

La severidad de los efectos ocasionados por la picadura de alacrán depende tanto del artrópodo como de la persona afectada, siendo los niños y adultos mayores la población más susceptible. En la mayoría de los casos el tiempo entre la picadura y la aparición de reacciones graves no rebasa los 30 minutos dada la velocidad de distribución del veneno en el organismo intoxicado (Dehesa-Dávila & Possani 1994), por lo que el tiempo transcurrido entre el accidente y la atención médica es determinante para evitar consecuencias irreversibles.

Debido a que las picaduras de alacrán representan un problema de salud pública en varias regiones del mundo, estos animales están siendo ampliamente estudiados en investigaciones enfocadas principalmente en el análisis de los componentes del veneno y en los efectos que estos causan. Gracias a diversos estudios se sabe que el veneno de alacrán está constituido por una amplia variedad de compuestos (Rodríguez de la Vega et al. 2010), tales como: enzimas, péptidos, azúcares, aminos y lípidos, de los cuales aquellos que tienen efectos tóxicos son los más estudiados debido a su importancia médica.

La sintomatología posterior a un piquete de alacrán se debe principalmente a la actividad de las toxinas, que afectan principalmente a canales iónicos de potasio y sodio. Los más importantes desde el punto de vista de peligro para los humanos son péptidos que constan de 60-76 residuos, estabilizados por 4 puentes disulfuro y que modifican de manera específica el funcionamiento de canales iónicos de sodio (Rodríguez de la Vega & Possani 2007), los cuales son estructuras proteicas transmembranales que permiten el paso selectivo de iones que provocan cambios de potencial a través de la membrana generando señales eléctricas en la célula.

En general, las toxinas de alacrán de masa molecular pequeña hasta ahora identificadas muestran un arreglo espacial muy conservado que consiste en una  $\alpha$ -hélice y tres hebras  $\beta$  antiparalelas estabilizadas por puentes disulfuro (Mouhat et al. 2004, Possani et al. 2000) y que se clasifican según su modo de acción. Los sitios receptores 3 y 4 de los canales iónicos de sodio son ocupados por toxinas de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente; las toxinas  $\alpha$  bloquean la inactivación del canal por lo que se prolonga el potencial de acción, mientras que las de tipo  $\beta$  cambian el voltaje de activación hacia un valor más negativo, afectando la activación del

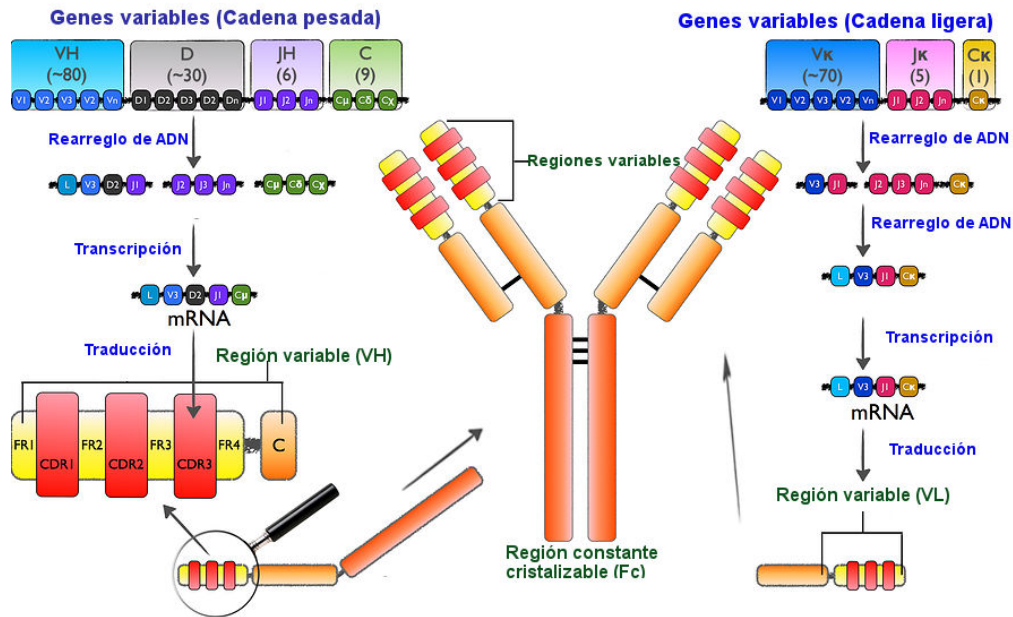
poro (Cestèle & Catterall, Possani et al. 1999), en ambos casos dando lugar a afectaciones del organismo por la pérdida en la regulación de las corrientes eléctricas. Las toxinas específicas para canales de potasio, funcionan como bloqueadores éstos y contienen alrededor de 40 aminoácidos, estabilizados por 3 o 4 puentes disulfuro (Rodríguez de la Vega & Possani 2004).

Las especies de alacranes peligrosas para el hombre distribuidas en territorio mexicano pertenecen al género *Centruroides* (Dehesa-Dávila & Possani 1994). Otra zona en donde los accidentes por picadura de alacrán son de importancia médica es Sudamérica, principalmente en algunas zonas de Brasil, Venezuela, Colombia y Argentina. En Argentina, el Ministerio de Salud de la Nación recibió poco más de 34,000 notificaciones de picaduras durante el periodo 2004-2009, mientras que en Brasil, durante el 2009 se reportaron cerca de 45,000 picaduras y 103 muertes por esta causa (Ministério da Saúde Brasil 2010). En todos los casos se estima que las cifras están por debajo de los valores reales, ya que por cuestiones geográficas o de usos y costumbres muchas de las picaduras no son reportadas a los servicios de salud. Para los países Sud-Americanos se sabe que en todos los accidentes descritos las especies involucradas pertenecen al género *Tityus*, que está ampliamente distribuido en esa zona. Actualmente, los tratamientos contra los efectos del veneno de alacrán consisten en tratamientos sintomáticos y más efectivamente, en el uso de antivenenos compuestos principalmente de anticuerpos.

## 1.2 Anticuerpos recombinantes y antivenenos

Los anticuerpos son parte fundamental en el funcionamiento del sistema inmune, se trata de moléculas de origen proteico de aproximadamente 150 kDa producidas por las células B. Están formados por cuatro cadenas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada está constituida por un dominio variable y tres dominios constantes, mientras que la cadena ligera comprende un dominio variable y uno constante. Los dominios variables de ambas cadenas son los responsables de la función de reconocimiento y unión con el antígeno, a través del parátipo. La composición hipervariable en los CDRs (Complementary

Determining Regions) les permite la interacción específica con una gran diversidad de moléculas. En ambos extremos de los CDRs se encuentran las regiones de andamiaje (frameworks) que dan soporte estructural a los dominios, de los cuales, el CDR3 es el más variable en longitud y composición debido a que está constituido con base en la combinación de los segmentos  $V_H$ , D y  $J_H$  (Figura 2).

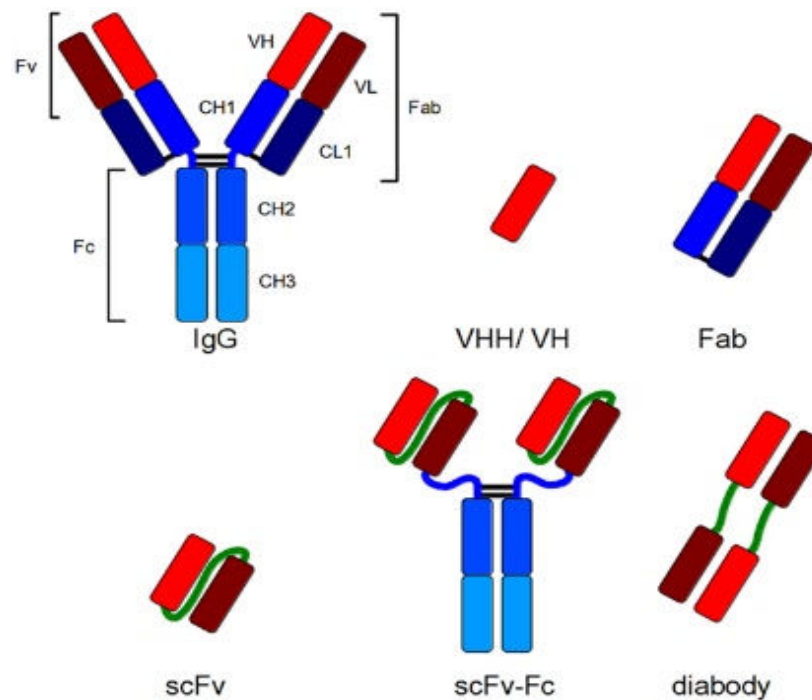


*Figura 2* Inmunoglobulina IgG humana. Descripción gráfica de los componentes de una inmunoglobulina IgG, conformada por regiones variables y constantes, las primeras responsables de la especificidad hacia el antígeno contienen regiones de andamiaje (FR) y regiones de complementariedad (CDR) que son las zonas de mayor variabilidad de la molécula.

La generación de la gran diversidad en la composición de los anticuerpos es posible mediante mecanismos de recombinación somática, proceso en el que los distintos genes de los dominios se rearrreglan y combinan entre sí generando la posibilidad de millones de moléculas distintas. De manera natural, cuando un anticuerpo reconoce a un antígeno, el linfocito B que lo expresa en su superficie recibe estímulos para su proliferación. A partir de entonces, la secuencia de ADN que codificará para la inmunoglobulina sufre cambios con una elevada tasa de mutación (cinco órdenes de magnitud mayor que la que se lleva a cabo normalmente); este proceso de hipermutación permite la generación de anticuerpos de mayor

especificidad y afinidad por el antígeno presentado. Se estima que en conjunto, ambos eventos pueden generar un repertorio de más de  $10^{12}$  variantes (Lefranc & Lefranc 2001). Puede considerarse que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer prácticamente a cualquier antígeno a través de los anticuerpos y por tanto representan el principal mecanismo de defensa para bloquear la actividad de una molécula que pueda ser nociva al organismo.

Dado su potencial, las inmunoglobulinas han sido ampliamente estudiadas y empleadas en diferentes aplicaciones. A la fecha, más de 20 anticuerpos monoclonales han sido aprobados por la FDA para su uso clínico (Nelson & Reichert 2009, Nelson et al. 2010), la mayoría de ellos como tratamiento anticancerígeno o enfermedades del sistema immune; ha sido en la



*Figura 3* Inmunoglobulina IgG y formatos derivados. Se muestra la representación esquemática de una IgG convencional compuesta de la región Fc que incluye dos cadenas pesadas constantes (CH) y la región Fab formada por una cadena ligera y una cadena pesada que a su vez incluyen una región variable (VH o VL) y una región constante (CL); algunos de los fragmentos funcionales derivados de la IgG también se muestran. Imagen modificada de (Frenzel et al. 2013).



última década que el número de pruebas clínicas con anticuerpos terapéuticos se ha incrementado considerablemente (Oldham & Dillman, 2008; Reichert & Dhimolea, 2012). Sin embargo, algunas de las limitaciones funcionales de los anticuerpos terapéuticos tienen que ver con su farmacocinética, pobre acceso a tejidos, interacciones con el sistema inmune del organismo receptor y otros derivados de sus características estructurales, por lo que muchos estudios se han enfocado en el análisis y optimización de los anticuerpos como moléculas terapéuticas.

La necesidad de contrarrestar los efectos de un envenenamiento ha dado lugar al desarrollo de antivenenos, estrategia que inicia en 1894 con la preparación del primer antiveneno por Calmette (KRIFI et al. 1999). La terapia utilizada para contrarrestar los efectos nocivos del veneno de los alacranes es a través de la inmunización pasiva llamada también seroterapia (Calderón-Aranda et al. 1999). La seroterapia consiste en la administración de anticuerpos que neutralicen las toxinas circulantes. En la etapa inicial de su implementación, era utilizado el suero total obtenido de caballos hiper-inmunizados y aunque el suero era eficiente para neutralizar el veneno, también provocaba reacciones de hipersensibilidad, ya que contenía muchos otros componentes (principalmente albúmina). Además, se presentaban reacciones por la activación del complemento del sistema inmune ocasionadas por las regiones Fc de las inmunoglobulinas equinas, lo que lo convertía en un agente terapéutico poco seguro. Con el fin de evitar las reacciones adversas, se ha buscado obtener inmunoglobulinas puras, siendo el paso más ventajoso la obtención de fragmentos  $F(ab')_2$  mediante la digestión enzimática de las IgGs; dichos fragmentos conservan la especificidad hacia su antígeno y con la eliminación de la región Fc prácticamente desaparecen las reacciones inmunogénicas; a esta generación de antivenenos se les ha llamado faboterápicos. Aun cuando en muchos casos, la terapia a base de sueros policlonales son efectivas, todavía hay aspectos que deben ser optimizados (Rasmussen et al. 2007); algunos están relacionados con las reacciones adversas debido a su origen heterólogo, variaciones entre lotes de producción sumado al hecho que los anticuerpos antígeno-específicos representan únicamente alrededor del 1% del contenido, el resto es parte de la respuesta dirigida contra otros componentes de la glándula venenosa utilizada en la inmunización de los animales.

Para contender con estas desventajas y ante la imposibilidad de obtener anticuerpos humanos de una fuente inmunizada, se ha propuesto que los componentes de los antivenenos sean anticuerpos de naturaleza recombinante (Aubrey et al. 2006, Espino-Solis et al. 2009), principalmente los fragmentos de anticuerpos: Fab's y scFv's (Figura 3), los cuales están compuestos por las regiones variables con conservación (Fab's) o pérdida (scFv's) de la región constante CH1. Al mantenerse intactas las regiones involucradas en el reconocimiento de su epítipo, las moléculas no pierden la capacidad de reconocer a sus antígenos y su menor tamaño con respecto a las IgG mejora sus propiedades de difusión lo que les permite penetrar a los tejidos y distribuirse con mayor rapidez representando una ventaja para el tratamiento de problemas agudos, entre ellos, el envenenamiento.

La respuesta no dirigida se ha abordado buscando anticuerpos específicos para los principales componentes del veneno. Gracias a esta estrategia se ha observado que anticuerpos neutralizantes del componente más tóxico pueden neutralizar también la mayoría de efectos causados por el veneno total (Licea et al. 1996, Riaño-Umbarila et al. 2005, 2013). En ese sentido, las técnicas de ADN recombinante han sido exitosas para la generación y selección de anticuerpos de alta afinidad para una gran diversidad de antígenos y la relación directa fenotipo-genotipo característica del sistema de despliegue en fagos o levaduras representa una gran ventaja en la selección de anticuerpos específicos a partir de grandes repertorios (Laffly & Sodoyer 2005, Mersmann et al. 2010, Thie et al. 2008).

### 1.3 Despliegue en fagos filamentosos

Desde el inicio de su desarrollo, hace casi dos décadas, la técnica de despliegue en fagos ha permitido el despliegue de péptidos y proteínas para aplicaciones diversas (Hammers & Stanley 2014, Paschke 2005, Smith 1985). Los fagos filamentosos son virus no líticos capaces de infectar únicamente a bacterias que expresan *pilus* a través de la unión de su proteína pIII con dicha estructura. La infección comienza cuando el dominio N2 de pIII se une al extremo del *pilus*; enseguida del contacto, el *pilus* se retrae y el genoma viral se transloca al citoplasma de la bacteria, en donde la cadena de ADN con la misma polaridad

que el mRNA es llevada a una forma superenrollada de doble cadena (forma replicativa) (Figura 4).

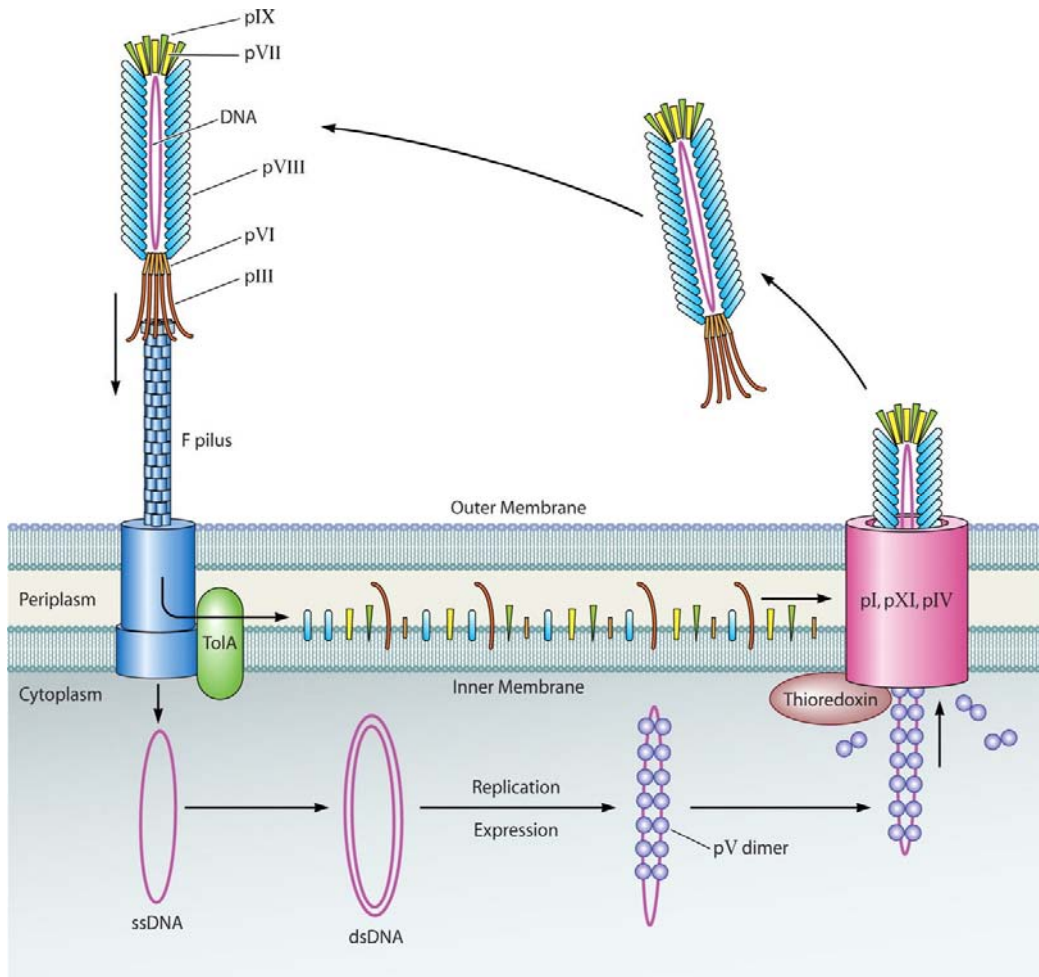
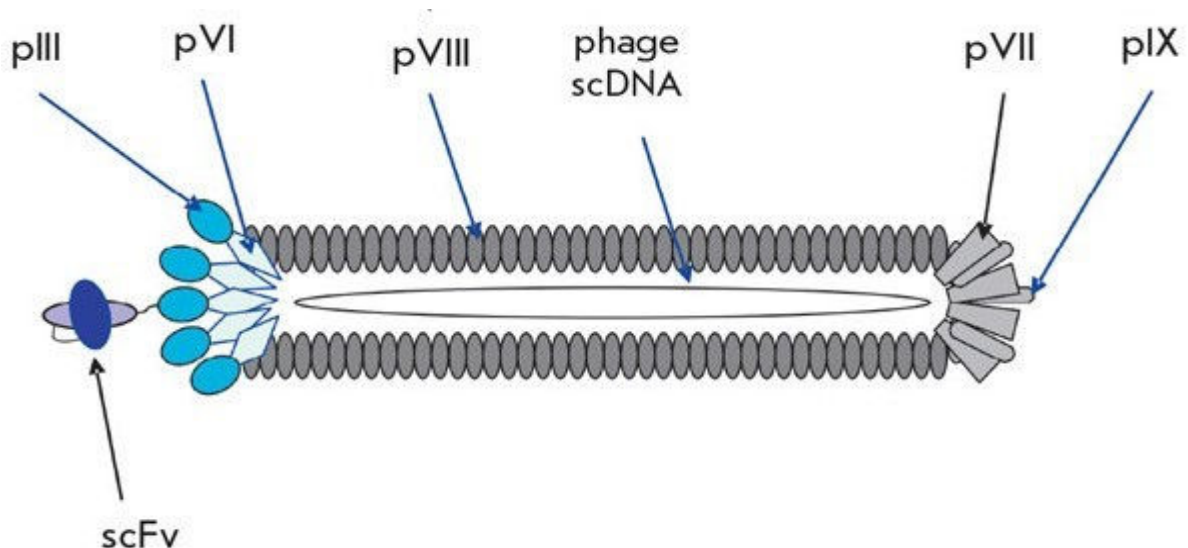


Figura 4. Ciclo infeccioso de un bacteriofago filamentoso. Al contacto con el pilus, el ADN del virus se trasloca al citoplasma de la bacteria, en donde se lleva a cabo la replicación y expresión de las proteínas necesarias para el ensamblaje de la partícula. Tomada de (Huang et al. 2012).

La forma replicativa sirve como templado para la expresión de los genes del fago y así da lugar a las proteínas de ensamble de nuevas partículas virales, dicho proceso ocurre en la membrana citoplásmica y los fagos son secretados de la bacteria en cuanto se ensamblan. El genoma de la partícula viral está encapsulada en una forma cilíndrica de aproximadamente 900 nm y a lo largo de la cubierta se encuentran alrededor de 2,700 copias de pVIII, en uno de los extremos se observan de tres a cinco copias de las proteínas pVII y pIX, en el otro extremo se encuentran cinco copias de pVI y pIII (Figura 5)

## 1.4 Anticuerpos desplegados en fagos

Existen dos vías por las cuales es posible llevar a cabo el despliegue de péptidos y proteínas. La primera en que el ADN deseado es clonado directamente en el genoma viral, lo que implica la manipulación de todo el material genético del fago. La segunda vía consiste en utilizar un plásmido modificado (fagémido) que contiene: un origen de replicación bacteriano



*Figura 5.* Esquema de un fago filamentoso. El genoma de la partícula viral está encapsulada en una forma cilíndrica de aproximadamente 900 nm conformada por las proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII. En este caso, la proteína desplegada (scFv) se expresa adyacente a pIII.

(para la producción del plásmido), un origen del fago (que permite la replicación viral), el gen de la proteína utilizada para el despliegue, un promotor y un gen de resistencia hacia un antibiótico para su fácil selección.

Las cinco proteínas de la cápside del fago han sido utilizadas para el despliegue de péptidos o proteínas. Sin embargo, pIII la proteína que más se utiliza en el despliegue de anticuerpos debido a que permite inserciones de mayor tamaño y da la posibilidad de despliegue monovalente.

Una vez que las bacterias son transformadas con el fagémido, son infectadas con un fago ayudador (*helper*) que contiene la maquinaria para expresar las proteínas de empaquetamiento, pero con replicación menos eficiente que el fagémido silvestre. Las células infectadas expresan todas las proteínas del fago silvestre, codificadas en el genoma del fago ayudador, así como la proteína de fusión codificada por el fagémido; debido a que la información del fago ayudador es pobremente empaquetada, se puede considerar que casi todas las partículas producidas contienen la información del fagémido. Las ventajas de este sistema son el tamaño y la fácil manipulación del vector comparado con la dificultad de clonar el material en los vectores virales sin alterar la compleja estructura de su genoma. Por otro lado, si se requiere realizar una selección que refleje afinidad real por un cierto ligando, se debe obtener un despliegue monovalente, como el logrado con el fagémido y la proteína pIII.

Una de las aplicaciones más poderosas del despliegue en fagos se ha visto reflejada en la ingeniería de anticuerpos, ejemplo de ello son fragmentos Fab y scFv que han sido expresados en la superficie de partículas virales M13 sin pérdida aparente de la afinidad o la especificidad del anticuerpo. Con el uso de esta tecnología, ha sido posible aislar moléculas con afinidades equiparables a las obtenidas mediante uso de hibridomas, a partir de bibliotecas inmunes o no inmunes. Las regiones codificantes para las cadenas VH y/o VL pueden ser obtenidas a partir de ADNc de animales inmunizados o no inmunizados, o incluso de los genes de línea germinal. Después, el repertorio desplegado es sometido a varias rondas de tamizado, en el cual se inmoviliza un antígeno y se pone en contacto con la población de fagos, por medio de lavados se eliminan aquellos que despliegan las proteínas sin capacidad de reconocimiento por el antígeno. Los que resultan con una cierta afinidad son

seleccionados, y dado que se tiene una relación directa entre el fenotipo y el genotipo, los fagos aislados contienen el gen que codifica para el fragmento de anticuerpo desplegado. Los tamizados se realizan repetidamente, siendo necesarios de 2 a 5 ciclos según el sistema de selección y el antígeno de interés (Figura 6).

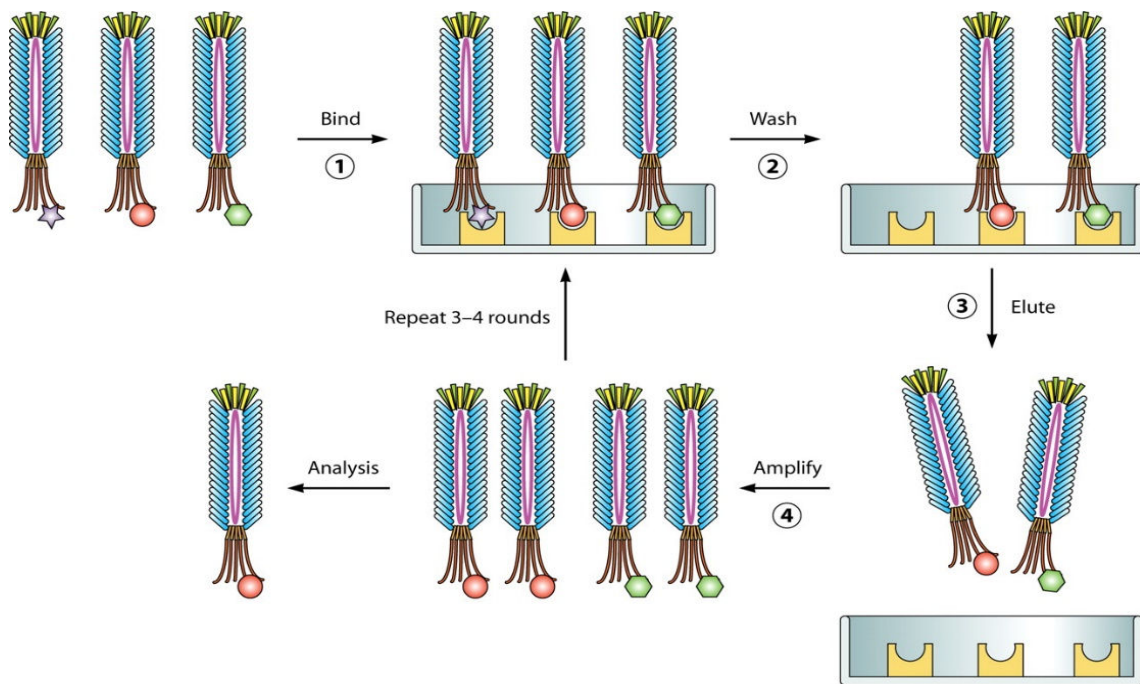


Figura 6. Esquema de una ronda de tamizado. La colección de partículas con cada molécula desplegada se pone en contacto con el antígeno, después de lavar para eliminar los no específicos, se recuperan aquellos que quedaron unidos al antígeno para su amplificación y análisis. Imagen tomada de (Huang et al. 2012).

Aún con las ventajas que proporciona la selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes, la obtención de moléculas de alta afinidad está restringida por la ausencia de mutaciones somáticas, estrategia que permite a los sistemas *in vivo* generar anticuerpos específicos y afines a su antígeno. Además, se ha observado que es más probable aislar ligandos de alta afinidad a partir de repertorios grandes o de fuentes inmunes. Para los casos en que las moléculas seleccionadas sean de baja afinidad, se ha recurrido a ciclos de evolución dirigida

(Hida et al. 2007), en este proceso de maduración *in vitro* se propicia la introducción de mutaciones sitio dirigidas o al azar (error-prone PCR) (Cadwell & Joyce 1992, Chiang et al. 1993) generando variabilidad, tomando como templado los anticuerpos aislados. El ciclo se completa realizando rondas de selección con el nuevo repertorio para obtener aquellos anticuerpos que hayan mejorado sus propiedades funcionales, hasta obtener moléculas con las características deseadas.

## 1.5 El género *Tityus* y el escorpionismo en Brasil

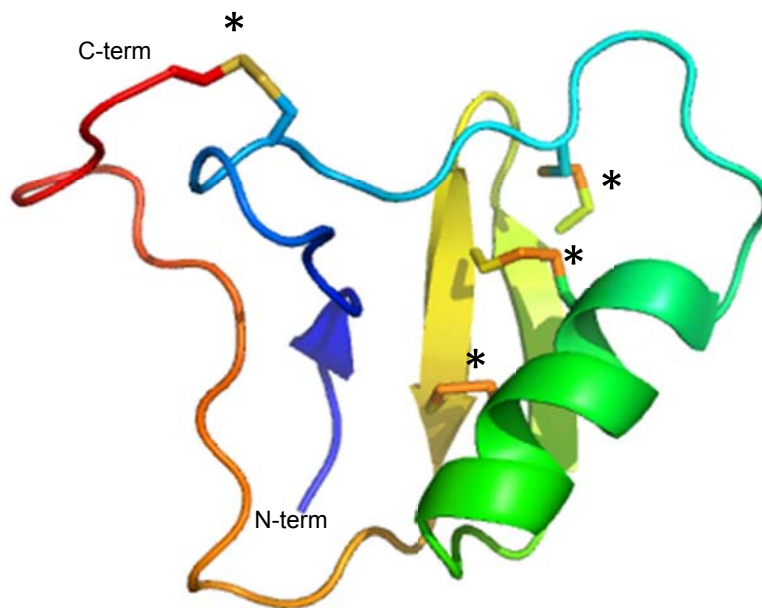
Los alacranes del género *Tityus* se distribuyen en varias regiones de Sudamérica, en la *Tabla 1* se enlistan las especies con mayor incidencia de picaduras reportadas, la dosis letal capaz de matar a la mitad de la población inoculada (LD<sub>50</sub>) y el péptido más tóxico hasta ahora encontrado en sus venenos.

*Tabla 1.* Listado de las especies causantes de la mayoría de accidentes por picadura de alacrán en Sudamérica.

Especie	Región endémica	LD50 (mg/kg)	Péptido más tóxico	Referencia
<i>T. serrulatus</i>	Brasil	1.2	Ts1 (Gamma)	(Nishikawa et al. 1994)
<i>T. bahiensis</i>	Brasil	1.06	Tb1	(Nishikawa et al. 1994)
<i>T. pachyurus</i>	Colombia	4.8	Tpa2	(Barona et al. 2004)
<i>T. fasciolatus</i>	Brasil	3.65		(Wagner et al. 2003)
<i>T. discrepans</i>	Venezuela	8.8	Gamma-like	(Parrilla-Alvarez et al. 1999)
<i>T. stigmurus</i>	Brasil	0.77	Tst1	De Sousa L, <i>J Venom Anim Toxins</i> , 1984
<i>T. trivittatus</i>	Argentina	ND	Tt1g	(Coronas et al. 2014)

En Brasil, la incidencia de picaduras de alacrán ha ido incrementando, según los reportes de los últimos años, tan solo en el 2012 se registraron 64,027 casos incluyendo 89 muertes (Reckziegel & Pinto 2014); existe una amplia diversidad de población de escorpiones, sin

embargo, la especie *Tityus serrulatus* es la más estudiada de la región, en parte porque es la principal responsable del envenenamiento por picadura de alacrán en ese país. Su componente más tóxico, la toxina Ts1 o  $\gamma$  (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) consta de 61 aminoácidos, 4 puentes disulfuro y representa alrededor del 15% del veneno total.



*Figura 7.* Estructura tridimensional de la toxina Ts1. Estructura determinada por difracción de rayos X (resolución de 1.16 Å), se observa una alfa hélice y tres hojas beta con cuatro puentes disulfuro (\*) (Pinheiro et al. 2003).

La toxina Ts1 afecta el funcionamiento de canales de sodio (Becerril et al. 1997, Rodríguez de la Vega & Possani 2005), pertenece a la familia de las toxinas  $\beta$  y está fuertemente relacionada con la intoxicación debida a piquete de alacrán. De ahí su importancia terapéutica y la necesidad de contar con ligandos neutralizantes de sus efectos y de fácil difusión, ya que se ha observado que el veneno escorpiónico se distribuye rápidamente de la sangre a los tejidos.

La efectividad de un antiveneno depende de las características farmacocinéticas de éste y más aún del tiempo de retraso entre el piquete y la administración del antiveneno.



Otro aspecto importante en la elaboración de cualquier agente terapéutico es que éste debe ser seguro, por lo que se han enfocado los esfuerzos para que los anticuerpos que puedan tener aplicaciones médicas sean de origen humano y no conlleven reacciones adversas por su origen heterólogo. Por ejemplo en 1990, 11% de los anticuerpos en pruebas clínicas eran totalmente humanos, cifra que creció a 40% para el año 2000 (Nelson et al. 2010).

De manera que en este trabajo se buscó la obtención de anticuerpos de origen humano, en formato scFv que puedan neutralizar los efectos tóxicos de Ts1 y otras toxinas similares, los cuales puedan ser la base para la elaboración de un antivenenos más seguro y efectivo comparados con los ya existentes.

## **2. HIPÓTESIS**

Es posible aislar un fragmento de anticuerpo específico que neutralice los efectos del componente más tóxico del veneno del alacrán *Tityus serrulatus* a partir de un repertorio de scFv's no inmune de origen humano mediante la técnica de despliegue en fagos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Obtener anticuerpos en formato de cadena sencilla de origen humano capaces de neutralizar los efectos de la principal toxina (Ts1) del veneno del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*.

### **3.2 Objetivos particulares**

- Aislar de un banco de scFv's, clonas específicas contra la toxina Ts1 utilizando el sistema de despliegue en fagos.
- Caracterizar a nivel de estructura primaria los fragmentos variables de cadena sencilla.
- Obtener los scFvs en forma soluble.
- Probar la capacidad de los scFv's para neutralizar los efectos de la toxina Ts1 *in vivo* en ratones.
- Evolucionar las secuencias humanas que resulten seleccionadas, en caso de que éstas no tengan la capacidad de proteger los efectos tóxicos de Ts1.
- Determinar si los fragmentos seleccionados tienen reactividad cruzada con otras toxinas provenientes de alacranes del género *Tityus*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas y plásmidos usados en la clonación y expresión

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron: **XL1-Blue** MRF':  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F' \text{ proAB lacI}^q\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^r)]$  y **TG1**:  $F' [traD36 \text{ proAB}^+ \text{ lacI}^q \text{ lacZ}\Delta M15]supE \text{ thi-1 } \Delta(\text{lac-proAB}) \Delta(\text{mcrB-hsdSM})5, (r\kappa^{\bar{}}m\kappa^{\bar{}})$ .

Para la generación de la biblioteca y el posterior despliegue en fagos, se utilizó el fagémido pSyn2, el cual presenta un sitio de clonación flanqueado por los sitios de restricción de las enzimas SfiI y NotI, seguido de secuencia *c-myc* que permite el reconocimiento de la molécula mediante el uso de anticuerpos comerciales específicos para ese epítipo. Posee un gen de resistencia a ampicilina, además de un péptido señal que dirige el paso de la fusión del citoplasma al periplasma celular. Como es característico en los fagémidos presenta un origen de replicación para *E. coli* y otro para el fago M13.

Para la expresión de los scFv en forma soluble se utilizó el plásmido pSyn1 que a diferencia de pSyn2 no con tiene el gen de la proteína pIII, en el extremo 3' de la construcción contiene la información para agregar una etiqueta de seis histidinas que permite llevar a cabo la purificación de la proteína, un péptido señal pelB para promover la exportación de los proteínas al periplasma, así como una etiqueta *c-myc* para la inmunodetección del producto expresado (Figura 8). En pSyn1 la expresión es inducida con la adición de IPTG. Para producción de los fago anticuerpos se utilizó Fago Ayudador M13KO7 (New England Biolabs), el cual es derivado del fago M13 y presenta resistencia a kanamicina.

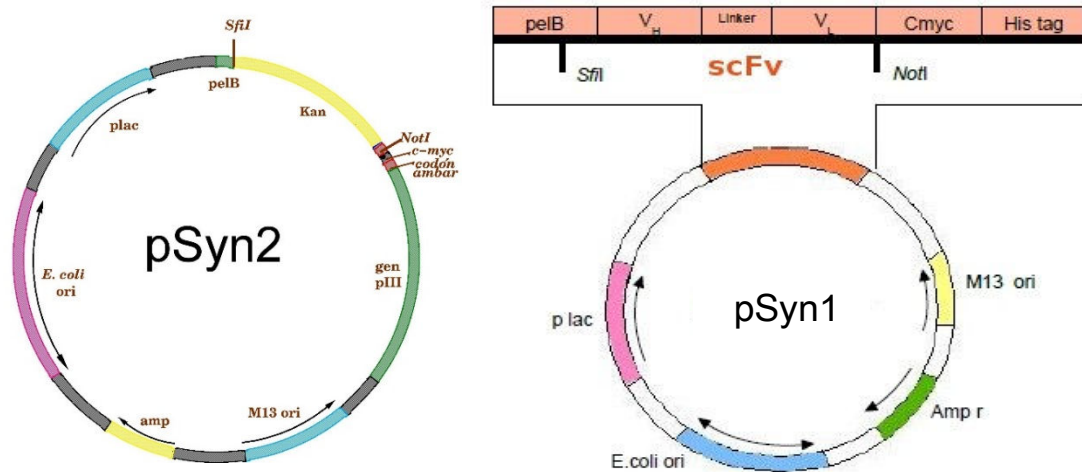


Figura 8. Izquierda: Fagémido pSyn2 utilizado para el despliegue de los scFv's. Derecha: pSyn1, plásmido utilizado para la expresión de los fragmentos en forma soluble, se muestra la posición de los elementos de la construcción.

## 4.2. Soluciones y medios de cultivo

Las soluciones y medios de cultivo utilizados para el estudio se detallan a continuación:

LB (1L: 10g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

2xYT (1L: 16g bacto-triptona, 10g extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

SOB (1L: 5g bacto-triptona, 1.25g extracto de levadura, 0.125 g NaCl, 2.5 ml KCl 0.25 M, pH 7.0)

SOC (10.2 ml: 10 ml SOB, 0.1 ml glucosa 2M, 0.1 ml MgCl<sub>2</sub> 1M)

PBS 10X (1 L: 14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80g NaCl, 2g KCl, pH 7.4)

Amortiguador de carbonatos 0.05 M (250 ml: 1.32g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.05g NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6)

Para el proceso de lisis alcalina:

Solución I (100 ml: 0.9 g dextrosa, 2 ml EDTA 0.5M pH 8, 1.25 ml Tris 2M pH 8)

Solución II (10 ml: 1 ml SDS 10%, 0.2 ml NaOH 10N)

Solución III (100 ml: 60 ml acetato de potasio 5M, 40 ml ácido acético)

PPB (sacarosa 20%, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl pH 8)

### 4.3 Antígenos

El veneno utilizado en este estudio se extrajo por estimulación eléctrica de alacranes de cada especie, a partir de los cuales se purificaron las principales toxinas siguiendo métodos ya reportados por el grupo, Cn2 (Zamudio et al. 1992), Tpa2 (Barona et al. 2006), Tc49b (Batista et al. 2004). El veneno del alacrán *Tityus serrulatus* fue una donación del Instituto Butantan (Sao Paulo, Brasil); las fracciones tóxicas se obtuvieron mediante el uso de una columna Sephadex G-50, la fracción II se sometió a una cromatografía de intercambio iónico con una columna CM-celulosa (Possani et al. 1981), para obtener la toxina Ts1 con mayor pureza se agregó un paso de purificación por HPLC utilizando una columna de fase reversa C18 (Petricevich et al. 2007).

### 4.4 Despliegue en fagos de los scFv's

Se utilizó una biblioteca generada y reportada anteriormente (Riaño-Umbarila et al. 2005). El repertorio de genes codificantes para las VH y VL de un individuo sano fue amplificado con oligos específicos para cada familia de inmunoglobulinas, los fragmentos obtenidos fueron ensamblados por combinatoria mediante un péptido conector de 15 aminoácidos, dando lugar a una biblioteca humana de fragmentos de anticuerpos en formato de cadena sencilla (scFv) clonados en *E. coli* de tamaño  $1 \times 10^8$  clonas (Riaño-Umbarila et al. 2005). Este banco fue infectado con el fago ayudador MK13O7, lo cual permitió el despliegue de los scFv's en la superficie del fago. Con los anticuerpos desplegados se realizaron rondas de tamizado. Para cada ronda, 15ml de 2xYT-Amp (200µg/ml)-Tc (15µg/ml)- Glu1% se inocularon con el banco obtenido, incubando a 37°C, 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.7. Se adicionó el fago ayudador en una multiplicidad 1:10 (bacterias:fagos), e incubó a 37 °C sin agitación durante 30 min. Durante los siguientes 30 minutos, el cultivo se mantuvo a 37 °C en agitación. El total del cultivo fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 25 ml de 2xYT-Amp (200µg/ml)-Tc (15µg/ml)-Km (70µg/ml), los cultivos se incubaron toda la noche a 30 °C, 250 rpm. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos 10 minutos a 5000 rpm, 4 °C. El sobrenadante, el cual contiene los fago-anticuerpos se transfirió a tubos limpios y se le agregó

1/5 del volumen de la mezcla de PEG 8000 al 20%/NaCl 2.5 M para precipitar los fagos, se incubó a 4 °C durante 1 hora, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se retiró completamente el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en PBS 1X (se utilizó un volumen igual al 30% de la mezcla de PEG/NaCl añadida inicialmente), se agregó PEG/NaCl (15 % del volumen total obtenido), se incubó durante 1 hora en hielo, pasado este tiempo, se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se eliminó completamente el sobrenadante y se agregaron 2 ml de PBS 1X para resuspender los fagos, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.42 µm. Los fago anticuerpos obtenidos fueron utilizados para cada ronda de selección.

#### 4.4.1 Construcción de una nueva biblioteca

Un nuevo repertorio de scFv fue construido en conjunto con los doctores Rivelino Juárez y Verónica Quintero (datos no publicados), a partir de muestras de sangre (5 ml) de 56 donadores sanos. Se realizaron las amplificaciones de las cadenas pesadas y ligeras para las diferentes familias como en Riaño-Umbarila et al., 2005. Las muestras individuales de RNA fueron agrupadas en 5 bloques que se amplificaron independientemente para promover la recuperación de la mayor variabilidad posible.

#### 4.5 Selección

La selección de los anticuerpos de cadena sencilla específicos se realizó mediante varias rondas de tamizado, para lo cual se utilizó la toxina gamma (Ts1) de *T. serrulatus* acoplada a un inmunotubo. Con los anticuerpos desplegados se realizaron rondas de tamizado. Con el objetivo de la recuperación de variantes no específicas, al inicio de cada ronda se realizó un paso de sustracción o selección negativa que consiste en incubar los fagos-anticuerpos en un inmunotubo previamente sensibilizado con el saturante a utilizar en la ronda, durante 1 hora a 37 °C. Los fago-anticuerpos recuperados, es decir que no se unieron al saturante fueron sometidos al tamizado, se inmovilizó la toxina en un inmunotubo, en concentraciones decrecientes para cada ronda, y se saturó con BSA 1%, gelatina 1% o leche 1% (preparadas con PBS) alternadamente en cada ronda, se agregó 1 ml de fago-anticuerpos y se dejó

incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación y 2 horas sin agitación, pasado ese tiempo se realizaron de 10 a 20 lavados con PBS 1X-Tween 0.1% y 20 veces con PBS 1X para eliminar los fagos que no se unieron al antígeno. Los fagos unidos se recuperaron agregando 1 ml de células XL1blue en fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente  $DO_{600}=0.7$ ). Las células infectadas fueron utilizadas para subsecuentes rondas de tamizado. Después de tres rondas, se seleccionaron clonas al azar para probar su capacidad de reconocimiento a la toxina mediante la producción de fago-anticuerpos y realizando un ensayo de ELISA. Como control, se realizaron pruebas de ELISA contra los saturantes utilizados.

## 4.6 ELISA

En una placa de 96 pozos se agregaron 100  $\mu$ l de antígeno (5 $\mu$ g/ml) a cada pozo. Se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con PBS 1X. Para bloquear, se agregaron 200  $\mu$ l de BSA 1% por pozo y se incubó durante 2 horas a 37 °C, se eliminó el sobrenadante y la placa se lavó tres veces con PBS-Tween 0.1% (PBST). En cada pozo, se agregaron 50  $\mu$ l del sobrenadante de cada cultivo y 50 $\mu$ l de PBS. Pasado el tiempo de incubación (1 h, 37 °C) se realizaron tres lavados con PBST. Se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo conjugado a peroxidasa anti-M13 (1:2000 en PBS 1X) a cada pozo incubando la reacción durante 1 h a 37 °C. Después de realizar tres lavados con PBST, se adicionaron 100  $\mu$ l del sustrato (OPD), la reacción se desarrolló en oscuridad a temperatura ambiente hasta obtener una coloración amarilla (10 minutos). Para detener la reacción se utilizaron 50  $\mu$ l de HCl 6 N en cada pozo, la intensidad de la señal se cuantificó en un lector de ELISA a 492 nm.

## 4.7 Producción de fago-anticuerpos para ELISA

Se realizaron cultivos en placas de 96 pozos con 100 $\mu$ l de 2xYT-Amp (200 $\mu$ g/ml)-Tc (15 $\mu$ g/ml)-Glu1% inoculados con una colonia aislada por pozo. La placa se incubó a 37 °C, 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.7. Se adicionó el fago ayudador en una multiplicidad 1:10 (bacterias:fagos), el cultivo se incubó a 37 °C sin agitación durante 30 min. Durante los siguientes 30 min se mantuvo a 37 °C en agitación, la placa se centrifugó a 4000rpm durante

10 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 125 ml de 2xYT-Amp (200µg/ml)-Tc (15µg/ml)-Km (70 µg/ml) incubándose toda la noche a 30 °C, 250 rpm. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm, 4 °C. El sobrenadante se utilizó para el ensayo de ELISA de fago anticuerpos.

## 4.8 Subclonación

A partir de los cultivos de las rondas realizadas se purificó el ADN plasmídico por lisis alcalina, el ADN obtenido se digirió con NotI a 37 °C durante 5 horas, después con SfiI incubando a 50 °C por 5 horas. Los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa y se recuperaron los fragmentos de tamaño correspondiente a un scFv, los fragmentos se ligaron en pSyn2 doble digerido en una relación molecular 1:3 (vector:inserto). El producto de la ligación fue electroporado en *E. coli* X11blue electrocompetentes, 5 µl de ligación por cada 50 µl de bacterias con un choque eléctrico de 2500 V. Inmediatamente después del choque se añadió 1 ml de medio SOC y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se sembraron 10 µl en LB-agar con ampicilina para conocer el tamaño del banco obtenido, el resto se utilizó para las rondas de tamizado.

## 4.9 Expresión de scFv

Los plásmidos pSyn2 con los fragmentos seleccionados fueron digeridos con las enzimas NotI 37 °C y SfiI 50 °C al igual que el vector pSyn1. Después de purificarlos, el ADN se subclonó en el vector de expresión pSyn1 (Figura 8). La cepa TG1 de *E. coli* fue transformada con la construcción mediante electroporación.

Se inocularon 5 ml de medio de cultivo 2xYT-Amp (200 µg/ml) con una colonia aislada del scFv correspondiente y se incubó a 37 °C a 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se agregaron 5 ml de este cultivo en 500 ml de 2xYT-Amp (200 µg/ml)-Glucosa 1% y se incubó a 37 °C, 200 rpm hasta una DO<sub>600</sub> de 0.7. Se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 8 horas a 30 °C, 200 rpm. Se colectaron las células por centrifugación durante 15 min a 6000 rpm. El paquete celular se resuspendió en 12.5 ml de PPB e incubó en hielo durante 20 minutos. Después de ese tiempo se centrifugó a 7000 rpm



durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. El pellet restante se resuspendió en 5 mM MgSO<sub>4</sub> (1/40 del volumen de cultivo), la incubación fue en hielo, durante 20 minutos. Se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min y se reunieron ambos sobrenadantes para ser dializados. La diálisis se llevó a cabo en membranas Biotech MWCO 3.5 KDa. Se lavaron las membranas con agua tetradestilada y PBS 1X. La muestra se dializó durante 2 horas a 4 °C contra 4 litros de PBS 1X. Se cambió el PBS 1X y se dejó dializando toda la noche.

#### 4.10 Purificación del anticuerpo

Se empacó una columna utilizando 1 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN) para purificación por afinidad a metales de las histidinas. Se equilibró la columna utilizando 5 mL de buffer 20 mM imidazol en PBS 1X). Se aplicó la muestra dializada a la columna. Se lavó con 5 mL de buffer de lavado (35 mM de imidazol en PBS 1X). El scFv se eluyó con 700 µl de buffer 350 mM imidazol en PBS 1X. La muestra fue aplicada a una columna de exclusión molecular, la proteína purificada fue cuantificada por absorbancia, a 260 nm, tomando en cuenta el coeficiente de extinción calculado teóricamente con base en la secuencia de aminoácidos.

#### 4.11 Detección del scFv (Western blot)

Se corrió un gel de poliacrilamida 12% con las muestras a analizar. La membrana de nitrocelulosa (del tamaño del gel) se embebió en buffer de transferencia durante 10 min. Se preparó el sándwich de gel de poliacrilamida-membranas sobre el cassette de transferencia colocando primero capas de papel filtro, después la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida, y finalmente capas de papel filtro para evitar corto circuito entre los electrodos. La transferencia se llevó a cabo durante 1 hora. Una vez que las proteínas se encuentran en la membrana, ésta fue bloqueada con PBS 1X-Tween 0.05%-Leche 2% durante 1 hora. Se eliminó la solución y se agregó anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa de rábano en PBS 1X dilución 1:5000. Después de 1 hora de incubación se decantó la solución y se lavó 5 veces con PBS 1X. Se reveló con diaminobencidina en amortiguador de fosfato de sodio 50mM, pH 7.4 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.2 %. La reacción se detuvo eliminando el sustrato y lavando con agua.

## 4.12 Error-prone PCR

Para introducir mutaciones al azar a lo largo de la secuencia de ADN, se llevaron a cabo amplificaciones por error-prone PCR, las condiciones de temperatura fueron las de un PCR convencional y la mezcla de reacción como se indica en el siguiente cuadro:

	Tasa Alta ( $\mu$ l)	Tasa Media( $\mu$ l)	Tasa Baja( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	vol final 300 $\mu$ l	vol final 300 $\mu$ l	vol final 300 $\mu$ l
Buffer 10X	30	30	30
dNTP's (10 mM de dCTP y dTTP, 2 mM dATP y dGTP)	30	30	30 dntps 5mM c/u
Oligo directo (10pmol/ $\mu$ l)	12	12	12
Oligo reverso (10pmol/ $\mu$ l)	12	12	12
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	84	84	84
$\beta$ -mercaptoetanol 1M	3	-	-
DMSO	3	-	-
MnCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5	1.5	-
Templado (plásmido)	20 ng	20 ng	20 ng
Enzima (Taq polimerasa)	3u	3u	3u

### 4.13 Determinación de LD<sub>50</sub>

El procedimiento para determinar la LD<sub>50</sub> por vía intraperitoneal se basó en el método “Up-and-Down” (Dixon 1965), tomando una hora como lapso de tiempo para evaluar muerte o sobrevivencia de los ratones inyectados. El ensayo se realizó en ratones machos CD1 con peso de alrededor de 22 gramos, la dosis inicial inyectada fue de 5.8 µg de la toxina (LD<sub>50</sub> reportada vía subcutánea (Mendes et al. 2008)).

### 4.14 Pruebas de neutralización

El scFv purificado por IMAC y Cromatografía de exclusión molecular recuperado en PBS, fue cuantificado por absorbancia. Se realizó una mezcla con relación molar 1:10 (Ts1:scFv) incubada 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, la mezcla fue administrada a ratones hembras de la cepa CD1 de entre 18 y 20 gramos de peso, los animales fueron monitoreados durante las siguientes 24 horas.

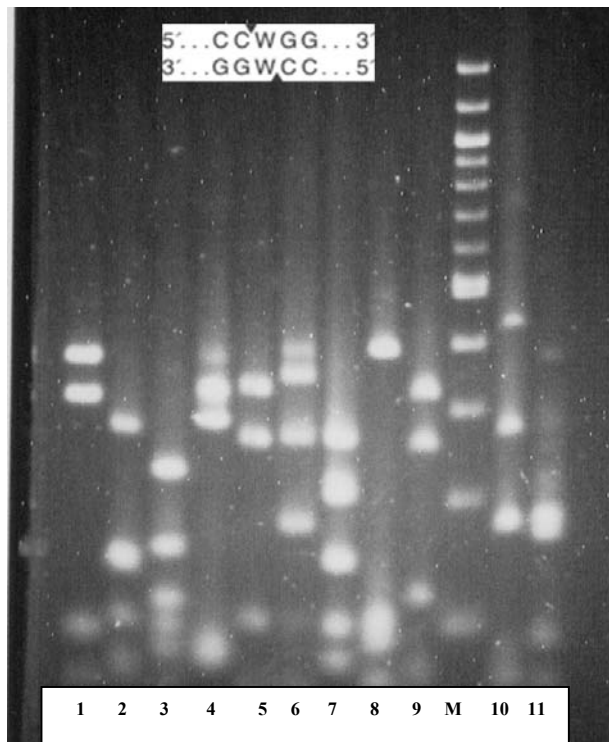
### 4.15 Modelado molecular del scFv

Se llevó a cabo un modelado por homología del scFv a partir de la secuencia de aminoácidos predicha. Se utilizó el servidor Web Antibody Modelling.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtención de scFv's que reconocen Ts1

Al inicio del estudio se tomaron al azar diez clonas aisladas de la biblioteca generada previamente en el laboratorio (Riaño-Umbarila et al. 2005) para digerir el ADN con la enzima de restricción BstNI, la cual reconoce un patrón común en cualquier fragmento de ADN. La visualización de los productos generados indica que hay diversidad en el repertorio, en las 10 clonas utilizadas se observan patrones distintos entre ellos (Figura 9).



*Figura 9.* Digestión con BstNI. ADN de diez clonas de la biblioteca de scFvs fueron digeridas con BstNI durante dos horas, los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de 1% agarosa. Carriles **1- 10**: Muestras de ADN de la biblioteca, **M**: Marcador de peso, **11**: Control positivo (scFv con secuencia conocida). En la parte superior se muestra la secuencia blanco de la enzima de restricción.

La biblioteca de scFv fue desplegada en la superficie de fagos filamentosos M13 para llevar a cabo las rondas de tamizado dirigidas hacia Ts1, con estas construcciones se realizaron rondas de tamizado en fase sólida inmovilizando Ts1 en el inmunotubo (10, 5 y 3  $\mu\text{g/ml}$  para la primera segunda y tercera ronda respectivamente). El cuadro 1 muestra un resumen, en donde se puede observar que aunque en la primera ronda el título de salida es lo que podría esperarse debido a que se trata de una biblioteca no inmune, en las rondas siguientes la cantidad de clonas recuperadas fue menor. Esto es contrario a lo esperado, ya que conforme avanzan las rondas de tamizado, se esperaba que las clonas positivas (con reconocimiento al antígeno) fueran apareciendo más frecuentemente, y la sobrerrepresentación ocasionara que los títulos de salida fueran mayores y las clonas no específicas cada vez menos representadas. Sin embargo, la evaluación en ELISA de 180 clonas después de la tercera ronda mostró que no hubo un enriquecimiento de scFv específicos para Ts1 (*Tabla 2*).

*Tabla 2* Datos de tamizado de la biblioteca con Ts1.

Ronda	Saturante (1 %)	Ts1 ( $\mu\text{g}$ )	Título de entrada (ufc)	Título de salida (ufc)
Primera	BSA	10	$5 \times 10^{12}$	$6 \times 10^4$
Segunda	Caseína	5	$4 \times 10^{11}$	$5 \times 10^3$
Tercera	BSA	3	$8 \times 10^{11}$	$6 \times 10^3$

Esto hizo suponer que las condiciones de tamizado no estaban favoreciendo la selección, probablemente, la disminución en la concentración del antígeno no era la condición óptima. Por lo que se procedió a realizar el mismo procedimiento con mayor cantidad de toxina en la segunda y tercera rondas, el resumen se muestra en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Condiciones de nuevos tamizados

Ronda	Saturante (1 %)	Ts1 ( $\mu\text{g}$ )	Título de entrada (ufc)	Título de salida (ufc)
Primera	BSA	10	$5 \times 10^{12}$	$6 \times 10^4$
Segunda	Caseína	7	$8 \times 10^{11}$	$8 \times 10^4$
Tercera	Leche	5	$2 \times 10^{12}$	$3 \times 10^5$

Para evaluar las nuevas condiciones de tamizado, después de la segunda ronda de selección se realizó un PCR de colonia para amplificar los insertos en el plásmido. La electroforesis reveló la presencia de una gran proporción de clonas de menos de 900 pb, que corresponde al tamaño esperado para un scFv completo. En la primera ronda el 70% de las clonas presentaban productos del tamaño esperado, el 50 % de clonas de salida del segundo ciclo están incompletas, y el porcentaje aumenta al analizarse las rondas subsecuentes, en la Figura 10 se muestra un análisis de este tipo para las condiciones de tamizado arriba descritas.

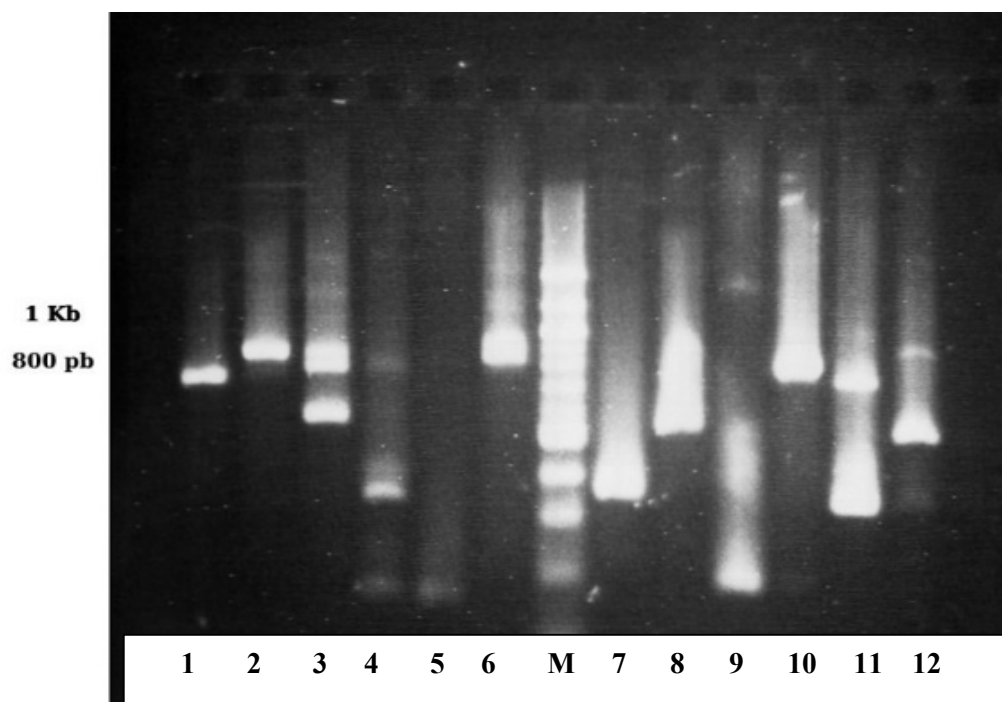
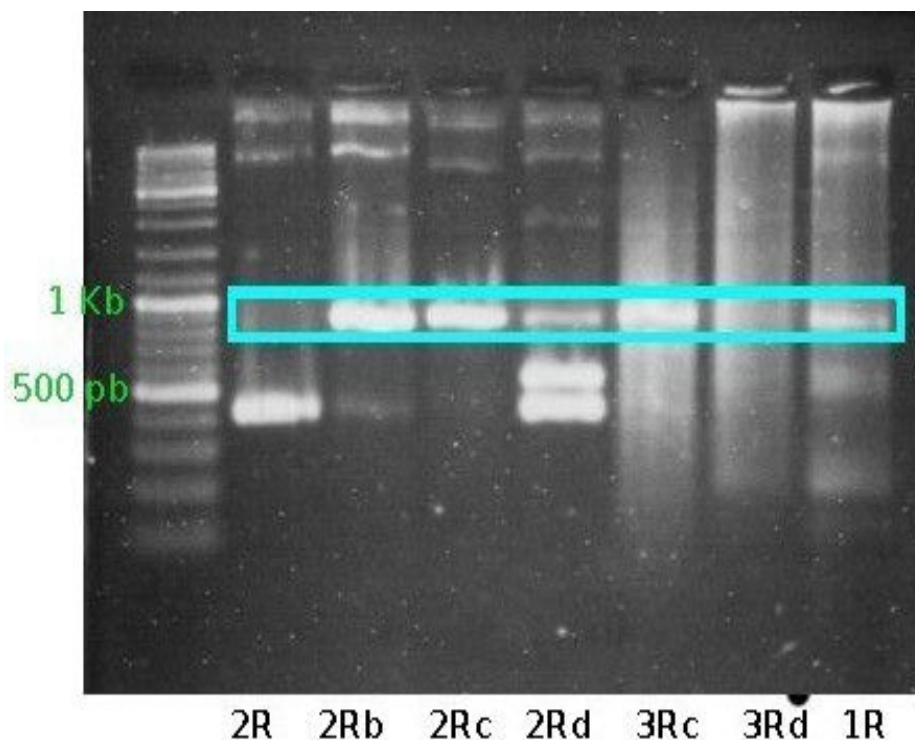


Figura 10. Amplificación de clonas recuperadas en los tamizados. 1-6: Clonas de salida de la segunda ronda, 7-12: Clonas recuperadas en la tercera ronda. M: Marcador de peso molecular de ADN. Solo las clonas de los carriles 2, 3 y 6 corresponden al tamaño esperado para el fragmento de un scFv completo.

Después de probar otras condiciones en las rondas de tamizado y evaluar varias de las clonas obtenidas sin éxito alguno y dado que persistía el problema de los clonas con insertos más pequeños que los scFv's se decidió seguir otra estrategia. Mediante lisis alcalina se aisló el plásmido de cultivos recuperados de 7 de las rondas realizadas anteriormente (1R, 2R 2Rb, 2Rc, 2Rd, 3Rc, 3Rd) y del banco sin tamizar (0R). El fagémido obtenido se digirió con las enzimas de restricción NotI y SfiI para liberar el DNA clonado, la digestión se corrió en un gel de agarosa para discriminar por tamaño los productos, recuperando y purificando sólo el DNA con un tamaño entre 800 y 900 pb, lo que podría corresponder a la construcción de los scFv's. En la Figura 11 se muestran los productos de la doble digestión de los plásmidos de algunas de las rondas utilizadas, en las que se observa el enriquecimiento de fragmentos de tamaño distinto, generalmente menor del correspondiente a un scFv.



*Figura 11* Recuperación de scFv's. Productos de la doble digestión de los plásmidos aislados de las diferentes rondas de tamizado realizadas contra Ts1, en el recuadro se muestran los fragmentos de 800-900 pb correspondientes al tamaño de scFv completo y que fueron purificados y subclonados.

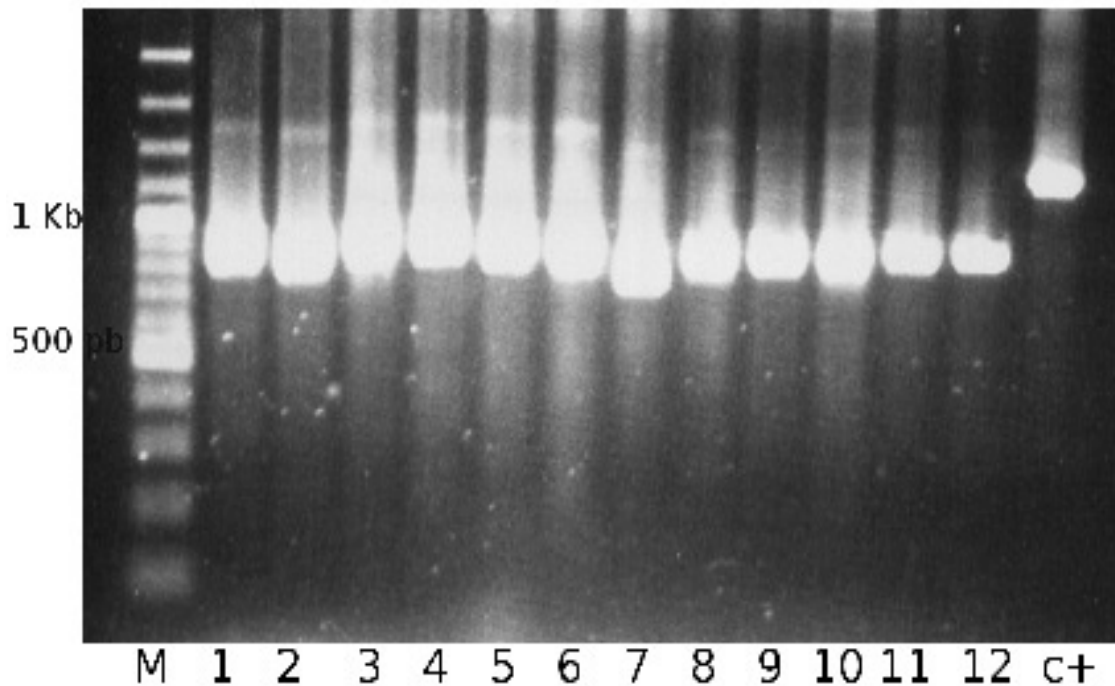
Los productos purificados se mezclaron y ligaron en vector de despliegue pSyn2 doble digerido con las enzimas de restricción SfiI y NotI (de la misma manera como se hizo en la preparación original). La ligación se transformó en la cepa *XLI-blue* de *E. coli* obteniendo un banco de  $4 \times 10^5$  colonias independientes. Este banco fue infectado con fago ayudador para el despliegue del material clonado y la realización de los tamizados contra la toxina.

Una vez que se tuvieron los scFv desplegados, se realizaron dos rondas de tamizado (10  $\mu\text{g/ml}$  de Ts1), una con el procedimiento habitual y otra en la cual los fago-anticuerpos se incubaron a 50 °C por 20 minutos antes de ponerlos en el inmunotubo y por tanto en contacto con la toxina. Este procedimiento se realizó para evitar seleccionar los fragmentos poco estables a esa temperatura, de manera que los que se conservan intactos y funcionales contengan moléculas de scFv más estables, dado que la inestabilidad es un problema frecuente de este formato de anticuerpos. En la *Tabla 4* se resumen las condiciones de los tamizados, de los cuales se probaron en ELISA 85 clonas. Para verificar el tamaño de los insertos se realizó un PCR de 12 colonias elegidas al azar, el cual se muestra en la Figura 12, en donde puede observarse que presentan insertos de  $\sim 900$  pb.

*Tabla 4.* Rondas de tamizado utilizando el banco obtenido de subclonar el material de las rondas anteriores. En el caso de 1RAM se preincubaron los fago-anticuerpos a 50°C

Ronda 1RMix	Saturante (1%)	Ts1 ( $\mu\text{g}$ )	Título de entrada (ufc)	Título de salida (ufc)
1RM	BSA	7	$8 \times 10^{11}$	$6 \times 10^5$
1RAM	BSA	7	$8 \times 10^{11}$	$5 \times 10^4$



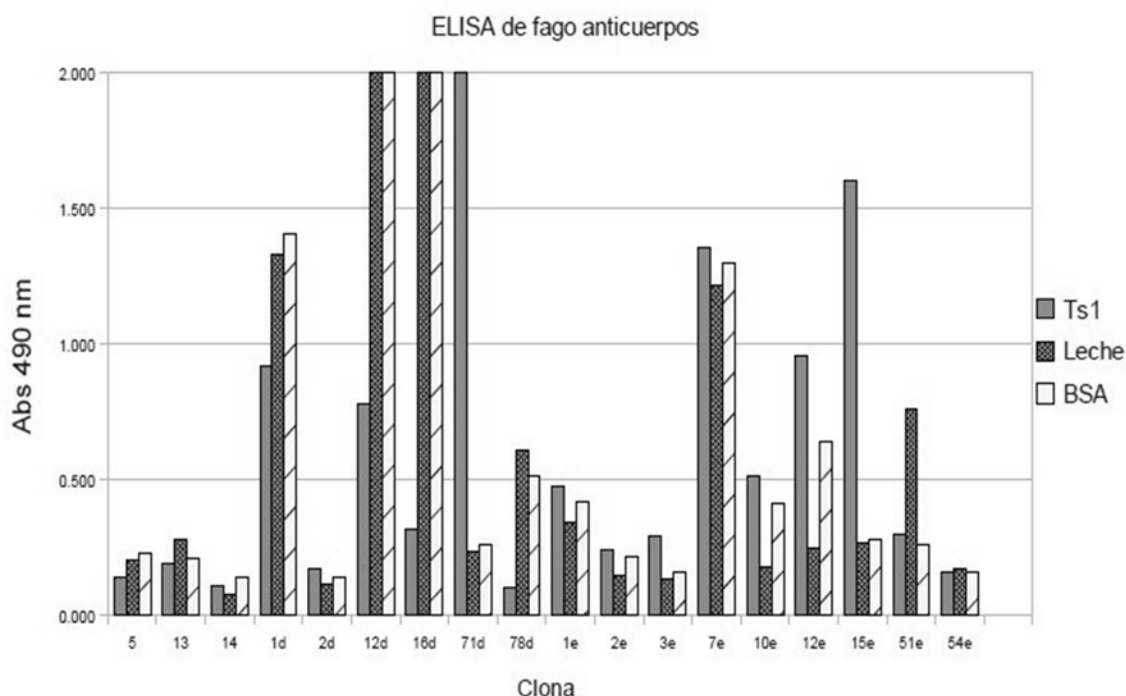


*Figura 12* Amplificación de los insertos de colonias obtenidas en la ronda de tamizado 1RAM. Carril 1: Marcador de 100 bp; carriles 1-12 los productos de PCR de las distintas clonas; c+, la amplificación del inserto de pSyn2 (~ 1.2 Kb) que se utilizó como control positivo.

En la Figura 13 se muestran las absorbancias de algunas de las clonas evaluadas, y en las que se observan distintos comportamientos, desde aquellas con pobre reconocimiento hasta las que muestran altas absorbancias, sin embargo, solo unas pocas (alrededor del 5% de las construcciones evaluadas) mostraron reconocimiento específico hacia la toxina y una señal no significativa en para los agentes bloqueadores.

De los fago anticuerpos que dieron señal positiva en la prueba de ELISA se realizaron PCR de colonia para verificar el tamaño del inserto contenido, de los que dieron el tamaño de cerca de 900 bp se determinó la secuencia nucleotídica, el resultado fue que las clonas 15e y 71d son scFv's completos (VH-conector-VL). El conector consta de 18 residuos (G<sub>5</sub>S)<sub>3</sub> en la *Figura 14* se muestra la comparación de estructura primaria de ambas clonas, observándose claras diferencias en algunas regiones de los anticuerpos y al consultar con la base de datos del IMGT (Lefranc 2003) se encuentra que el scFv 15e está conformado de una región

variable pesada VH6 y una región variable ligera VK4 y el scFv 71d por una VH5 y una VL3. Dado que son anticuerpos con distinta composición pueden estar reconociendo epítomos diferentes en Ts1, lo cual aumenta las posibilidades de obtener anticuerpos neutralizantes tanto de Ts1 como de toxinas similares.



*Figura 13.* ELISA de fago-anticuerpos. Ensayos de ELISA con algunas clonas obtenidas de los tamizados después de la subclonación. Las clonas 5, 13 y 14 fueron obtenidas después de una ronda de tamizado 1RA, el resto se aislaron del tamizado con los fago anticuerpos pre-incubados a 50 °C (1RAM). Las clonas marcadas con asterisco fueron elegidas para continuar con el análisis.

Con las clonas que mostraron reconocimiento y secuencias completas se realizaron por triplicado los ensayos de ELISA para confirmar ese comportamiento (*Figura 15*).

```

15e      MAEVQLLQSGFGLVKFPSQTLTSLTCAIFGDSVSSNSAAWYWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSG 60
71d      MAQVQLLQSAAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG--WVRQMPGKGLEWVG-I IYFGD 57
          **:*****.. : **::*::* * *.:* . *** *.:***** * ..

15e      WFHDYALSMKSRISVNPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARDRRAFSSQ---AAFDIW 117
71d      SDTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARPVWFEPRPYYYGMDVW 117
          * : *:::.....*.* . ** .*:...***:***** ... : .:***

15e      GQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNN 177
71d      GQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSSELTQDP-AVSVALGQTVRITCQGD-----SLS 170
          *****. :**.* :*:***: . *.*... * .

15e      NNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ 237
71d      SYYPSSWYQQKPGQAPVLFVYGYDKRPSGIPDRFSGSSSENTASLTLTGAQAEDEADYFCN 230
          . * :*****.* *::* ..* **:*.....* . :*:.. ***** *.*:

15e      QYYSTP--YTFGQGT 250
71d      SRDSSGNVYVFGTGT 245
          . * : *.* **

```

Figura 14. Alineamiento de aminoácidos de los scFv 15e y 71d. Las secuencias proteicas fueron alineadas utilizando ClustalW2 (Larkin *et al.* 2007) en el recuadro se indica la posición del péptido conector entre la VH y la VL. Los asteriscos (\*) indican la conservación de los residuos.

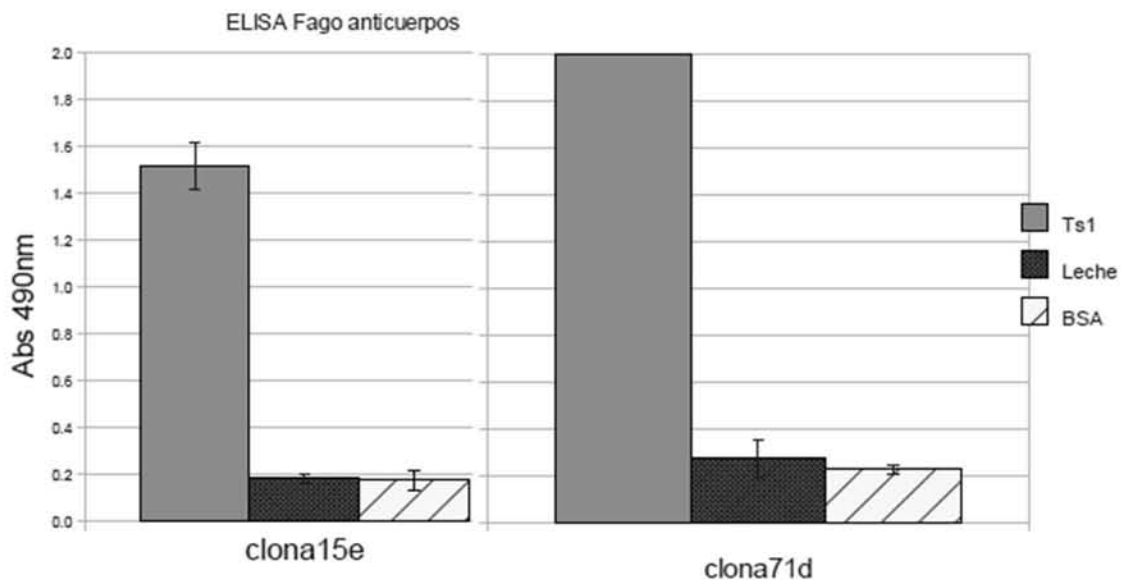


Figura 15. ELISA de los fago anticuerpos 15e y 71d. Los fago anticuerpos se utilizaron para corroborar el reconocimiento por la toxina. Las absorbancias mostradas son el promedio de tres ensayos independientes.

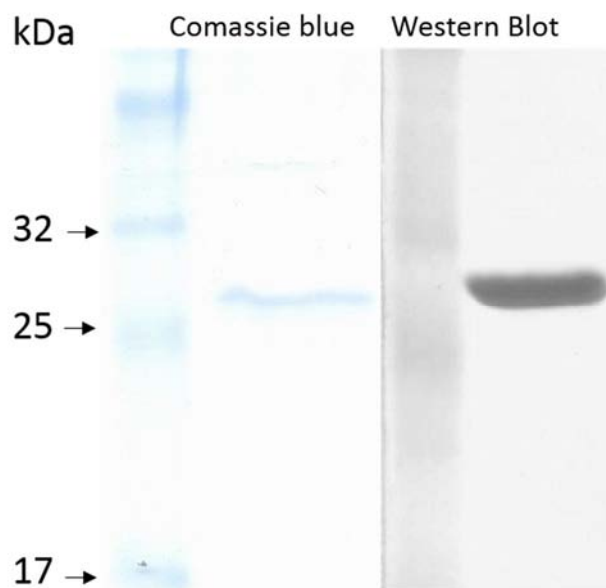
## 5.2 Caracterización de scFv's seleccionados

La capacidad de reconocimiento de los scFv hasta este punto sólo se había determinado como fago- anticuerpo, por lo que fue necesario subclonar el DNA de las clonas 15e y 71d en el plásmido pSyn1 para producir de manera soluble e independiente los fragmentos de cadena sencilla. El vector pSyn1 (Figura 8) fue digerido con las enzimas NotI y SfiI, para clonar el DNA del 15e y 71d, las cuales fueron digeridas con las mismas enzimas. Después de verificar el tamaño de los insertos por PCR de colonia se secuenció el material para comprobar la presencia de las secuencias correctas correspondientes a cada una de las clonas.

La expresión de las proteínas se realizó en las condiciones indicadas en materiales y métodos. Dado que la construcción incorpora al anticuerpo una etiqueta de seis histidinas, la proteína fue purificada por cromatografía de afinidad a metales IMAC por sus siglas en inglés (immobilized-metal affinity chromatography). Se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida con las fracciones recuperadas de la elución de la columna de níquel-agarosa con el fin de verificar la producción de una proteína con el tamaño de un scFv y la etiqueta de histidinas. Para el caso de 71d, se analizaron las fracciones periplásmica, citoplásmica y el medio de cultivo, sin embargo, no se detecta significativamente el scFv en ninguna de las fracciones, razón por la que a partir de este punto el estudio se enfocó en el scFv 15e; la Figura 16 muestra la membrana de nitrocelulosa a la que fueron transferidas las proteínas embebidas en el gel de poliácridamida. El rendimiento del scFv 15e calculado por espectrofotometría fue de  $\sim 1$  mg de anticuerpo por cada litro de cultivo.

Con este ensayo fue posible confirmar la expresión del scFv 15e, ya que se detecta una proteína de  $\sim 30$ KDa, con histidinas y c-myc. Tanto la proteína purificada como el extracto periplásmico fueron utilizados para una prueba de ELISA, ya que es necesario verificar que el anticuerpo en su forma soluble es capaz de unirse a la toxina Ts1, tal como sucedía en su formato de fago- anticuerpo. En la Figura 17 se muestran los valores de las absorbancias obtenidas con la fracción purificada, este resultado indica que el anticuerpo conserva su capacidad de reconocimiento hacia el antígeno contra el que fue seleccionado. En lo que respecta al fragmento de cadena sencilla 71d, tal como se esperaba no hubo señal detectada,

lo cual parece deberse a la ineficiente producción de la proteína, al menos en su forma funcional.



*Figura 16.* SDS-PAGE e inmunodetección de scFv 15e. Electroforesis del scFv purificado por IMAC y exclusión molecular, 12% de acrilamida. En el panel izquierdo después de la tinción con azul de comassie y en el panel derecho al ser transferido a una membrana de nitrocelulosa, la inmunodetección se realizó con anticuerpo anti-histidinas acoplado a peroxidasa.

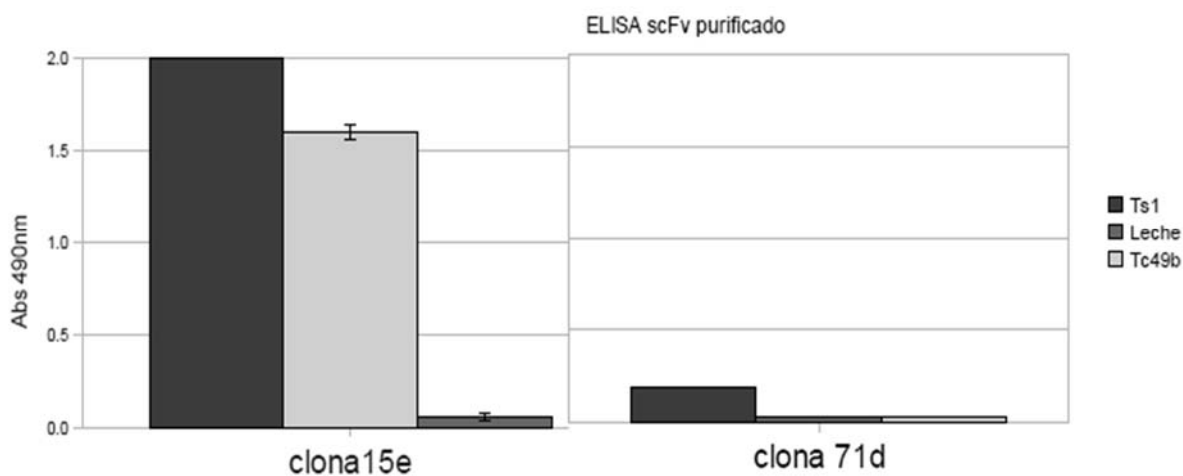


Figura 17. ELISA de especificidad de scFv purificados. Valores de absorbancia de los ensayos de ELISA que reflejan el reconocimiento de los scFvs solubles hacia Ts1 y Tc49b (toxina de otro alacrán del mismo género) y al agente saturante, en este caso leche. Los valores mostrados son el promedio de tres ensayos.



Figura 18. Secuencia de aminoácidos del scFv 15e. Los dominios VH y VL se encuentran unidos por un péptido conector, en verde se indican las regiones de complementariedad con el antígeno determinadas según las definiciones de estructuras canónicas de Chothia y numeración de Kabat (<http://www.bioinf.org.uk>).

La secuencia del fragmento 15e da lugar a una proteína de aproximadamente 30kDa y si es comparada con la base de datos BLAST muestra alta similitud con cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos de origen humano, con un CDR3 de 13 residuos en la cadena pesada y 9 residuos en la cadena ligera.

### 5.3 Determinación de LD<sub>50</sub> de Ts1 vía intraperitoneal

Se evaluó la dosis letal 50 vía subcutánea reportada de 5.8 µg (Mendes et al. 2008), sin embargo se observó letalidad en los animales inyectados, por lo tanto para llevar a cabo los ensayos *in vivo* fue necesario determinar la LD<sub>50</sub> de la toxina Ts1 por vía intraperitoneal, la cual resultó ser de 7.5 µg de toxina por cada 20 gramos de peso del animal. Este valor fue confirmado en tres ensayos independientes con el mismo lote de toxina Ts1.

### 5.4 Ensayos de neutralización y maduración de 15e

Para evaluar la capacidad neutralizante del anticuerpo aislado, se procedió a realizar ensayos *in vivo*.

El scFv 15e purificado fue inyectado vía intraperitoneal para descartar efecto adverso en el organismo blanco, durante el monitoreo no se observó ninguna reacción. La misma cantidad de anticuerpo fue incubado con 1 LD<sub>50</sub> de la toxina Ts1 en una relación molecular 1:10 (toxina:scFv) a 37 °C durante 30 minutos, la mezcla fue inyectada a ratones CD1 vía intraperitoneal, los animales fueron monitoreados durante 24 horas. La sobrevivencia de los ratones inoculados con la mezcla toxina-anticuerpo fue de alrededor del 70 %, en la parte superior de la *Tabla 5* se muestran los resultados del ensayo. De Se observó que la neutralización de la letalidad fue parcial, sin embargo, es importante hacer notar que hubo un retraso en la aparición de la sintomatología, así como una disminución en la severidad de ésta, lo que indica que el scFv es capaz de reconocer a la toxina en condiciones fisiológicas y potencialmente puede evitar la interacción de Ts1 con su blanco.

*Tabla 5.* Ensayo de neutralización. La prueba se llevó a cabo en ratones CD1 con la pre-incubación de la mezcla toxina:scFv. La clona 15e es la seleccionada de las rondas de tamizado, la clona 152R es derivada de ésta después de un ciclo de evolución.

Muestra	LD50	Relación Toxina:scFv	Sobrevivientes/Total
Ts1	1	-	5/10
scFv 15e	-	-	10/10
scFv 15e	1	1:10	7/10
scFv 152R	-	-	6/6
scFv 152R	1	1:10	2/6

En la búsqueda de mejorar la capacidad de neutralización del fragmento seleccionado se buscó la evolución dirigida de la clona 15e para lograr la completa neutralización de los efectos tóxicos de Ts1, de manera que la clona seleccionada se sometió a un proceso de mutagénesis al azar por medio de error-prone PCR (Cadwell & Joyce 1992), técnica que consiste en la introducción de mutaciones en una reacción de PCR con concentraciones alteradas de los componentes (nucleótidos desbalanceados, presencia de  $Mn^{2+}$  y altas concentraciones de  $Mg^{2+}$ ), lo que influye en la actividad de la polimerasa aumentando su tasa de error. Los productos de las tres tasas de error (baja, media y alta) fueron purificados y digeridos con enzimas de restricción SfiI y NotI para su clonación el vector pSyn2. La biblioteca mutagénica obtenida fue de  $6 \times 10^6$  variantes y fue utilizada en dos rondas de tamizado para aislar clonas con mejor reconocimiento hacia Ts1. En estas rondas de tamizado se utilizó una solución con pH ácido para eluir los fagos del inmunotubo. Después de los lavados para eliminar los fagos no específicos se agregaron 800  $\mu$ l de 100 mM Glicina-HCl pH 2.2, después de 10 minutos la solución se pasó a un tubo con 48  $\mu$ l de 2 M Tris Base para neutralizar, los fagos recuperados se utilizaron para infectar a la cepa *XL1Blue*.

Un gran número de fago-anticuerpos fueron evaluados, de los cuales se seleccionó una variante (152R) que presentó dos cambios en el framework 2 y un cambio en el CDR3. Sin embargo, en un ensayo de neutralización con este anticuerpo, no se observó protección alguna en los animales inoculados con la mezcla toxina:scFv 152R, los resultados se muestran en la parte inferior de la Tabla 5.

Otras clonas fueron recuperadas de las rondas de tamizado, encontrándose nuevas candidatas para la evaluación, sin embargo ninguna de ellas mostró mayor capacidad de reconocimiento y/o neutralización en comparación con la parental (15e).

## 5.5 Reactividad cruzada de 15e

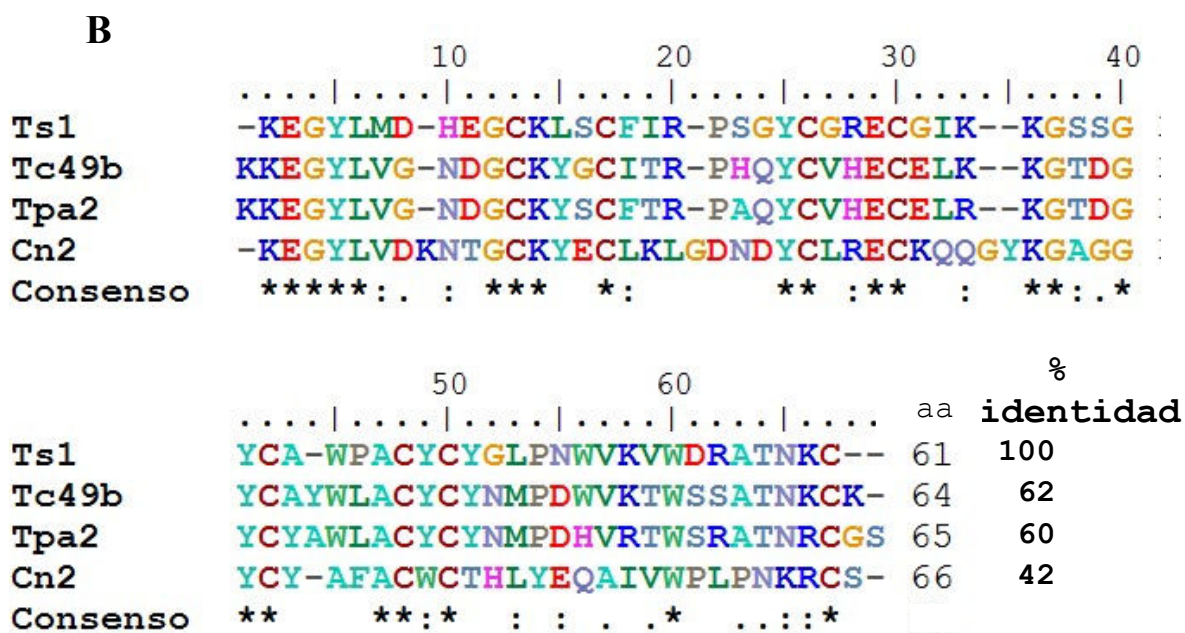
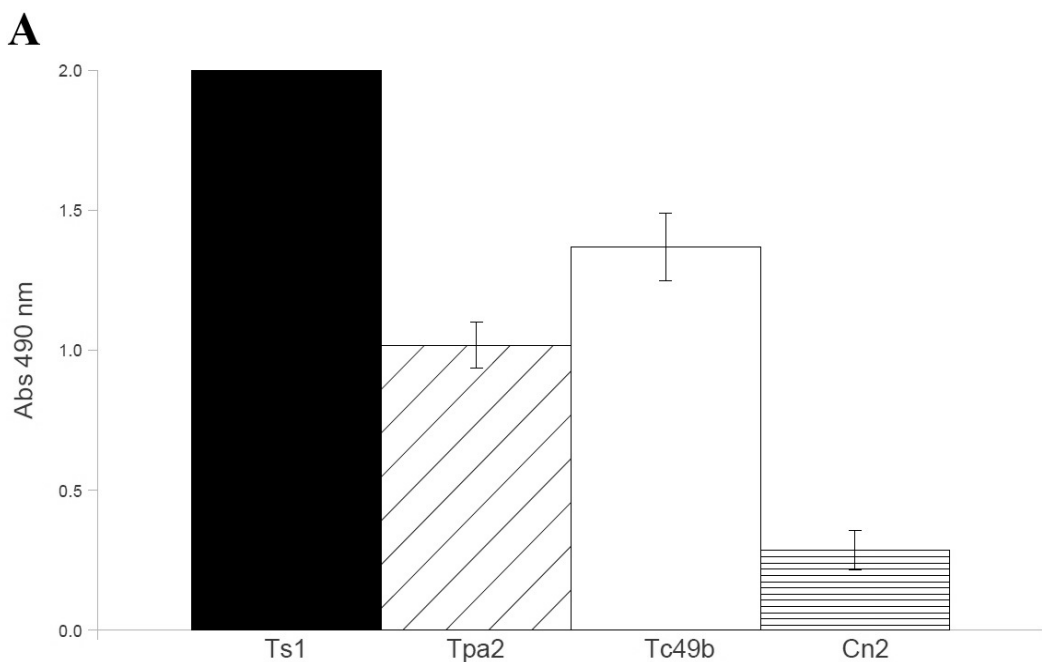
Debido a la experiencia generada en el laboratorio, se ha observado que en ciertos casos, un anticuerpo neutralizante cuya selección fue dirigida específicamente hacia una toxina puede presentar cierto grado de reactividad cruzada hacia otras toxinas relacionadas e incluso llegar a neutralizarlas también (Riaño-Umbarila et al. 2005, 2011), lo cual resulta en una gran



ventaja si se piensa en la necesidad de contar con un antiveneno de amplio espectro que pueda neutralizar la toxicidad causada por el piquete de cualquier alacrán.

En este caso, se evaluó el comportamiento del scFv 15e con toxinas provenientes de otros dos alacranes del género *Tityus*, en la Figura 20 se muestran los resultados del ensayo de ELISA sensibilizando la placa con 100  $\mu$ l de la toxina correspondiente (100  $\mu$ g/ml) por pozo. Las toxinas utilizados fueron Tc49b purificada del alacrán brasileño *T. cambridgei* y Tpa2 del alacrán colombiano *T. pachyurus*. Estas toxinas comparten alrededor del 60% de identidad con Ts1 a nivel de estructura primaria y el scFv 15e parece estar reconociendo epítomos presentes en las tres toxinas, al menos de manera parcial, aun cuando ha sido seleccionado por interactuar con Ts1. La toxina Cn2, purificada del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* fue incluida en el ensayo y como se observa en la Figura 20, la intensidad de la señal de reconocimiento es mucho menor que hacia las toxinas de alacranes del mismo género. Dado que el scFv 15e no es totalmente neutralizante no se realizaron pruebas *in vivo* con las otras toxinas.

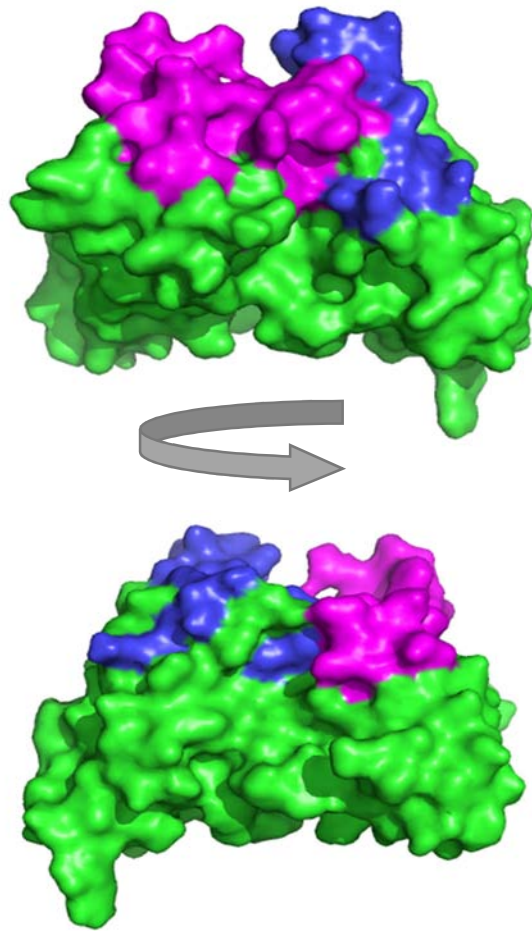
Ciclos de tamizado se realizaron con el nuevo repertorio (ver sección 4.4.1). Los fragmentos de la familia VH3 fueron amplificados y ensamblados con aquellos correspondientes a las familias Vk para obtener los scFv. Esta biblioteca, de  $3 \times 10^5$  clonas fue utilizada para la búsqueda de nuevos anticuerpos específicos para Ts1 en las condiciones de los tamizados iniciales con la biblioteca ya reportada. En el transcurso de los rondas de tamizado se observó un disminución en el número de clonas fragmentadas en relación a las obtenidas al principio de este trabajo. Dicho comportamiento representa una ventaja en el proceso porque evitaría la necesidad de la subclonación en cada ronda. Sin embargo, hace falta caracterizar las clonas aisladas de este repertorio, para determinar si alguna es específica para la toxina Ts.



*Figura 19.* Reactividad cruzada del anticuerpo 15e. A) Reconocimiento del scFv 15e hacia las toxinas Ts1, Tpa2, Tc49b y Cn2. Los valores mostrados son el promedio de tres ensayos, B) Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos utilizadas en el ensayo del panel A, los valores de identidad fueron calculados respecto a Ts1. Los asteriscos en la secuencia consenso indican los residuos conservados entre las toxinas.

## 5.6 Modelado molecular de 15e

El scFv 15e fue modelado por homología utilizando el programa WAM (Whitelegg & Rees 2000), en la figura 21 se muestran dos vistas laterales de la molécula, resaltando los CDR's, de la cadena pesada (magenta) como los de la cadena ligera (azul).



*Figura 20.* Modelado molecular del scFv 15e. Dos vistas laterales de la estructura tridimensional predicha por el servidor WAM, el cual lleva a cabo modelado por homología. Los CDR's de la cadena pesada son indicados en magenta y los de la cadena ligera en azul, el resto de la molécula son de color verde.

## 6. DISCUSIÓN

Para contrarrestar efectos de la intoxicación en accidentes con animales ponzoñosos es necesaria la disponibilidad de antídotos eficaces. Para regiones como Latinoamérica en donde el alacranismo es un importante problema de salud pública se busca el desarrollo de nuevas alternativas de antivenenos que sean efectivos, costeables, de fácil manejo y almacenaje. En Brasil, el alacrán *Tityus serrulatus* ha sido identificado como el principal causante de los accidentes y por ello muchos de los esfuerzos han estado enfocados a caracterizar la composición de su veneno así como los efectos que este causa. Dos antivenenos son utilizados en ese país (Nelson LS., Lewin NA., Howland MA., Hoffman RS., Goldfrank LR., Flomenbaum NE. 2011) un F(ab')<sub>2</sub> elaborado por la Fundación Ezequiel Dias (FUNED) y un antiveneno comercial, de origen equino producido por el Instituto Butantan, ambos a base de derivados de IgG policlonales producto de la inmunización con el macerado de la glándula venenosa del alacrán, sin embargo, no están ampliamente distribuidos y junto con los inconvenientes de almacenamiento se dificulta el acceso a toda la población. Además de lo mencionado, se estima que en preparaciones policlonales únicamente alrededor del 5 % de los anticuerpos están dirigidos contra componentes que requieren ser neutralizados, por lo que la identificación de inmunógenos de relevancia tóxica es de carácter prioritario en el desarrollo de nuevos antivenenos. En el caso específico del alacrán *T. serrulatus*, su veneno causa severos daños por sus componentes neurotóxicos (Petricevich et al. 2008), por lo que se ha propuesto utilizar a Ts1 (el componente más tóxico del veneno) para inmunizar y generar una respuesta inmune que logre neutralizar los efectos de la toxina e inclusive del veneno completo. A pesar de los análisis e identificación de los posibles epítopes de relevancia en la interacción con los anticuerpos neutralizantes (De Rezende et al. 1995, Duarte et al. 2010), no se han logrado resultados contundentes que lleven al mejoramiento de las preparaciones existentes. La toxina Ts1, principal componente tóxico del veneno del alacrán *T. serrulatus*, asociada a los principales síntomas de la intoxicación con dicho veneno, ha sido la molécula blanco empleada en los protocolos de inmunización. Sin embargo, la necesidad de grandes cantidades de toxina para llevar a cabo los procesos es el paso limitante; por lo tanto otras estrategias para su obtención son llevadas a cabo.

Recientemente, se reportó la síntesis del péptido que muestra actividad sobre el canal rNav1.4 (Dang et al. 2014). Mientras tanto, otras opciones son desarrolladas hacia la generación de anticuerpos recombinantes específicos contra la o las toxinas más abundantes de los venenos, en este caso, Ts1 fue utilizada como blanco en la búsqueda de fragmentos de anticuerpo de origen humano, los cuales por sus características cinéticas y funcionales pueden ser el futuro de la seroterapia. Durante las rondas de tamizado muchas fueron las construcciones que como fago-anticuerpos mostraban reconocimiento hacia Ts1, pero que no eran específicos para el antígeno y reconocían también a los agentes saturantes empleados en el proceso. Algunos otros, específicos en dicho formato no fue posible obtenerlos como proteínas solubles como fue el caso del scFv 71d, aun cuando se cambiaron las condiciones de cultivo (cepa, temperatura, tiempo de inducción, concentración de IPTG). El hecho de que hasta el momento no se haya logrado producirlo puede tener su origen en más de una causa, el formato scFv ha mostrado problemas de estabilidad debido a la pérdida del soporte estructural por la ausencia del resto de la inmunoglobulina, más estudios son necesarios para determinar las causas de este fenómeno.

En cuanto al anticuerpo que si se sobre-expresó, los rendimientos estuvieron en el promedio de lo reportado para ese formato. En las pruebas de neutralización se observó una que la una efectividad parcial, resultando en una tasa de mortalidad más baja pero de manera importante se vieron disminuidos los síntomas de la intoxicación, así mismo los tiempos en los que los ratones murieron fue de unos minutos para el caso del grupo control hasta horas para aquellos tratados con el scFv pero que no sobrevivieron. La capacidad de reconocimiento de 15e por toxinas del mismo grupo inmunológico y con alta similitud a nivel de secuencia lo posiciona como un buen candidato para ser parte de un antiveneno de efecto regional.

La determinación de la constante de afinidad por resonancia de plasmones (BIAcore) no fue posible dado que la toxina mostró comportamientos inusuales; se observó una fase típica de interacción antígeno-anticuerpo, sin embargo, no fue posible observar la fase de disociación, aun en la presencia de altas concentraciones de ácido o base. La estrategia seguida para la maduración del anticuerpo generó variabilidad a lo largo de la secuencia de nucleótidos reflejada en muchos casos en la composición de aminoácidos, sin embargo, no se seleccionó ninguna que mostrará mejores propiedades de reconocimiento. Las constantes

de afinidad, parámetro de gran importancia en la interacción antígeno-anticuerpo se estiman del orden nanomolar para aquellos con capacidad neutralizante, sin embargo para anticuerpos seleccionados de fuentes no inmunes se esperan que sean del orden de micromolar (como fue el caso del 15e), equivalente a un anticuerpo que de forma natural no ha sufrido procesos de maduración. La baja afinidad también puede estar influenciada por la estabilidad de la molécula, en este caso, aunque no se observaron reacciones adversas al scFv en los ensayos *in vivo* como se ha visto en ensayos con anticuerpos de baja afinidad (Juárez-González et al. 2005) parece ser una limitante en la capacidad neutralizante del anticuerpo. El cambio de formato a estructuras más estables, por ejemplo Fab (Quintero-Hernández et al. 2007, 2012), deben ser considerados, evaluando la relación estabilidad-farmacocinética. En el modelo tridimensional calculado, se observa que el CDR2 forma una cavidad en el sitio de unión al antígeno, dos argininas muy expuestas en la superficie parecen tener un rol importante en el paratopo, es necesario determinar si la presencia de dichos residuos promueve la unión al antígeno o disminuye la afinidad al mismo. El conocimiento de la superficie de contacto entre el anticuerpo parcialmente neutralizante y la toxina podría vislumbrar nuevas estrategias para la optimización del anticuerpo en su capacidad de neutralización con la toxina Ts1 y otras relacionadas.

## **7. CONCLUSIONES**

Utilizando la técnica de despliegue en fagos, como resultado de este trabajo se aisló un anticuerpo en formato de cadena sencilla que reconoce a la toxina tipo  $\beta$ , Ts1 del alacrán *Tityus serrulatus*. El scFv se obtuvo a partir de una biblioteca humana no inmune generada previamente y se caracterizó a nivel de estructura primaria; la región variable de la cadena pesada (VH) corresponde a la familia VH6 y la VL a la familia Vk4. El fragmento neutralizó parcialmente la letalidad de una LD<sub>50</sub> de la toxina Ts1 cuando fue incubado con la toxina

previo a ser inyectada. El anticuerpo por sí mismo no ocasionó ningún efecto evidente en los ratones a los que se aplicó como control del experimento.

Este anticuerpo reconoce dos toxinas presentes en los venenos de otros alacranes del género *Tityus*, pero no fue evaluada su capacidad de neutralizar los efectos tóxicos.

Otro scFv fue seleccionado porque presentó reconocimiento a la toxina, sin embargo, con el sistema de expresión utilizado no se obtuvo como proteína soluble por lo que no fue posible su análisis.

El scFv 15e obtenido en este trabajo puede ser el punto de partida para la preparación de anticuerpos de nueva generación para contrarrestar los efectos del envenenamiento por picadura de alacrán.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Implementar estrategias de selección para aislar anticuerpos totalmente neutralizantes de la toxina Ts1, sin embargo para lograr la completa eliminación de los efectos adversos del veneno completo de *Tityus serrulatus* también se deben buscar ligandos de otros componentes (Ts2, Ts3, etc.).
- Realizar un acoplamiento molecular (docking) para obtener información sobre las posibles interacciones toxina-anticuerpo que sea de utilidad para realizar mutagénesis sitio dirigida del fragmento 15e, con la finalidad de mejorar el reconocimiento y capacidad neutralizante.
- Utilizar otros plásmidos o sistemas de expresión para obtener la proteína soluble de la clona 71d, la cual mostró un mejor reconocimiento que 15e en formato de fago-anticuerpo.
- Determinar las constantes de afinidad del anticuerpo 15e.
- Caracterizar las clonas aisladas del nuevo repertorio.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aubrey N, Muzard J, Juste M, Billiald P. 2006. [Recombinant antibodies: towards a new generation of antivenoms?]. *J. Soc. Biol.* 200(4):345–54
- Barbosa da Silva J, Vinhote WMS, Oliveira CMC, André MR, Machado RZ, et al. 2014. Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in northern Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5(2):100–104
- Barona J, Batista CVF, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Wanke E, et al. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup> - and K<sup>+</sup> - channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1764(1):76–84
- Barona J, Otero R, Núñez V. 2004. [Toxicological and immunological aspects of scorpion venom (*Tytilus pachyurus*): neutralizing capacity of antivenoms produced in Latin America]. *Biomedica.* 24(1):42–49
- Batista CVF, del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, et al. 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 803(1):55–66
- Becerril B, Marangoni S, Possani LD. 1997. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon.* 35(6):821–35
- Cadwell RC, Joyce GF. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2(1):28–33
- Calderón-Aranda ES, Rivière G, Choumet V, Possani LD, Bon C. 1999. Pharmacokinetics of the toxic fraction of *Centruroides limpidus limpidus* venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific F(ab')<sub>2</sub>. *Toxicon.* 37(5):771–82
- Cestèle S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie.* 82(9-10):883–92
- Chiang LW, Kovari I, Howe MM. 1993. Mutagenic oligonucleotide-directed PCR amplification (Mod-PCR): an efficient method for generating random base substitution mutations in a DNA sequence element. *PCR Methods Appl.* 2(3):210–17



- Chippaux J-P, Goyffon M. 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107(2):71–79
- Coronas FI V, Diego-García E, Restano-Cassulini R, de Roodt AR, Possani LD. 2014. Biochemical and physiological characterization of a new Na<sup>(+)</sup>-channel specific peptide from the venom of the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*. *Peptides*
- Dang B, Kubota T, Correa AM, Bezanilla F, Kent SBH. 2014. Total chemical synthesis of biologically active fluorescent dye-labeled Ts1 toxin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53(34):8970–74
- De la Vega RCR, Possani LD. 2007. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. *Toxicon.* 49(2):171–80
- De Rezende NA, Dias MB, Campolina D, Chavez-Olortegui C, Diniz CR, Amaral CF. 1995. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52(3):277–80
- Dehesa-Dávila M, Possani LD. 1994. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon.* 32(9):1015–18
- Dixon WJ. 1965. The Up-and-Down Method for Small Samples. *J. Am. Stat. Assoc.* 60(312):967–78
- Duarte CG, Alvarenga LM, Dias-Lopes C, Machado-de-Avila RA, Nguyen C, et al. 2010. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine.* 28(5):1168–76
- Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. 2009. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. *J. Proteomics.* 72(2):183–99
- Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. 2013. Expression of recombinant antibodies. *Front. Immunol.* 4:217
- Hammers CM, Stanley JR. 2014. Antibody phage display: technique and applications. *J. Invest. Dermatol.* 134(2):e17
- Hida K, Hanes J, Ostermeier M. 2007. Directed evolution for drug and nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59(15):1562–78
- Huang JX, Bishop-Hurley SL, Cooper MA. 2012. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(9):4569–82

- Juárez-González VR, Riaño-Umbarila L, Quintero-Hernández V, Olamendi-Portugal T, Ortiz-León M, et al. 2005. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *J. Mol. Biol.* 346(5):1287–97
- Krifi MN, El Ayeb M, Dellagi K. 1999. The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: Comparinf antivenom quaility, therapeutical effciciency and cost. *J. Venom. Anim. Toxins.* 5(2):128–41
- Laffly E, Sodoyer R. 2005. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after .. *Hum. Antibodies.* 14(1-2):33–55
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23(21):2947–48
- Lefranc M-P. 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database®. *Nucleic Acids Res.* 31(1):307–10
- Lefranc M-P, Lefranc G. 2001. *The Immunoglobulin FactsBook*. London, UK: Academic Press
- Licea AF, Becerril B, Possani LD. 1996. Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology.* 34(8):843–47
- Mendes TM, Dias F, Horta CCR, Pena IF, Arantes EC, Kalapothakis E. 2008. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology.* 52(7):787–93
- Mersmann M, Meier D, Mersmann J, Helmsing S, Nilsson P, et al. 2010. Towards proteome scale antibody selections using phage display. *N. Biotechnol.* 27(2):118–28
- Ministério da Saúde Brasil. 2010. Acidentes com animais pe conhentos crescem quase 33% nos últimos seis anos. Brasil
- Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier J-M. 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378(Pt 3):717–26
- Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. 2010. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 9(10):767–74
- Nelson AL, Reichert JM. 2009. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* 27(4):331–37

- Nelson LS., Lewin NA., Howland MA., Hoffman RS., Goldfrank LR., Flomenbaum NE. . 2011. Antidotes in depth. Antivenom (Scorpion and Spider). In *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 9th ed.
- Nishikawa AK, Caricati CP, Lima ML, Dos Santos MC, Kipnis TL, et al. 1994. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*. 32(8):989–98
- Oldham RK, Dillman RO. 2008. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: 25 Years of Progress. *J. Clin. Oncol*. 26(11):1774–77
- Parrilla-Alvarez P, D'Suze G, Quiroga M, Rodríguez-Acosta A, Sevcik C. 1999. Effects of formalinization on the immunopharmacological characteristics of the venom of the Tityus scorpions and crossreactivity between these venoms. *J. Venom. Anim. Toxins*. 5(1):110
- Paschke M. 2005. Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 70(1):2–11
- Petricevich VL, Hernández-Cruz A, Coronas FI, Possani LD. 2007. Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*. 50(5):666–75
- Petricevich VL, Reynaud E, Cruz AH, Possani LD. 2008. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from Tityus serrulatus. *Clin. Exp. Immunol*. 154(3):415–23
- Pinheiro CB, Marangoni S, Toyama MH, Polikarpov I. 2003. Structural analysis of Tityus serrulatus Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na<sup>+</sup> channels. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr*. 59(Pt 3):405–15
- Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>-channels. *Eur. J. Biochem*. 264(2):287–300
- Possani LD, Martin BM, Mochca-Morales J, Svendsen I. 1981. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion Tityus serrulatus Lutz and Mello. *Carlsberg Res. Commun*. 46(4):195–205
- Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*. 82(9-10):861–68
- Prendini L. 2011. *Order Scorpiones C.L. Koch, 1850*. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. Zootaxa 3148. <http://www.mapress.com/zootaxa/2011/f/zt03148p117.pdf>

- Quintero-Hernández V, Del Pozo-Yauner L, Pedraza-Escalona M, Juárez-González VR, Alcántara-Recillas I, et al. 2012. Evaluation of three different formats of a neutralizing single chain human antibody against toxin Cn2: neutralization capacity versus thermodynamic stability. *Immunol. Lett.* 143(2):152–60
- Quintero-Hernández V, Juárez-González VR, Ortiz-León M, Sánchez R, Possani LD, Becerril B. 2007. The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. *Mol. Immunol.* 44(6):1307–15
- Rasmussen SK, Rasmussen LK, Weilguny D, Tolstrup AB. 2007. Manufacture of recombinant polyclonal antibodies. *Biotechnol. Lett.* 29(6):845–52
- Reckziegel GC, Pinto VL. 2014. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 20(1):46
- Reichert JM, Dhimolea E. 2012. The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discov. Today.* 17(17-18):954–63
- Riaño-Umbarila L, Contreras-Ferrat G, Olamendi-Portugal T, Morelos-Juárez C, Corzo G, et al. 2011. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J. Biol. Chem.* 286(8):6143–51
- Riaño-Umbarila L, Juárez-González VR, Olamendi-Portugal T, Ortiz-León M, Possani LD, Becerril B. 2005. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272(10):2591–2601
- Riaño-Umbarila L, Olamendi-Portugal T, Morelos-Juárez C, Gurrola GB, Possani LD, Becerril B. 2013. A novel human recombinant antibody fragment capable of neutralizing Mexican scorpion toxins. *Toxicon.* 76:370–76
- Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon.* 43(8):865–75
- Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon.* 46(8):831–44
- Rodríguez de la Vega RC, Schwartz EF, Possani LD. 2010. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon.* 56(7):1155–61
- Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 228(4705):1315–17

- Thie H, Meyer T, Schirrmann T, Hust M, Dübel S. 2008. Phage display derived therapeutic antibodies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9(6):439–46
- Wagner S, Castro MS, Barbosa JARG, Fontes W, Schwartz ENF, et al. 2003. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. *Toxicon.* 41(7):737–45
- Whitelegg NR, Rees AR. 2000. WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng.* 13(12):819–24
- ZAMUDIO F, SAAVEDRA R, MARTIN BM, GURROLA-BRIONES G, HERION P, POSSANI LD. 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204(1):281–92

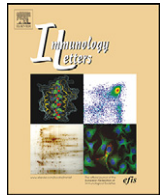
## **APÉNDICE A. Publicación en revista arbitrada**

Parte de los resultados de este estudio fueron publicados:

Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion.

**Amaro I**, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD.

*Immunol Lett.* 2011 Sep 30;139(1-2):73-9. doi: 10.1016/j.imlet.2011.05.002.



# Isolation and characterization of a human antibody fragment specific for Ts1 toxin from *Tityus serrulatus* scorpion

Itzel Amaro, Lidia Riaño-Umbarila, Baltazar Becerril, Lourival D. Possani\*

Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad, 2001, Col. Chamilpa 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 December 2010  
Received in revised form 26 April 2011  
Accepted 9 May 2011  
Available online 19 May 2011

### Keywords:

Antibody  
Human scFv  
Phage display  
Scorpion toxin  
*Tityus serrulatus*

## ABSTRACT

Scorpion stings are a common event that occurs in tropical and subtropical areas of the world, being a public health problem in certain countries. In most places, medical treatment relies on antivenoms obtained from the sera of hyper-immunized horses, however some efforts are being made to prepare specific antibodies of human origin, using phage display methodology. This communication describes the strategy followed for obtaining a protective human single chain antibody (scFv) capable of partially neutralizing the effect of Ts1, the major toxin isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. Phage display technique allowed the isolation of scFv 15e from a human library of antibodies, after four rounds of selection against Ts1. This clone codes for 124 amino acids belonging to the family VH6 and 114 amino acids of family VK4. This scFv also recognizes toxins from the scorpions *Tityus packyurus* and *Tityus cambridgei* from the Amazonian region. Mice challenged with a LD<sub>50</sub> of Ts1 in the presence of this scFv were substantially resistant to intoxication. ScFv 15e is a leading compound for the development of better anti-scorpion antidotes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mature antibodies are molecules from the immune system of vertebrates with high affinity and specificity to antigens; properties that have been widely exploited in therapeutic and research applications [1,2]. A relevant indication of their importance is the fact that over a third of the proteins currently undergoing clinical trials in USA are antibodies [3]. Since 1975 with the advent of hybridoma technology [4] many different strategies were developed for the production of related molecules with particular characteristics. In this way, antibodies of low immunogenicity, suitable for therapeutic or diagnostic purposes were and are currently being engineered, produced and used. Phage display is one of these methodologies. Libraries of peptides and proteins of large diversity ( $10^5$ – $10^{11}$  clones) have been prepared and used for the expression on the surface of filamentous bacteriophage M13, expressed in *Escherichia coli*. This technique has permitted to obtain and select molecules with specific properties [5,6]. The main advantage of this technique is the link between phenotype and genotype, since each phage carries in its genome a DNA segment encoding the protein displayed on the surface of the phage. One of the most important applications of phage display has been reflected in antibody engi-

neering. To date, several immunoglobulin fractions as “Fragment antigen-binding” (Fab) and “single chain antibody fragment” (scFv) with affinities comparable to antibodies obtained by hybridoma technology have been isolated by mean of phage display from immune and non-immune libraries [7,8]. In addition, phage display has advantages over hybridoma and other technologies due to the possibility of obtaining antibodies from human sources, prepared in the laboratory and without the need for a long process of animal immunization [9]. The scFv fragments contain only the variable regions of the light and heavy chain of the antibodies, linked covalently by an artificially included connector peptide. In this manner, the constant region (Fc fragment of the immunoglobulin molecule) is not present. It is worth recalling that the Fc region is responsible for several effector functions of antibodies, usually containing posttranslational modifications that require eukaryotic cells for expression, a limiting factor for its production [10]. Since the scFv does not contain Fc regions, it can be expressed functionally in *E. coli*. In addition, the smaller size of scFvs and their poor immunogenicity makes them an excellent candidate for medical treatment of acute and severe events, such as animal envenomings.

Poisonous animals such as scorpions have venom containing a complex composition, including toxins responsible for fatal events in humans. Scorpionism is the term used for defining human accidents caused by scorpions. It is a serious public health problem around the world; mainly in tropical regions [11]. In Mexico, ~250,000 human accidents are reported annually [12]. In Brazil, according to the Ministry of Health, 103 deaths and about 45,000

\* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 1647; fax: +52 777 329 1657.  
E-mail address: [possani@ibt.unam.mx](mailto:possani@ibt.unam.mx) (L.D. Possani).

scorpion stings were reported for the year 2009 [13]. Scorpions of the genus *Tityus* (*T.*) are responsible for this problem in almost all South American countries. Even when the serotherapy has evolved significantly in the last decades, the commercial antivenoms available are horse immunoglobulins or fragments of antibodies F(ab')<sub>2</sub>, which are produced using whole soluble venom or scorpion gland macerates as immunogens. This produces a serum with a heterogeneous population of antibodies, most of them not necessarily directed against the toxic peptides of the venom; hence, not needed for the neutralization of the venom action. Remarkably, it has been observed that the neutralization of the main toxins by antibodies is sufficient to abate the effects of the whole venom [14,15]. In Brazil, accidents are treated using horse anti-venom produced with crude whole venom from *Tityus serrulatus*, a scorpion distributed in several regions of the country. However, the availability and distribution of the therapeutic antibodies do not cover the entire areas of the country, causing severe envenoming even fatal accidents. Ts1 or gamma-toxin is the major toxic component found in the venom of *T. serrulatus* [16,17]. It is a polypeptide of 61 amino acid residues that recognizes and affects the proper function of Na<sup>+</sup> ion channels [18]. This property strongly correlates with symptoms and lethal effects of scorpion stings, requiring the preparation of neutralizing antibodies against this peptide. Murine antibodies using peptides isolated from the venom of *T. serrulatus* as antigens has been produced with success, in an attempt to generate neutralizing antibodies [19,20]. However, except for the horse antivenom, additional work is still needed for obtaining molecules with better characteristics required for human medical applications.

Pharmacokinetic studies conducted with scorpion venom shows that components of the venom are rapidly distributed from the blood stream to various tissues. The speed of envenoming requires the immediate application of efficient antivenoms. Small recombinant antibody fragments, like scFv or Fab, due to their better diffusion rate and neutralizing capacity, have been proposed for the generation of better antivenoms [21,22].

Based on these considerations and using a library made of human antibodies expressed by the phage display methodology, we have isolated a scFv against the main toxin of *T. serrulatus* (Ts1), which is described in details in this communication. This scFv recognizes Ts1 and partially neutralizes the toxic effect. We are confident that the improvement of this antibody will hopefully allow obtaining a therapeutic agent for human usage, against scorpionism in Brazil and other countries in South America.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Antigens

Cn2, a potent toxin purified from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann was obtained as described earlier [23]. Ts1, also known by the name of toxin gamma, was purified from the venom of the scorpion *T. serrulatus* as described by Possani et al. [16]. An additional step of purification by high-performance liquid chromatography (HPLC) was introduced after the CM-cellulose column in order to obtain Ts1 in a highly pure and homogeneous form. A C18 reverse phase column was used for this purpose and the peptide was eluted with a linear gradient similar to that described in [23]. Two additional toxins were obtained from the scorpions of the Amazonian regions: the first was Tpa2, a peptide purified from the Colombian scorpion *Tityus packyurus* [24] and the second one was Tc49b isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus cambridgei* [25].

### 2.2. Biopanning of phage-antibody library and isolation of anti-Ts1 scFv

A human combinatorial library of scFvs prepared by our group (see [15]), with diversity of  $1.1 \times 10^8$  was displayed in filamentous phages for the selection of antibodies specific for Ts1. Screening and rescue of phagemid particles from *E. coli* was performed as reported [26]. The immunotubes were coated overnight with toxin Ts1 at concentrations of 10 µg/mL (rounds 1–2) and 5 µg/mL (round 3–4) in sodium bicarbonate buffer, pH 9.4 at 4 °C. To eliminate as many unspecific clones as possible, before the biopanning, 1 mL of the library ( $5 \times 10^{12}$  phage antibodies) in PBS was incubated for 60 min in the presence of different blocking agents: bovine serum albumin (BSA), non-fat milk, gelatin and BSA again for each of the four consecutive rounds, respectively. The pre-blocked phage-antibodies were added to immunotubes (Maxisorp; Nunc). Ten (rounds 1–2) or twenty (rounds 3–4) washings with PBST (PBS with 0.1% Tween 20) and 20 times with PBS alone were performed. The bound phage antibodies were recovered by the addition of 1 mL of *E. coli* of the strain XL1Blue ( $A_{600} = 0.7$ ) for 30 min, without agitation and then 30 min with agitation at 37 °C. The recovered bacteria were plated on agar containing the antibiotic ampicillin. After each round of panning, PCR amplification of 10 plasmid inserts was carried out to confirm the correct size of insert and supernatants of 20 single phage antibody clones were analyzed for specific binding to Ts1 ELISA plates (Corning) coated at 1 µg/mL in 50 mM bicarbonate buffer, pH 9.4. Phage-antibody supernatants were added to each well, incubated for 1 h at 37 °C and the plates washed. Bound phage-antibodies were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 antibody (Amersham Pharmacia Biotech AB). HRP activity was detected by adding O-phenylenediamine. Plates were read at 492 nm in an ELISA reader (Bio-RAD Model 2550). In order to eliminate clones with incorrect sizes, after the second round of panning, plasmid isolation was performed. The pool of plasmid DNA was digested with restriction enzymes *Sfi*I and *Not*I (New England Biolabs) and the fragments near to 900 base-pairs (bp) were gel-purified; the resulting DNA fragments were ligated into the phagemid pSyn2 (kindly provided by J.D. Marks, UCSF, San Francisco, CA, USA) previously treated with the same restriction enzymes. The ligated DNA was electroporated into *E. coli* strain XL1Blue and displayed in phage for two additional panning rounds. For the identification of positive clones, single phage-antibody colonies were randomly selected and evaluated by ELISA as described below.

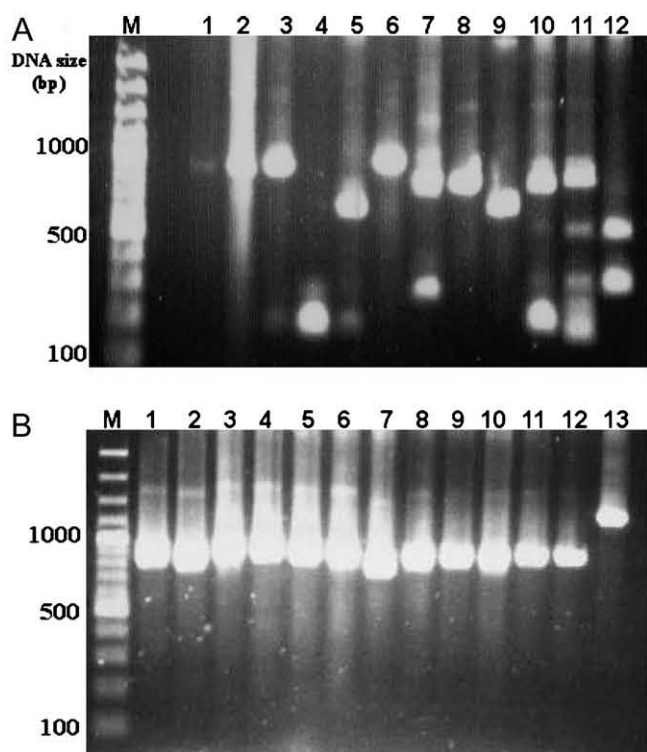
### 2.3. Amplification and DNA sequencing

Inserts from DNA plasmid were amplified by PCR, the conditions were: 5 min denaturation at 94 °C, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, with a final extension cycle at 72 °C for 10 min. Primers forward (5'-ATACCTATTGCTACGGC-3') and reverse (5'-TTTCAACAGTCTATGCGG-3') for phagemid pSyn2 were used. The sequences of the positive clones were determined with the primers as PCR in the Applied BioSystems sequencer Model 3100, from both ends.

### 2.4. Expression and purification of soluble single chain antibodies

The scFv inserts from the selected clones were sub-cloned into the expression vector pSyn1. The expression system is under the control of the lac promoter and contains a c-Myc epitope and hexa-His tag at the C-terminus to facilitate the immune-detection and affinity column purification of the scFv. PelB signal is present in the vector and allows *E. coli* periplasmic expression of the scFv. Soluble scFv was produced in *E. coli* TG1 cells as earlier described [14], with





**Fig. 1.** Amplification of plasmid inserts of individual clones obtained by phage-display. (A) Lanes 1 and 2 show positive controls using different concentrations of a *bona fide* scFv clone, previously isolated in the laboratory. Lanes 3–12 show the clones from this experiment after the second biopanning, just before subcloning. (B) Lane 1 shows again a positive control (full scFv clone) and lane 13 is the stuffer fragment of phagemid pSyn2. Lanes 2–12 are examples of clones obtained after the fourth round selection, whereas M is the GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

slight modifications: the time after induction was 8 h and the elution of scFv from Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography (Qiagen) was performed with 300 mM imidazole. Supernatants and periplasmic fractions were analyzed by SDS-PAGE to confirm the presence of the scFvs into the periplasmic space (data not shown). The purified proteins were detected by western blotting as reported elsewhere [27], using anti-hexa-His antibody coupled to horseradish peroxidase (Roche Applied Science). Finally, samples were purified by gel filtration chromatography on a Superdex™ 75 column (Pharmacia Biotech AB).

## 2.5. Competition assay by ELISA

Different concentrations of Ts1 (0.5–500 nM) were incubated in solution with scFv 15e (5 µg/mL) at 4 °C over night, time required for reaching equilibrium. Aliquots of 100 µL of the equilibrated mixture were incubated during 20 min with previously immobilized toxin (Ts1) in plates (0.1 µg of toxin per well) for ELISA detection as described in [15].

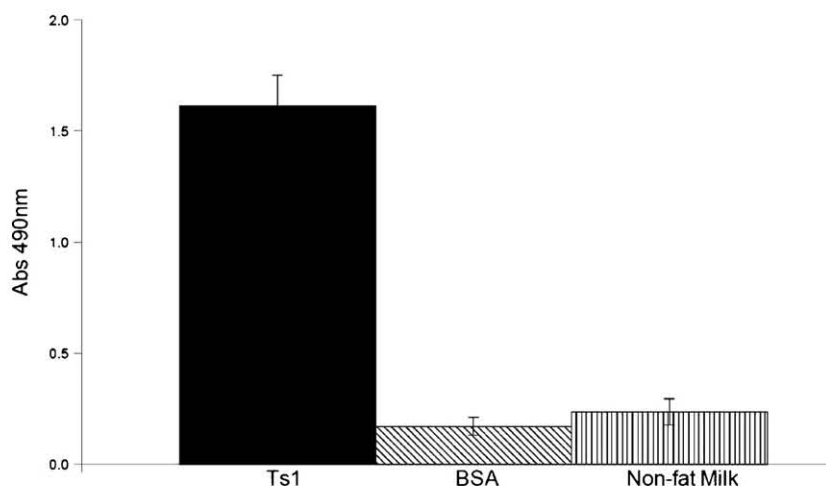
## 2.6. Neutralization assays

The LD<sub>50</sub> of toxin Ts1 was estimated by the up and down method [28], before conducting the neutralization assays in mice. The mortality of 50% population was caused by 7.6 µg/20 g of mouse weight. One LD<sub>50</sub> of Ts1 was incubated with purified scFv at a molecular ratio of 1:10 (toxin:scFv) for 30 min at 37 °C. After the incubation period the mixture was injected intraperitoneally to male mice (CD1 strain). The mice were continuously monitored during 8 h after injection and surviving mice were counted at 24 h. The number of animals was kept to a minimum necessary to proof the concept, in order to avoid inflection of pain to vertebrates, according to the Ethical Committee for Animal Care of our Institute, which approved our protocol.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Isolation and characterization of scFv

Combinatorial scFv library was submitted to screening process against toxin Ts1. In the initial attempts it was not possible to isolate antibodies with desired characteristics (recognition of Ts1). Most clones contained inserts of inadequate sizes, usually smaller than expected. Smaller size favors their enrichment because they are energetically less demanding for the bacteria. In our experience using the phage display technique, truncated or incomplete antibodies, usually overgrow the culture compared to the complete forms of antibodies. As a consequence, the phage antibodies recovered during biopanning are enriched in those incorrect truncated forms [29,30]. Fig. 1A shows an example of ten clones randomly selected after two rounds of screening. Only 20% of the plasmid analyzed (lanes 3 and 6) had the expected size compared to positive controls (lanes 1–2). In order to reduce the appearance of background noise, which would make more difficult the selection of functional scFv, purification and digestion of plasmids from



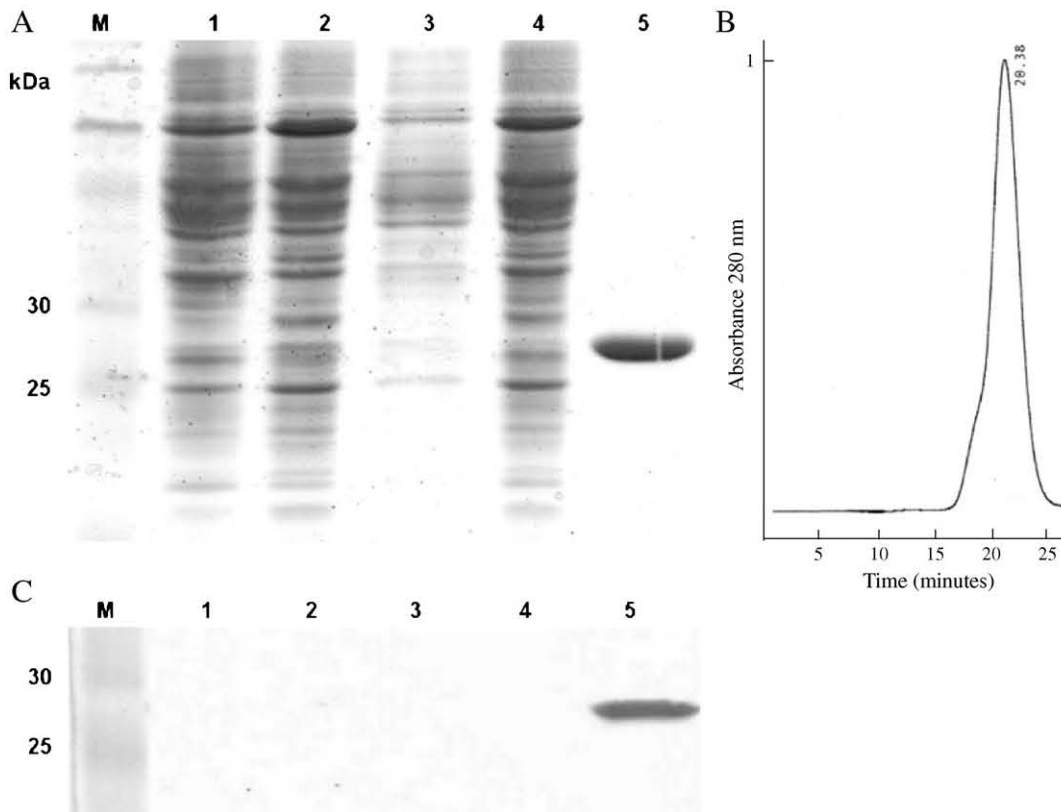
**Fig. 2.** ELISA of recognition of Ts1 by phage antibodies The recognition was evaluated by means of ELISA; the plate was coated with either Ts1 at concentration of 1 µg/mL, BSA or non-fat milk at 2% (w/v). Ts1 was better recognized by the monoclonal phage-antibody 15e. The binding to BSA and milk was marginal. The titer of amplified phage-antibodies was  $1 \times 10^{11}$  phages/mL. Values are the average ± SE of three experiments.



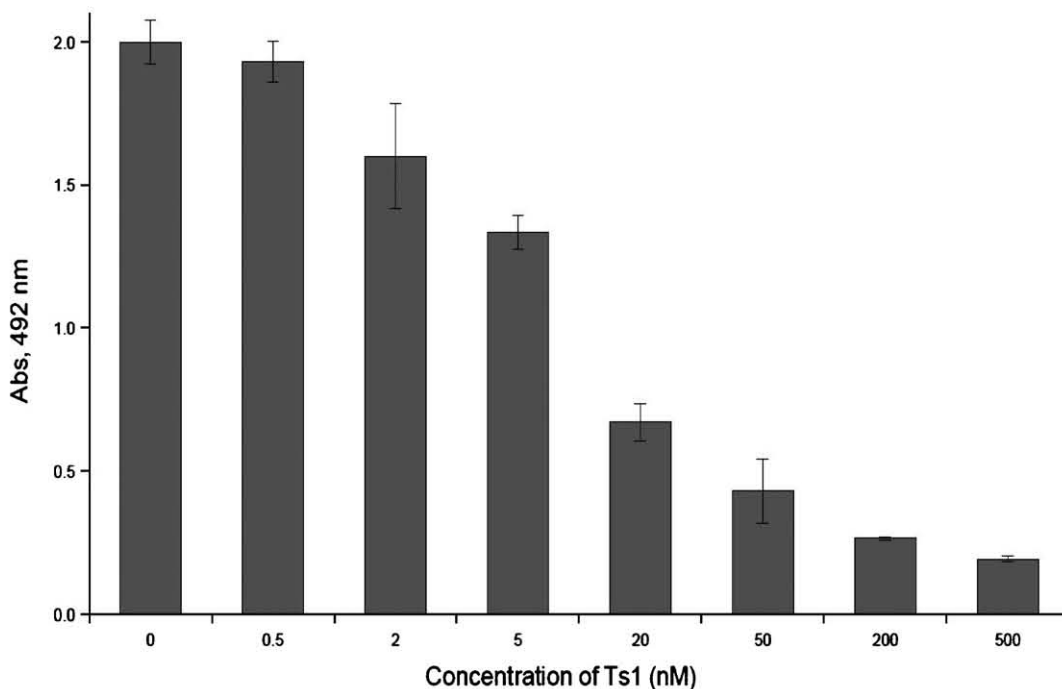
**Fig. 3.** Amino acid sequence of 15e, a scFv against Ts1 selected from human repertoire VH and VL stand for the variable regions of the heavy and light segments of the scFv, respectively. Between VH and VL domains there is a linker peptide (G4S)<sub>3</sub>. When the sequence was analyzed by BLAST, the hits of highest scores were human immunoglobulins, where the closest antibody was 73% identical. The CDRs were determined according to the Kabat definitions.

the second round of panning were carried out. The pool of inserts with right size was subcloned into the phagemid pSyn2 to build a novel library and two additional rounds were performed; the output clones were also analyzed. As shown in Fig. 1B, almost all the plasmids contained inserts very close to the expected sizes; therefore, subcloning seems to be a good strategy to avoid enrichment of clones useless and to promote selection of good antibody candidates for future analysis. After last round of biopanning 86 clones were randomly selected to evaluate their ability to recognize Ts1. In

an ELISA test using phage-antibodies 17 clones showed absorbance values greater than 1. This was set as a minimum value for considering the results positive and worth continuing characterization. Their plasmid DNA were purified, sequenced and compared with database using the BLAST algorithm [31]. From the total number of clones assayed only two distinct scFv were identified, which were called 15e and 71d. These clones were represented 11 and 6 times, respectively, in the whole pool. Unfortunately the clone scFv 71d was not detectable as soluble protein. When the 71d



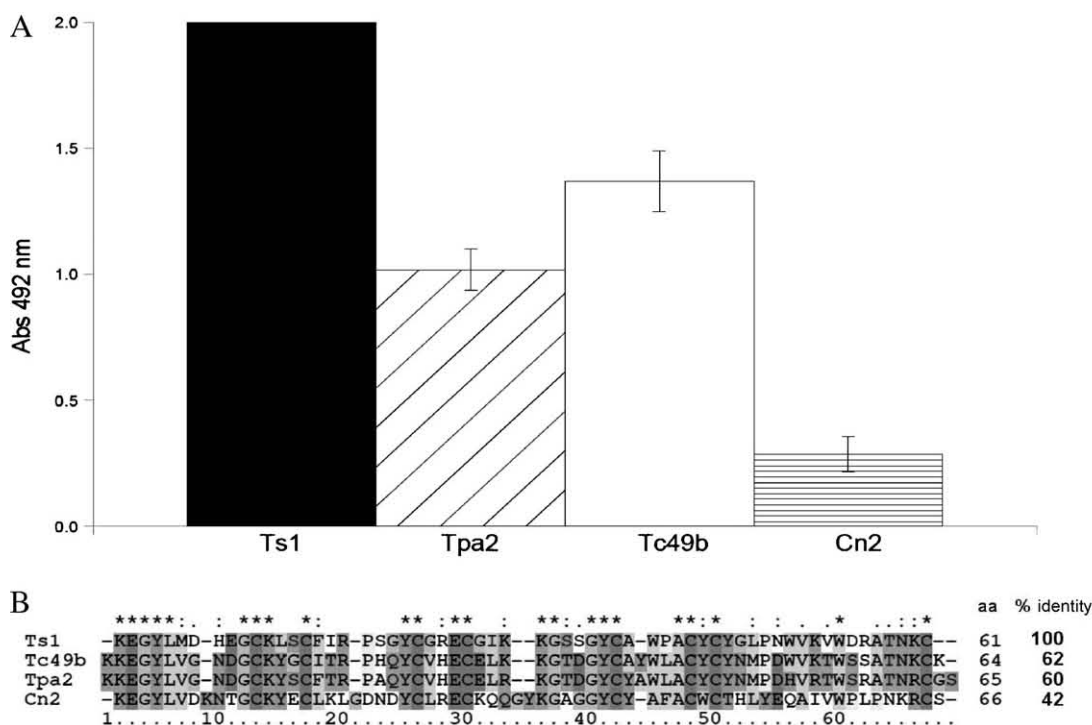
**Fig. 4.** Purification of scFv 15e. (A) This picture shows the results of 12% SDS-PAGE. Lane 1 corresponds to a sample of non induced culture; lane 2, material that does not bind to the affinity column; lanes 3 and 4 correspond to protein washed with low concentration of imidazole (35 mM); lane 5 is highly purified scFv after affinity elution with 300 mM imidazole and molecular weight exclusion separation as shown in (B) (see Section 2 for details). (C) This picture shows the Western blot of lanes 1–5 of (A), where the only positive spot is that corresponding to the highly purified scFv. M stands for the prestained Protein Markers, Broad Range (New England Biolabs).



**Fig. 5.** Competition ELISA. Effect of different concentrations (0–500 nM) of Ts1 toxin on the recognition of scFv 15e to immobilized toxin. The bars show the mean ± SE of three independent experiments of immunodetection of free scFv after incubation with different quantities of toxin.

clone was expressed as phage-antibody, still fused with protein pIII of the phage, it was shown to be an excellent ligand. However, when expressed in solution as a free scFv, it showed poor recognition. The same results were found by several other investigators, whose works demonstrated low stability of scFv isolated [32–35].

For this reason this work was continued with clone 15e. The binding capacity in the format of phage-antibody was confirmed by ELISA (Fig. 2). The absorbance value for Ts1 was significantly higher than for the blocking agents used as control in the screening. Nucleotide sequence was confirmed and analyzed on the IMG database [36].



**Fig. 6.** Cross reactivity of scFv 15e. (A) ELISA recognition of three different toxins from scorpions of the genus *Tityus*. Individual wells of the plate were coated with 0.2 µg each, of: Ts1, Tpa2, Tc49b and Cn2 (toxin from a distinct genus). Incubation was performed with highly purified scFv at 50 µL (1 µg) in each well. Commercial antibodies were used for detection: mouse c-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology) as primary antibody and HRP-coupled goat anti-mouse (Bio-Rad Laboratories) as secondary antibody. Values are the mean ± SE of three experiments. (B) Amino acid sequence alignment of toxins included in ELISA. The identity percent refers to the sequence of Ts1. Asterisks indicate identity, double dots means conserved substitutions and single dots means semi-conserved substitutions as defined in CLUSTALX (v.2.1).

**Table 1**  
*In vivo* protection experiments.

Sample <sup>a</sup>	LD <sub>50</sub> <sup>b</sup>	Molar ratio toxin:scFv	Survival ratio (alive/total) <sup>c</sup>
Test A			
scFv 15e	–	–	4/4
Ts1	1	–	2/4
Ts1:15e	1	1:10	5/6
Test B			
scFv 15e	–	–	10/10
Ts1	1	–	1/4
Ts1:15e	1	1:10	7/10

<sup>a</sup> CD1 mice were treated by intraperitoneal injection of scFv, toxin or the mixture as indicated.

<sup>b</sup> 1 LD<sub>50</sub> of Ts1 corresponds to 7.6 µg/20 g mouse weight.

<sup>c</sup> Survival of mice 24 h post injection.

Fig. 3 shows the amino acid composition of scFv 15e, which is related to the family VH6 and VK4 for VH and VL domains, respectively. The light chain had 99% identity with the nearest germ line gene IGVK4-1 and 93% for heavy chain with IGVH6-1 segment. Interestingly clone 15e is not composed by segments of domains most frequently represented in human repertoire, such as VH3 [37,38].

### 3.2. Expression and purification

The DNA sequence corresponding to the scFv was cloned into the vector pSyn1 for production of the corresponding protein in soluble format. The construction was employed to transform *E. coli* TG1 cells by electroporation. After the induction with IPTG, the periplasmic fraction was obtained by osmotic shock and the soluble material was applied to the immobilized metal affinity chromatography (IMAC) followed by molecular exclusion purification. The purified material was analyzed by SDS–PAGE and immunodetected. Fig. 4 shows the results of the assays, the presence of a single band with correct size indicates the successful purification of the scFv which can be confirmed with the gel filtration chromatography profile. Usually the final yield of pure scFv was in the order of 1.0 mg/L of cell culture. The purified protein and the periplasmic extracts were verified in an ELISA test, in order to confirm that both, the soluble antibody and the antibody attached to the phage were able to bind to Ts1 (Fig. 2). However, in order to confirm the recognition of scFv 15e toward the toxin, an ELISA competition test was performed (Fig. 5). Addition of a mixture of increasing concentrations of free Ts1 with a fixed concentration of scFv15e decreases the recognition of the antibody to the he bound toxin on the plate. These results clearly showed the abrogation of the binding of scFv 15e to immobilized Ts1.

### 3.3. Cross-reactivity recognition with related toxins

Recently, our group has confirmed that a given scFv can, in fact, cross-react with similar toxins purified from different species of scorpions of the genus *Centruroides* [39]. These toxins are known to cause envenomings in Mexico. Meanwhile, in South America, *T. serrulatus* is considered the most dangerous scorpion; however there are other species which are involved in fatal cases [40–42]. Toxic peptides purified from two of these species (*T. pachyurus* and *T. cambridgei*) were isolated earlier by our group [24,25] and used here to verify if the selected scFv 15e was capable of recognizing these peptides as well. The rationale was based on the fact that extended amino acid sequence identity of the toxic peptides from the three species of *Tityus* scorpion existed among the toxic peptides. They are all lethal to mice and it might well be that the epitope recognized by scFv15e could be similar, hence could exert a potential protective cross reactivity to more than one scorpion species.

Fig. 6A shows that the scFv 15e is capable of recognizing much better toxic peptides isolated from related genus of scorpions. The toxic peptides used were Tpa2 from the Colombian scorpion *T. pachyurus* and Tc49b from the Brazilian *T. cambridgei*. As it can be seen in Fig. 6B, they share at least 60% identical positions on the sequence occupied by same amino acid residues. Another toxin (Cn2) purified from another genus of scorpion (*C. noxius* from Mexico), which has less sequence similarities (~40%) to Ts1 gave a poor signal of cross-reactivity, as it might have been expected. These results indicate that low levels of recognition suggest that the fragment 15e can effectively discriminate different epitopes of the toxins studied.

### 3.4. Neutralization assays

This manuscript describes the isolation of a scFv that recognizes Ts1 in ELISA tests. One of the main objectives of this work was to select and characterize a human antibody fragment from the phage display library we have that could protect against the toxic effects of Ts1 *in vivo*. For this reason, the neutralization capacity of scFv 15e was tested in CD1 mice. The results of the *in vivo* experiments are shown in Table 1. The rationale was to verify if the *in vitro* experiments could be confirmed by *in vivo* experimentation. The purified antibody 15e was also tested for any possible deleterious effect on the experimental mice. It was demonstrated that the scFv 15e alone is innocuous to the tested animals (Table 1). Two independent experiments were conducted: the first time using a 1:10 molar ratio toxin:antibody, 5 mice out of 6 survived the challenge, whereas the 4 control animals injected with only Ts1 had a 50% deadly rate, as expected for an LD<sub>50</sub> application. Furthermore, the animals injected with a mixture of toxin/antibody show symptoms of intoxication much latter (a couple of hours) than those injected with only toxin. Non protected animals showed symptoms of intoxication at the first minutes after injection and usually died by the hour of the onset of the experiment. For the second experiment a bigger number of mice were assayed. From 10 animals used, 7 survived the challenge, showing again a protective effect of the 15e scFv. In this experiment the same prolongation of toxic symptoms was observed in the animals receiving the mixture of toxin/scFv; the deadly cases occurred with mice after approximately 3 h after challenge. In both experiments the animals injected with toxin Ts1 pre-incubated with scFv 15e survived much better the assay compared to the control animals. It would be desirable to have obtained a 100% protection, as shown for the case of the antibody 6009F and Cn2 of *C. noxius* [15]. The experience generated in our group however, is consistent with the idea that having found a human scFv capable of recognizing a given toxin is the key point for conducting experiments of maturation *in vitro* by directed evolution, as recently shown by our group working with other toxins [39]. Furthermore, the maturation process revealed important residues to improve the functional properties of isolated variants when compared to the parental scFv. When two or more of the favorable variants are combined by genetic engineering *in vitro*, the production of a scFv with stronger cross-reactivity and potent neutralization activity was found [39].

Thus, we are quite confident that our 15e clone is a *bona fide* candidate for the development of a really protective antibody against toxins from scorpions of the genus *Tityus* from South America.

## 4. Conclusion

Using the methodology of phage display it is possible to obtain human scFv capable of recognizing scorpion toxins; in this case, Ts1 from the scorpion *T. serrulatus*, Tpa2 from *T. pachyurus* and Tc49b from *T. cambridgei*, all dangerous scorpions of South American countries. The strategy of eliminating abnormal clones that

contain different sizes than the expected ones, at the beginning of the biopanning process, should increase the probability of finding antibodies best fitted for the recognition of the antigen under study.

The clone 15e selected and characterized as described is capable of partially protecting mice challenged with 1 LD<sub>50</sub> of Ts1. Complete protection will be reached by generating optimized variants of scFv15e using directed evolution and phage display, as already described for other scorpion toxins by our group [39].

## Acknowledgements

The authors are indebted to M.Sc. Timoteo Olamendi-Portugal for the DNA sequences determination, Mr Fredy Coronas for purification of the toxins and Dr. Pável Espino-Solis for technical assistance during the LD<sub>50</sub> determination. We also thank to DVM Elizabeth Mata and IBI Marcela Ramírez for animal provision. This work was partially supported by grants from DGAPA-UNAM (grant IN204110) to LDP and Institute Bioclon S.A. de C.V. to LDP and BB. The scholarship to IA from CONACyT (No. 16266) is also acknowledged.

## References

- [1] Laffly E, Sodoyer R. Monoclonal antibodies 30 years of success. *J Soc Biol* 2006;200:325–43.
- [2] Oldham RK, Dillman RO. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J Clin Oncol* 2008;26:1774–7.
- [3] Laffly E, Sodoyer R. Monoclonal and recombinant antibodies 30 years after. *Hum Antibodies* 2005;14:33–55.
- [4] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495–7.
- [5] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315–7.
- [6] Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:767–74.
- [7] Pande J, Szwedczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* 2010;28:849–58.
- [8] Ho M, Feng M, Fisher RJ, Rader C, Pastan I. A novel high-affinity human monoclonal antibody to mesothelin. *Int J Cancer* 2011;128:2020–30.
- [9] Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:523–8.
- [10] Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *MABs* 2010;2:77–83.
- [11] Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop* 2008;107:71–9.
- [12] Dehesa-Davila M, Possani LD. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 1994;32:1015–8.
- [13] Ministério da Saúde, Brasil. Acidentes com animais peçonhentos crescem quase 33% nos últimos seis anos; 2010. Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalleNoticia&id.area=1498&CO.NOTICIA=11570> [last accessed 31.03.11].
- [14] Licea AF, Becerril B, Possani LD. Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 1996;34:843–7.
- [15] Riaño-Umbarila L, Juárez-González VR, Olamendi-Portugal T, Ortíz-León M, Possani LD, Becerril B. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J* 2005;272:2591–601.
- [16] Possani LD, Martin BM, Mochca-Morales J, Svendsen I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Carlsberg Res Commun* 1981;46:195–205.
- [17] Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem J* 1985;229:739–50.
- [18] Kirsch GE, Skattebøl A, Possani LD, Brown AM. Modification of Na channel gating by an alpha scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *J Gen Physiol* 1989;93:67–83.
- [19] Mendes TM, Dias F, Horta CC, Pena IF, Arantes EC, Kalapothakis E. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. *Toxicon* 2008;52:787–93.
- [20] Duarte CG, Alvarenga LM, Dias-Lopes C, Machado-de-Avila RA, Nguyen C, Molina F, et al. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion venom by antibodies raised against a discontinuous synthetic epitope. *Vaccine* 2010;28:1168–76.
- [21] Aubrey N, Muzard J, Juste M, Billiard P. Recombinant antibodies: towards a new generation of antivenoms? *J Soc Biol* 2006;200:345–54.
- [22] Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J Proteomics* 2009;72:183–99.
- [23] Zamudio F, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Héron P, Possani LD. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* 1992;204:281–92.
- [24] Barona J, Batista CVF, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Wanke E, Otero R, et al. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:76–84.
- [25] Batista CV, Zamudio FZ, Lucas S, Fox JW, Frau A, Prestipino G, et al. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na(+)-channels. *Toxicon* 2002;5:557–62.
- [26] Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991;222:581–97.
- [27] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4.
- [28] Dixon WJ. The up-and-down method for small samples. *JAMA* 1965;60:967–78.
- [29] de Bruin R, Spelt K, Mol J, Koes R, Quattrocchio F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* 1999;17:397–9.
- [30] Jacobin MJ, Robert R, Pouns O, Laroche-Traineau J, Nurden A, Peter K, et al. Improving selection of α1bβ3-binding phage antibodies with increased reactivity derived from immunized donors. *Clin Immunol* 2003;108:199–210.
- [31] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [32] Wörn A, Plückthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 2001;305:989–1010.
- [33] Poon KM, Tam FC, Chui YL, Lim PL. Single-chain Fv fragment lacks carrier specificity of the native antibody. *Mol Immunol* 2002;39:19–24.
- [34] Jensen KB, Larsen M, Pedersen JS, Christensen PA, Alvarez-Vallina L, Goletz S, et al. Functional improvement of antibody fragments using a novel phage coat protein III fusion system. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:566–73.
- [35] Goswami P, Saini D, Sinha S. Phage displayed scFv: pIII scaffold may fine tune binding specificity. *Hybridoma (Larchmt)* 2009;28:327–31.
- [36] Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database®. *Leukemia* 2003;17:260–6.
- [37] Davidkova G, Pettersson S, Holmberg D, Lundkvist I. Selective usage of VH genes in adult human B lymphocyte repertoires. *Scand J Immunol* 1997;45:62–73.
- [38] Stollar BD. The expressed heavy chain V gene repertoire of circulating B cells in normal adults. *Ann N Y Acad Sci* 1995;29:265–74.
- [39] Riaño-Umbarila L, Contreras-Ferrat G, Olamendi-Portugal T, Morelos-Juárez C, Corzo G, Possani LD, et al. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single-chain antibody fragment. *J Biol Chem* 2011;286:6143–51.
- [40] Lira-da-Silva RM, de AMORIM AM, Kobler T. Envenomation by *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) in Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:239–45 [online].
- [41] Otero R, Navío E, Céspedes FA, Núñez MJ, Lozano L, Moscoso ER, et al. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical epidemiological and therapeutic aspects. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98:742–50.
- [42] Ministério da Saúde, Brasil. Manual of scorpions control, Série B. Textos Básicos de Saúde; 2009. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_escorpiones\\_web.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_escorpiones_web.pdf) [last accessed 31.03.11].