



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas

OBTENCIÓN DE LIGANDOS POTENCIALMENTE
INHIBIDORES DE LA FIBRIOLOGÉNESIS DE
CADENAS LIGERAS LAMBDA VI

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:
Q.F.B. Brenda Linda Alvarado Espinoza

Tutor:
Dr. Baltazar Becerril Luján

Cuernavaca, Morelos

Agosto de 2007



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.

DEDICATORIA

A Víctor René

Por ser la razón de mi existir, de mi paciencia, de mi perseverancia. Por brindarme tanta luz, alegría y felicidad. Porque sé que todo movimiento mío, lo veras y lo aprenderás, y por ello me esforzaré para ser alguien mejor.

Porque como todo niño ansioso por vivir y explorar, tendrás un gran espíritu y carácter para hacerlo. Porque sé que si algún día yo puedo ser alguien grande, tu tendrás la oportunidad de ser aún mejor, porque yo me responsabilizaré de eso. Y no me preocupo, no estoy sola en mi misión, Dios estará conmigo para completarla.

A Linda Onil

Una pequeña traviesa, que me dejó muchas enseñanzas, un apoyo enorme, y una profunda tristeza al tener que irse de nuestro lado. Todas te extrañamos Huitzi.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su comprensión, cariño y apoyo, y a mi hermano por ser cómplice y amigo, los quiero muchísimo.

A Victor Antonio, por su apoyo y paciencia. Gracias por darme el regalo más hermoso que alguna vez soñé tener... Victor Rene. Los amo.

A mis tutores, el Dr. Daniel Alejandro Fernández, la Dra. Adela Rodríguez y el Dr. Baltazar Becerril por sus atinadas recomendaciones y la orientación recibida.

A los demás miembros del Jurado por sus observaciones y sugerencias para la presentación del presente documento: Dr. Lourival Possani, Dr. Ruy Pérez, Dra. Rosana Sánchez y Dra. Isabel Gómez.

A mis compañeros de laboratorio, muy en especial a Lidia Riaño y Ernesto Ortiz por guiarme en el transcurso del presente proyecto. A Martha Pedraza del laboratorio de la Dra. Rodríguez; Itzel, Rosalba, Rivelino, Verónica, Timo, Israel, Santos, Citlali del grupo del Dr. Becerril; a Mary, Gina E., Paty, Elia, Ricardo, Gina G., Fernando, Fredy, Gerardo, Sergio, Cipriano, Blanca, Omar, Christian, Verna y Cinthia del grupo del Dr. Possani, por su valiosa opinión acerca del proyecto, compañía y amistad durante mi estancia en el laboratorio. A María Canela, Carmen Martínez, Linda Espinoza, y Marisol Chevez por su auxilio a nivel administrativo y cuestiones generales del laboratorio.

A Luis del Pozo, por su motivación, orientación y donación de las proteínas recombinantes 6aJL2 y R25G. Al laboratorio del Dr. Allan Solomon, del Centro Médico de la Universidad de Tennessee, Knoxville, TN, USA, por facilitar el anticuerpo monoclonal 55-5-F5.

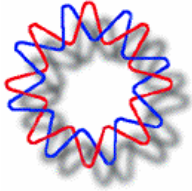
A los Dres. Alexei Licea y Marco Ramos por generar mi interés inicial de trabajar en la Institución donde se desarrolló el proyecto.

Al IBT y sus catedráticos, a los que les debo mi formación. Mi completo agradecimiento y admiración.

A mis hermanos scouts por supuesto, que aunque no haya sido frecuente nuestro contacto en los últimos años, siempre estarán conmigo animándome y brindándome su amor y apoyo. Gracias Ceci, Yessica, Magally, Mayela, Víctor, Brenda, Manuel, Pepe, Edgar, Saúl, Toño, Carmen, Tere, Linda, Mario, Ramón, Salomón, Bernardo, Miriam, José de Jesús, Cesar, Edson, Jorge, Carlos, Julio... la lista es larga.

A mis niñas Laura, Linda, Elsa, Mayté, Melanie, Valeria, Sarahí por todas sus locuras y las enseñanzas que me ofrecieron. Siempre estarán ustedes conmigo y yo con ustedes...

S.L.P.S.
Brenda Linda Alvarado Espinoza



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, del Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Baltazar Becerril Luján.

Su desarrollo fue posible gracias al apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registro de CONACYT no. 190596).



Se agradece al Instituto Bioclon de Laboratorios Silanes, S. A de C.V. mediante su apoyo otorgado mediante el proyecto P 156

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i, ii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2,3
II. ANTECEDENTES	4-14
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.2.1 Despliegue en fagos filamentosos	18-20
5.2.2 Análisis de las clonas seleccionadas.....	20-21
5.2.3 ELISA de especificidad con fago-anticuerpos	21
5.2.4 Análisis de expresión de las clonas seleccionadas	22
5.2.5 Subclonación en el vector de expresión.....	22-24
5.2.6 Digestión y Ligación	24-26
5.2.7 Expresión y purificación del anticuerpo.....	26-27
5.2.8 Detección	27-28
5.2.9 Ensayo de inhibición de extensión de fibrillas.....	28-32
5.2.10 Ensayos de estabilidad funcional	32
5.2.11 Ensayo de competencia con el anticuerpo monoclonal 55-5-F5	32-33
VI. RESULTADOS	34-42
VII. DISCUSIONES	43-46
VIII. CONCLUSIONES	47
IX. PERSPECTIVAS	47
X. REFERENCIAS	48-52
ANEXOS	53-55

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia	IMAC	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
Ab	Anticuerpo	IPTG	Isopropil- β -D-fio-galactósido
AL	Amiloidosis de cadenas ligeras	Kan	Kanamicina
Amp	Ampicilina	Kb	Kilobases
BSA	Del inglés, Bovine Serum Albumin	KDa	Kilodaltons
°C	Grados Celsius	KV	Kilovolts
CDR3	Región determinante de la complementariedad número 3	L	Litros
cbp	Cuanto baste para	μ F	Microfaradays
Cm	Concentración media	μ g	Microgramos
ΔG_{unf}	Cambio de energía libre de la proteína desplegada	μ L	Microlitros
DNA	Del inglés deoxiribonucleic acid	M	Molar
D.O.	Densidad óptica	m	Pendiente
ELISA	Del inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay	mg	Miligramos
F_{ab}	Fragmento de anticuerpo constituido por la cadena ligera, además del dominio variable y el primer dominio constante de la cadena pesada.	mM	Milimolar
FDA	Del inglés, Food and Drug Administration	min	Minutos
g	Gramos	mL	Millilitros
GdnHCl	Cloruro de guanidinio	mseg	Milisegundos
Glu	Glucosa	MgSO ₄	Sulfato de magnesio
HCl	Acido clorhídrico	NaCl	Cloruro de Sodio
hr	Hora	nm	Nanómetros
IgG	Inmunoglobulina G	NotI	Enzima de restricción proveniente de <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
		Ω	Ohms
		ON	Toda la noche (Del inglés, over night)
		OPD	θ -fenilendiamina

pb	Pares de bases	seg	Segundos
PBS	Del inglés, phosphate buffer saline	Sfil	Enzima de restricción proveniente de <i>Streptomyces fimbriatus</i>
PCR	Del inglés, polymerase chain reaction	TAE	Buffer compuesto de Tris base, ácido acético y EDTA
PDB	Del inglés, protein data bank	TBE	Buffer compuesto de Tris base, ácido bórico y EDTA
PEG	Polietilenglicol	Tc	Tetraciclina
pH	Potencial de hidrógeno	TE	Buffer compuesto de Tris base y EDTA
p/p	Porcentaje peso/peso	TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen-etilendiamina
PPB	Buffer Tris con EDTA y sacarosa	ThT	Tioflavin T
rpm	Revoluciones por minuto	ufc	Unidades formadoras de colonias
rV _L	Fragmento de anticuerpo recombinante, que comprende el dominio variable de su cadena ligera.	UV	Ultravioleta
Rx	Reacción	V _L	Fragmento variable de la cadena ligera de inmunoglobulinas.
SB	Medio de cultivo enriquecido, del inglés "Super broth"	V _H	Fragmento variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas.
scFv	Del inglés, single chain variable fragment. Comprende el dominio variable de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo, unidos por un péptido flexible.	V _H H	Dominio variable de un anticuerpo unidominio de cadena pesada de camélidos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio		

RESUMEN

Los péptidos o proteínas, bajo ciertas condiciones, pueden convertirse de su forma soluble a agregados fibrilares, y dichas transiciones pueden dar lugar a condiciones patológicas que van desde desórdenes neurodegenerativos a amiloidosis sistémicas. Este último grupo de enfermedades se caracteriza por el depósito de fibrillas proteicas en órganos y/o tejidos, las cuales tienen propiedades ópticas y tintoriales específicas. Sin embargo, dado que las bases moleculares de las amiloidosis no se encuentran totalmente esclarecidas se ha dificultado encontrar un tratamiento más eficaz para las mismas. Por ello se ha recurrido a la generación de un modelo peptídico, un fragmento variable de cadena ligera humana denominado 6aJL2 (Del Pozo-Yauner, L, et al, artículo sometido) que ha permitido el estudio de la amiloidosis AL, enfermedad generada por cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Este modelo, ha coadyuvado para encontrar potenciales agentes inhibidores de la agregación.

La generación de fragmentos de anticuerpos ha resultado ser una vía de gran utilidad para la obtención de ligandos de alta afinidad. Estos ligandos, pueden tener la capacidad de aumentar la eficiencia y velocidad de una reacción, de bloquear reacciones enzimáticas, tener un uso preventivo y terapéutico. La posibilidad de su aislamiento mediante la metodología del despliegue en fagos ha abierto las puertas para encontrar moléculas dirigidas contra blancos específicos que permiten el análisis y manipulación de interacciones entre proteínas. De esta forma, en el presente trabajo se describe el desarrollo de fragmentos de anticuerpos humanos aislados de un repertorio no inmune (sin previa maduración del anticuerpo), mediante el despliegue en fagos. Utilizando una biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), se ha aislado el scFv 7D con capacidad de reconocimiento tanto de la forma soluble como de la fibrilla formada por 6aJL2. De acuerdo a los valores de fluorescencia con Tioflavin T, el scFv 7D tiene una capacidad inhibitoria de la extensión de fibrillas formadas por 6aJL2 y R25G (Del Pozo-Yauner, L, et al, artículo sometido) en alrededor de un 53% y 85% respectivamente, cuando es utilizado en una proporción 1:1 de monómero 6aJL2:scFv 7D. Además, según los ensayos de estabilidad funcional, pierde el 75% de la capacidad de reconocimiento al monómero en presencia de 0.5 M de cloruro de guanidinio; sin embargo, la mantiene en un 80% a la fibrilla, a concentraciones crecientes del agente desnaturizante. Así mismo, la capacidad del reconocimiento del monómero y la fibrilla se ve abatida en un 70% al aumentar la temperatura a 37°C. Por otro lado, mediante un ensayo de competencia por ELISA, el scFv 7D reconoció un epítipo distinto al que reconoce un anticuerpo monoclonal murino 55-5-F5 (Solomon, A., et al) dirigido específicamente contra el monómero de 6aJL2 (control positivo), ya que no se observó ningún desplazamiento del scFv por este último.

El scFv 7D representa un agente potencialmente terapéutico de una gran variedad de amiloidosis. Además, es un anticuerpo susceptible a ser modificado por maduración *in vitro* para mejorar propiedades tales como la estabilidad, afinidad y la capacidad inhibitoria de la agregación de proteínas amiloidogénicas.

I. INTRODUCCION

Las amiloidosis

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades que pueden ser localizadas o sistémicas, con una severidad y resolución variables. Tienen como característica común la deposición, en diferentes órganos y tejidos, de agregados fibrilares con propiedades ópticas y tintoriales específicas (birrefringencia verde manzana en microscopía de polarización cuando son teñidos con rojo congo). Estos agregados son insolubles en solventes fisiológicos y resistentes a la acción de proteasas.^{1,2}

Se conocen más de 20 proteínas y péptidos (Tabla 1) capaces de agregarse en forma de amiloide in vivo y provocar enfermedad. Entre ellas se encuentran las cadenas ligeras de inmunoglobulinas y sus fragmentos, la transtiretina, los priones, la proteína A de fase reactiva, la insulina, la β 2-microglobulina, el péptido natriurético atrial, y otras proteínas y péptidos con funciones aún no bien conocidas.³⁻⁵ Si bien estas proteínas difieren significativamente en su estructura primaria y tridimensional y/o proporción de estructuras secundarias de tipo hoja plegada β y hélice α , todas dan lugar a fibras muy parecidas al microscopio electrónico, cuyo núcleo estructural es común. Se conoce que cualquiera que sea el origen de las fibras, éstas poseen una estructura caracterizada por hebras β que se orientan perpendicularmente al eje mayor de la fibra, las cuales dan lugar a extensas hojas β que se extienden paralelamente al eje mayor de la fibra. Este motivo se ha denominado "estructura β cruzada" y es responsable del patrón de difracción que se ha obtenido de fibras. Al microscopio electrónico los agregados amiloides están formados por fibras no ramificadas de 8 a 10 nm de diámetro y con longitud variable.^{6,7}

Tabla 1. Algunas proteínas amiloidogénicas asociadas con enfermedad.

Proteína amiloidogénica	Tipo de estructura	Enfermedad	Distribución de la proteína depositada, en tejido
Proteína prion y sus fragmentos	Fragmento N-terminal (23-121) desplegado en forma nativa, dominio C-term (121-230) en α -hélice predominantemente	Creutzfeld-Jacob, encefalopatía bovina espongiiforme	Cerebro
β -Amiloide y sus fragmentos	Desplegado en forma nativa	Alzheimer, amiloidosis cerebrovascular	Cerebro
Huntingtina	α -Helical (pero el axon 1 desplegado, forma fibrillas)	Huntington	Cerebro
Amiloide sérico A y fragmentos	$\alpha + \beta$	Amiloidosis AA	Vejiga, estómago, tiroides, riñón, bazo, hígado, tracto gastrointestinal
Amilina	Desplegado en forma nativa	Diabetes mellitus tipo II	Páncreas
Lisozima	$\alpha + \beta$	Amiloidosis sistémica hereditaria	Diversas visceras y tejidos
Transtiretina	Hojas β predominantemente	Amiloidosis sistémica senil	Casi todos los órganos y tejidos, incluyendo el corazón, glándulas, arterias, huesos, hígado, tracto digestivo.
Dominios variables de cadenas L de anticuerpos	Hojas β	Amiloidosis AL	Casi todos los órganos y tejidos, incluyendo el corazón, glándulas endocrinas, hígado, riñón, bazo, tracto gastrointestinal, piel, lengua, sistema

			nerviosos periférico.
α -sinucleína	Desplegada en forma nativa	Parkinson	Cerebro

Amiloidosis de cadenas ligeras

El depósito sistémico de fibrillas amiloides derivadas de cadenas ligeras de inmunoglobulinas y/o sus fragmentos es el agente causal de la amiloidosis AL, lo cual se asocia a disfunción de uno o varios órganos. Los órganos más comúnmente afectados son: riñones, corazón, hígado y los nervios del sistema periférico. Una población de células plasmáticas monoclonales es la fuente de las cadenas ligeras amiloidogénicas que, si bien no es abiertamente maligna, si posee frecuentemente alteraciones genéticas importantes. Dadas las características de las células productoras de la proteína amiloidogénica, en la amiloidosis AL, a diferencia de otras amiloidosis, hay una alta heterogeneidad en la secuencia de la proteína que se agrega. Esto se debe a las numerosas mutaciones somáticas que se acumulan en el dominio variable de las inmunoglobulinas maduras. Esta heterogeneidad en la secuencia determina variabilidad en la evolución clínica de los pacientes.⁸

Se sabe que las propiedades que determinan la tendencia a la agregación amiloide están codificadas en el dominio variable. El isotipo λ es tres veces más frecuente que el κ entre estas proteínas y se ha reportado que entre el 20 y el 40% de los casos de amiloidosis AL provocados por cadenas ligeras λ son causados por el subgrupo $\lambda 6$. La alta frecuencia de este subgrupo en la amiloidosis contrasta con su baja expresión en el repertorio de IgG de individuos sanos, que es de aproximadamente 2%. Dado que la familia $\lambda 6$ se compone de un único segmento de gen de V_L (el gen δa), se ha planteado que el, o los factores que determinan la tendencia a la agregación amiloide de las cadenas ligeras $\lambda 6$ están codificados en este segmento génico.⁹⁻¹² Sin embargo, en nuestro grupo recientemente se demostró que la línea germinal es poco fibrillogénica.

Si bien se acepta que el determinante mayor de la amiloidogenicidad de las cadenas ligeras es la estructura primaria del dominio variable (porque determina la distribución espacial de los átomos, involucrados en las interacciones que estabilizan las fibrillas), no se excluye la posibilidad de que hay otros factores involucrados que puedan influir de algún modo en el proceso de formación de los depósitos amiloides. Ejemplos de estos factores son: síntesis proteica, concentración de las cadenas ligeras en los fluidos corporales, glicosilación proteínica y características biológicas particulares de cada paciente.^{1,13}

II. ANTECEDENTES

Mecanismo de formación de amiloides

Aunque la agregación de proteínas amiloides es un fenómeno común a un gran número de enfermedades de origen muy diverso (infecciosas, genéticas, inflamatorio-degenerativas y por causa desconocida) y por ende, de gran importancia clínica, el o los mecanismos que lo explican no han sido totalmente esclarecidos.

Se han estudiado un gran número de cadenas ligeras amiloidogénicas; sin embargo, no se ha logrado establecer alguna secuencia consenso que determine la agregación, lo cual se dificulta significativamente por la alta variabilidad en la estructura primaria que presentan estas proteínas. A pesar de ello, evidencias experimentales sugieren que mutaciones en ciertas regiones pueden modificar profundamente el comportamiento fibrillogénico de algunas cadenas ligeras.⁶ Los resultados experimentales obtenidos por nuestro grupo indican que la región amino terminal está íntimamente implicada en el mecanismo de agregación de las cadenas ligeras λ 6.

Para explicar las bases moleculares de la formación de amiloides se ha propuesto que la agregación ocurre cuando la estructura rígida de la proteína nativa se desestabiliza por el efecto de mutaciones somáticas, condiciones de pH, fuerza iónica o presencia de sustancias desnaturizantes como la urea, que favorecen el desplegamiento parcial de las misma. El resultado es la formación de un intermediario parcialmente desplegado en el que están favorecidas las interacciones intermoleculares que estabilizan la estructura polimérica de la fibrilla. Algunas de estas interacciones son de tipo electrostático, hidrofóbico y fundamentalmente por puentes de hidrógeno entre hebras β de moléculas diferentes.^{3,14-16}

La elucidación total del proceso de agregación implica la identificación de todos los estados conformacionales y estructuras oligoméricas adaptadas por la proteína en vía de agregación. La identificación y caracterización de estos intermediarios (Fig. 1), en especial, los oligómeros solubles, permite saber su importancia en la patogénesis de las amiloidosis y conocer mejor un posible blanco para su tratamiento.

Posterior a su biosíntesis en el ribosoma, una cadena polipeptídica se despliega. después se puede poblar en una distribución amplia de conformaciones, donde cada una tiene una estructura persistente pequeña o se pliega como una estructura compacta única. En este estado conformacional, la proteína puede permanecer como monómero o asociarse para formar oligómeros o agregados (Fig. 1). Tarde o temprano la mayoría de las proteínas serán degradadas bajo condiciones controladas y como parte de procesos bioquímicos normales, con sus aminoácidos siendo reciclados frecuentemente.

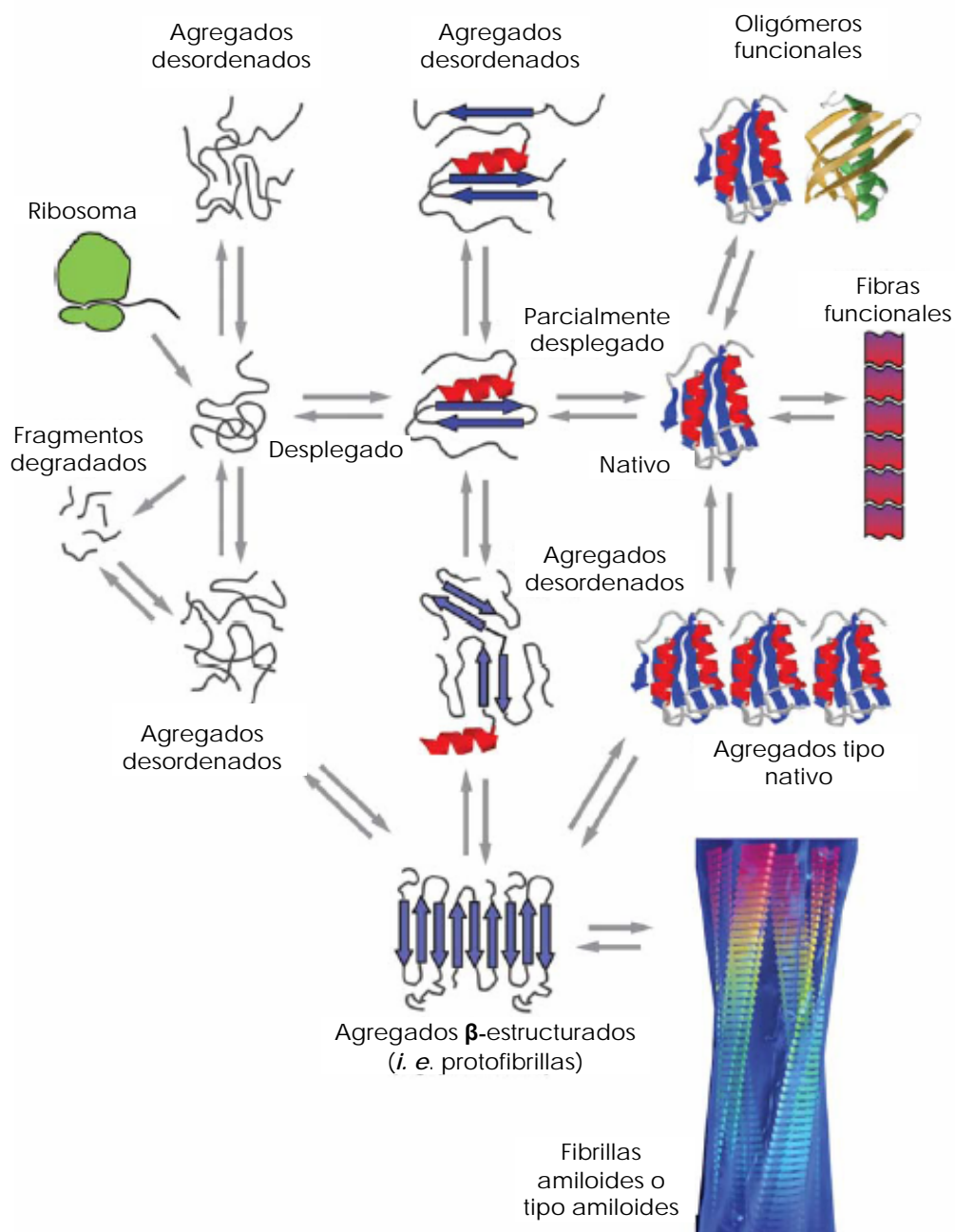


Fig. 1 Representación esquemática de algunos estados conformacionales, adoptados por las cadenas polipeptídicas y de las maneras en las que pueden interconvertirse. Chiti *et al.* 2006.

Motivos antiagregantes

Las fibrillas amiloides tienen una estructura que, como se mencionó anteriormente, es rica en hojas β , pero considerando que las proteínas ricas en este motivo son regularmente solubles, surge la interrogante sobre qué elementos estructurales habrían sido incorporados en las mismas durante la evolución, que evitarían la tendencia natural de las mismas a formar agregados potencialmente insolubles por interacciones β - β (entre las hebras bordes de sus hojas β).^{17,18}

Los bordes de hojas β (hebras β de los extremos de la hoja, ver figura 2) son regiones que pueden participar, mediante sus grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno libres, en interacciones con las hebras bordes de otra molécula, lo cual podría resultar en la formación de estructuras poliméricas insolubles. Sin embargo se ha demostrado que durante la evolución, las proteínas ricas en estructuras β han incorporado motivos antiagregantes, ya sea de estructura o de secuencia, cuyo fin no es mejorar la función biológica de cada proteína en particular, sino evitar la exposición de las hebras bordes. De ese modo se preserva la solubilidad de la molécula aún en las condiciones intracelulares caracterizadas por alta concentración de proteína. Los motivos más frecuentes son la estructura en barril β (por concepto no posee hebras borde), residuos de prolina en sitios claves de la hebra borde (desfavorecen las interacciones por puente de hidrógeno), residuos cargados situados en una hebra borde orientados hacia la hebra borde contra lateral en el contexto de un β sándwich, sectores estructurados en α hélices o en asa que cubren los bordes de una hoja β (imponen restricción estérica a las interacciones con la hebra borde), estructuras en "bulbo β " (*β bulges* en la literatura inglesa), los sectores peptídicos que cambian de hoja en los β sandwich (*sheet switches* en la literatura inglesa) y las hebras borde muy cortas. Las estructuras tipo bulbo β y/o prolinas desfavorecen interacciones β por constituir una protrusión local hacia fuera de la estructura proteica (en el caso de la prolina, la protrusión es el aminoácido *per se*) de forma que se bloquea el acceso por la cara convexa de la protrusión a la hebra borde.¹⁹

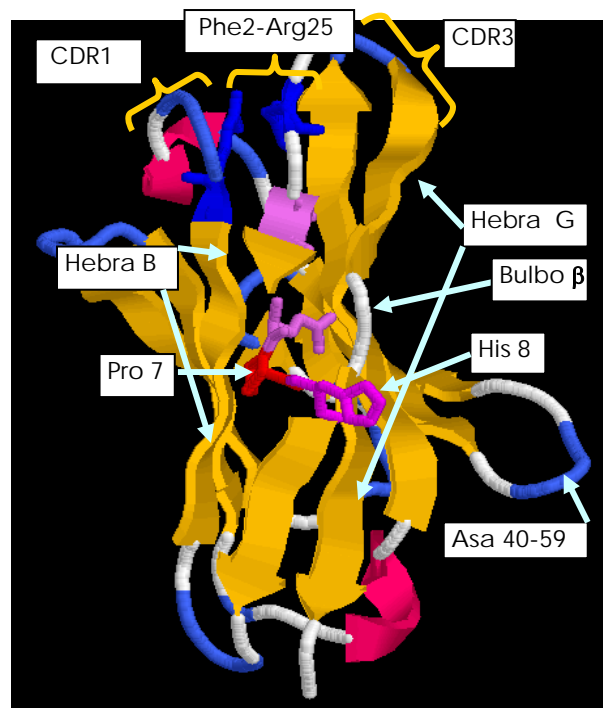


Fig. 2 Modelo cristalográfico del rV1 Jto (Número de identificación del PDB, 1CD0). Los residuos Pro7 e His8, que determinan el motivo "sheet switch" del amino terminal se señalan con flechas. Adicionalmente, se visualiza el asa 40-59 que funge como otro motivo antiagregante.

Todos los dominios de las inmunoglobulinas, incluyendo el dominio V_L , se caracterizan por un plegamiento de tipo β sándwich. Esta estructura posee cuatro hebras bordes, potencialmente disponibles para interacciones β - β . El análisis detallado de la estructura cristalográfica de varias cadenas ligeras λ y de la literatura relacionada con el tema de la fibrillogénesis de estas proteínas ha permitido identificar un conjunto de motivos estructurales que posiblemente inhiben la agregación amiloide del dominio variable. Uno de estos motivos es el extremo amino terminal, particularmente el segmento ubicado entre las posiciones 1 y 14, que en la estructura 3D se sitúa entre las hebras β B y G (hebras externas bordes de "sándwich"). En las cadenas ligeras λ_6 , el extremo amino terminal interactúa con ambas hebras bordes mediante enlaces por puente de H. Con la hebra B la interacción es entre los grupos carbonilo y amida de la cadena principal de Asn5 y Thr24, respectivamente, pero también se establece una interacción de tipo "planar" entre el anillo fenólico de la Phe2 y el grupo guanidinio de la Arg25. Ambos son residuos típicos en la secuencia λ_6 . Adicionalmente se establece un par de puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo de la cadena principal de Leu4 y el amida de la cadena principal de Gly100, situado en la hebra borde G. En la posición de la Pro7 la cadena principal cambia de dirección y se acerca a la hebra G, giro que es estabilizado por una red de interacciones por puente de hidrógeno entre Gln6, Pro7 y Thr102. A partir de la His8 y la Arg103 se establecen varias interacciones por puente de hidrógeno entre parejas de residuos de ambas hebras (amino terminal y hebra borde G), las que se extienden hasta Glu13 y Leu107. La His8 se sitúa en el centro del giro y su cadena lateral, relativamente voluminosa, se orienta hacia el solvente, sobresaliendo de la superficie de la molécula y probablemente representando un impedimento estérico para interacciones intermoleculares que impliquen al segmento amino terminal. Las cadenas laterales de Leu4, Gln6 y Val 11 se orientan hacia el espacio limitado entre ambas hojas del sándwich, penetrando hasta en núcleo apolar del dominio (que está formado además por el enlace disulfuro Cys23-Cys88 y el Trp35). Las interacciones que establecen estos residuos con el núcleo apolar probablemente estabilizan la conformación del segmento amino terminal y favorecen su función estructural. Es muy significativo que la interacción Phe2-Arg25 parece ser energéticamente muy importante para la estabilidad del dominio y para la función del extremo amino terminal como motivo antiagregación. La sustitución de la Phe2 por otros residuos, como Leu, Pro y Ser, acelera la cinética de agregación amiloide del dominio variable modelo 6aJL2 y disminuye su estabilidad termodinámica en modo dependiente del residuo sustituto. Estos resultados se muestran en la tabla 2 y la figura 3.

La estructura del segmento amino terminal descrito (motivo *sheet switch*, ver figura 2) es un arreglo muy útil para evitar la agregación, porque interrumpe efectivamente los dos bordes expuestos.¹⁹ En el caso del dominio 6aJL2, deja escasos grupos donadores y aceptores de puentes de H de las hebras bordes B y G disponibles para interacciones intermoleculares. Adicionalmente, otras interacciones de la hebra borde G con componentes de la interfase con el V_H en el contexto del anticuerpo ocupan una proporción importante de los grupos no implicados en interacciones con el

segmento amino terminal. El otro motivo anti-agregación identificado en este polo de la molécula está formado por la sucesión de tres residuos de Gly (99-101) en la hebra borde G, que forman un “bulbo β ”.

Tabla 2: Parámetros biofísicos del rVL 6aJL2 y algunas de sus mutantes calculados a partir de las curvas de desnaturalización reversible con GdnHCl. Se muestran los valores de energía libre de desplegamiento (ΔG_{unf}) como medida de la inestabilidad de la proteína 6aJL2 y sus mutantes; la pendiente (m) de la gráfica de desnaturalización, como medida de la dependencia de la ΔG_{unf} en la concentración desnaturalizante; la C_m (concentración de Gdn-HCl necesaria para lograr un desplegamiento en un 50% en una transición de dos estados), y la $\Delta\Delta G_{unf}$ que provee un índice para comparar la estabilidad entre 6aJL2 y sus mutantes. *Del pozo, L. Comunicación personal.*

rVL	ΔG_{unf} (kcal/mol)	$-m$ (kcal/mol)	C_m (M)	$\Delta\Delta G_{unf}^*$ (kcal/mol)
6aJL2	5.1	3.6	1.42	-
H8P	4.7	3.15	1.51	-0.32
F2L-H8P	5.5	5.1	1.07	1.26
F2S-H8P	2.0	1.94	1.05	1.33
WiL	2.2	2.3	0.83	2.12
JTO	4.6	3.5	1.22	0.72

* $\Delta\Delta G_{unf} = (m^{6aJL2} \times C_m^{mut}) - (m^{6aJL2} \times C_m^{6aJL2})$

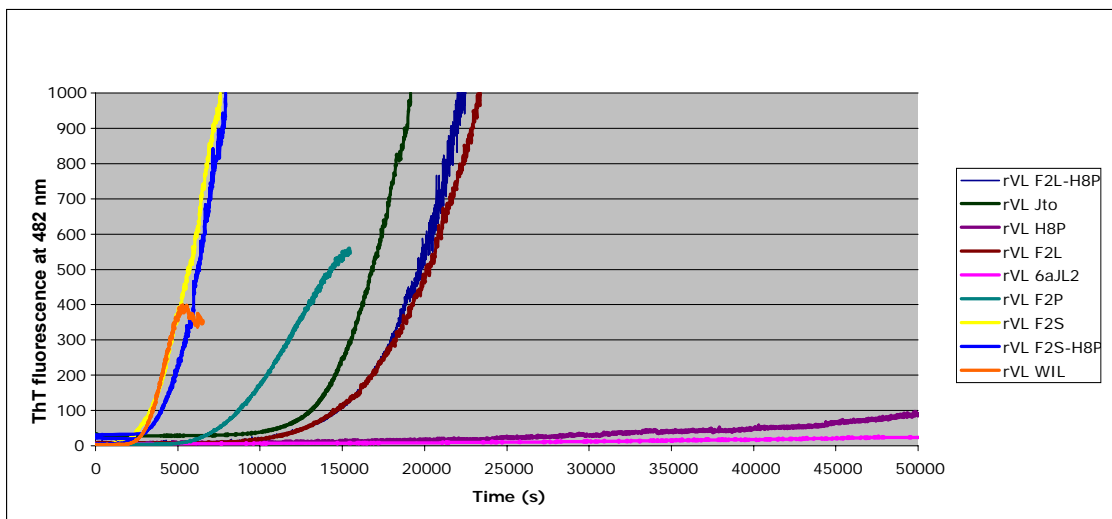


Fig. 3 Cinética de fibrillogénesis *in vitro* del rVL 6aJL2 y alguna de sus mutantes, comparadas con las proteínas Wil (clínicamente amiloidogénica) y Jto (clínicamente no amiloidogénicas). Los ensayos se realizaron a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (8.3 μM) de cada proteína en presencia de ThT 20 μM . Las muestras se incubaron a 37°C con agitación constante de 250 rpm. La fluorescencia de ThT se determinó a 482 nm, excitando a 450 nm. *Del pozo, L. Comunicación personal.*

El tercer motivo antiagregación que se ha identificado en el dominio variable de las cadenas ligeras $\lambda 6$ (y de las cadenas ligeras en general) es el sector comprendido entre los residuos Pro40 y Pro59, que incluye dos hebras cortas denominadas C' y C'' y que adopta un plegamiento en forma de asa, cubriendo gran parte de las hebras bordes C y D. Esta asa forma parte de la interfase V_H-V_L y se sitúa en el polo opuesto del dominio al del extremo amino terminal previamente analizado.

El análisis detallado de las estructuras cristalográficas de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, tanto en forma de dímero como en el contexto del anticuerpo, así como de la información publicada sobre otras proteínas amiloidogénicas con estructura similar a las inmunoglobulinas, sugiere que las interacciones V_H-V_L son parte de los factores que estabilizan al bulbo β de la Gly100 y a la conformación del asa 40-59. Ambas estructuras, a diferencia del amino terminal, se sitúan en sectores de la molécula que forman parte de la interfase V_H-V_L y su conformación podría variar significativamente (además de su función como motivo anti-agregación) si faltaran las interacciones con el V_H . En las estructuras cristalinas conocidas para las cadenas ligeras $\lambda 6$, el V_L se asocia en forma de dímero simulando la interacción V_H-V_L , pero en solución, aún a altas concentraciones estos dominios permanecen como monómeros. Soporte experimental adicional para esta hipótesis proviene de los resultados experimentales publicados por el grupo del Dr. A. Fink.^{20,21} Ellos encontraron que para dominios variables de inmunoglobulinas que tienen tendencia a asociarse en forma de dímero en solución, un paso necesario para el inicio de la agregación amiloide es la disociación del dímero.

Considerando el papel potencial de las interacciones V_H-V_L en la estabilización de los motivos antiagregación del V_L y el hallazgo reportado sobre el efecto de la interacción V_L-V_L en la reacción de agregación amiloide de estos dominios, se puede deducir que el desarrollo de un ligando que se una con alta afinidad al monómero V_L puede específicamente incrementar su estabilidad y reducir la amilogenicidad de la misma.²²

Agentes anti-amiloides

Se han diseñado numerosos tratamientos para bloquear pasos clave en el progreso de la amiloidosis, que van desde estrategias para inhibir la expresión de la proteína amiloidogénica, inhibir su agregación utilizando ligandos pequeños, o bien aliviando sus síntomas con tratamiento celular, génico o farmacológico.²³⁻³⁴ De esta forma, se han diseñado anticuerpos para el tratamiento de amiloidosis como el Alzheimer, enfermedad prion en mamíferos, enfermedad Creutzfeldt-Jakob, amiloidosis por variantes de lisozima y por cadenas ligeras, ya sea en formato scFv, V_HH o como anticuerpo completo. Particularmente en el caso de amiloidosis AL, el anticuerpo monoclonal 11-1F4 ha logrado promover la desaparición de depósitos amiloides, pero mediante un mecanismo donde además, se ve involucrada la participación de la respuesta inmune celular.³⁵⁻³⁶

Sin embargo, considerando que quizá la estrategia más efectiva para tratar estas enfermedades, es inhibiendo la agregación amiloide en sí, y teniendo el antecedente de que se han

podido seleccionar fragmentos de anticuerpos con este objetivo en otras amiloidosis, es que se fundamenta el propósito de seleccionar anticuerpos en formato de scFv para generar los ligandos de interés que puedan ser útiles como herramienta terapéutica en la amiloidosis AL.

Anticuerpos terapéuticos

En términos generales, los anticuerpos recombinantes se han utilizado ampliamente tanto para propósitos de investigación biológica como en estrategia terapéutica. Para ejercer dicho efecto terapéutico se han usado como inhibidores de enzimas, previniendo unión a ligandos; como anticuerpos agonistas, neutralizando proteínas; induciendo una respuesta inmune, entre otros; de forma que su uso se puede hacer extensivo, constituyendo en la actualidad, el 25% de las proteínas utilizadas en estudios clínicos.³⁷ Para el año de 2003, 12 anticuerpos monoclonales con fines terapéuticos ya habían sido aprobados por la FDA, y alrededor de 450 se encontraban en estudios clínicos (aproximadamente 70 progresando mas allá de la fase II). Además existen varias estrategias que han hecho posible la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos tales como quimerización y humanización (Tabla 3).³⁸⁻⁴⁰

Los anticuerpos son muy útiles, porque además de presentar gran especificidad y afinidad hacia su antígeno, pueden obtenerse en alto rendimiento, tienen baja tendencia a agregarse y pueden ser estables a altas concentraciones de desnaturalizantes, temperaturas altas y en presencia de proteasas. Deben de poseer estas características especialmente si se utilizan para terapia. Además es relevante que tengan un tiempo de vida media en el suero del paciente lo suficientemente largo, como para que se acumule en el tejido u órgano blanco, sea posible su funcionamiento, y puedan tener una biodistribución y depuración rápidas.^{22,41,42} Sin embargo, por el tamaño de los anticuerpos completos (155 KDa), se dificulta la facilidad con la que pueden cumplir con estos últimos requisitos, considerando que su difusión limita tanto el proceso de reconocimiento, como su orientación al tejido blanco. Aunque algunos anticuerpos han podido desarrollarse eficazmente y han sido aprobados por la FDA, se necesita tomar en consideración problemas de manufactura y expresión con los que se pueden enfrentar. Para reducir estos problemas se han diseñado fragmentos de anticuerpos de menor tamaño (Fig. 4), pero que siguen conservando el sitio mínimo (fragmento Fv) de reconocimiento del antígeno, tales como los Fab's (60 KDa) y los scFv's (30 KDa).⁴³⁻⁴⁶

Actualmente, la minimización del tamaño de las proteínas de unión al antígeno ha sido uno de los objetivos de la ingeniería de anticuerpos. Incluso, desde la década de los 80's, el grupo de Greg Winter, basados en el conocimiento de la existencia de anticuerpos unidominio naturales en el suero de camélidos y motivados por la posibilidad de encontrar fragmentos de anticuerpos más pequeños con propiedades biofísicas mejores, ha sometido a procesos de selección, dominios V_H de distintas especies. Si bien tiene un par de décadas el trabajo con estos fragmentos de anticuerpos, el

conocimiento de que los dominios V_H pueden retener una proporción significativa de la afinidad a su antígeno en ausencia de un dominio V_L, ya había sido concebido desde los 60's.^{44,47,48}

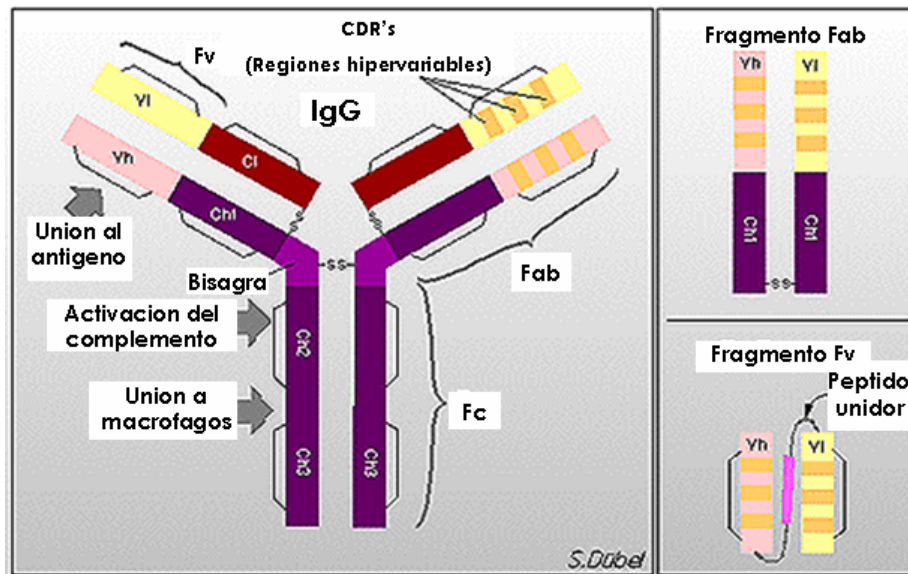


Fig. 4 La molécula del anticuerpo se basa en una estructura de cuatro cadenas polipeptídicas organizada en tres unidades funcionales (Fv, Fab y Fc). Dichas cadenas, dos de bajo peso molecular (ligeras) y dos de alto peso molecular (pesadas), son idénticas de dos a dos y se encuentran estabilizadas por enlaces disulfuro; se organizan en dominios con aproximadamente 110 aa de extensión cada uno. En cada Fv se encuentran los CDR, regiones, cuyos residuos de aminoácidos, se sabe que contribuyen mayoritariamente en la interacción con el antígeno. Modificado de *Dübel, S. Página electrónica personal.*

Tabla 3. Anticuerpos terapéuticos en el mercado. Presta *et al.* 2005

Trade Name	Proper Name	Antibody Format	Molecular Target	Disease Target	US FDA Approval
OKT3	Muromonab-CD3	Murine IgG _{2b}	CD3	Renal transplant rejection	1986
ReoPro	Abciximab	Chimeric F(ab)	Integrin αIIβ3	Cardiac ischemic complications	1994
Rituxan	Rituximab	Chimeric IgG ₁ /κ	CD20	Non-Hodgkin lymphoma	1997
Simulect	Basiliximab	Chimeric IgG ₁ /κ	IL-2Rα	Renal transplant rejection	1998
Remicade	Infliximab	Chimeric IgG ₁ /κ	TNF-α	Rheumatoid arthritis/Crohn disease	1998
Zenapax	Daclizumab	Humanized IgG ₁ /κ	CD25 (IL-2R)	Renal transplant rejection	1998
Herceptin	Trastuzumab	Humanized IgG ₁ /κ	HER-2	Breast cancer	1998
Synagis	Palivizumab	Humanized IgG ₁ /κ	RSV F-protein	Respiratory syncytial virus infection	1998
Mylotarg	Gemtuzumab Ozogamicin	Humanized IgG ₄ /κ with toxin conjugate	CD33	Acute myeloid leukemia	2000
Campath	Alemtuzumab	Humanized IgG ₁ /κ	CD52	Chronic lymphocytic leukemia	2001
Zevalin	Ibritumomab Tiuxetan	Murine-90Y IgG ₁ /κ	CD20	Non-Hodgkin Lymphoma	2002
Xolair	Omalizumab	Humanized IgG ₁ /κ	IgE	Asthma	2003
Raptiva	Efalizumab	Humanized IgG ₁ /κ	CD11a	Psoriasis	2003
Humira	Adalimumab	Human IgG ₁ /κ	TNF-α	Rheumatoid arthritis	2003
Bexxar	Tositumomab	Mouse-131I	CD20	Non-Hodgkin lymphoma	2003
Avastin	Bevacizumab	Humanized IgG ₁ /κ	VEGF	Colorectal cancer	2004
Erbix	Cetuximab	Chimeric IgG ₁ /κ	Epidermal growth factor receptor	Colorectal cancer	2004

VEGF, Vascular endothelial growth factor.

Despliegue en fagos

Tanto para la producción de anticuerpos monoclonales como la de sus fragmentos, se ha utilizado la técnica del hibridoma. Sin embargo, considerando el manejo más sencillo de otras células para expresión, el tiempo involucrado en la obtención de los genes de interés, la disponibilidad de la línea celular necesaria, entre otros aspectos, se ha recurrido al uso de despliegue en fagos. Su utilidad recae en la generación de moléculas contra antígenos específicos, ya sea *in vivo*, *in vitro*, *in situ* o *ex vivo*, a partir de bibliotecas inmunes, no inmunes o sintéticas. Es una técnica rápida, sencilla, económica y no requiere de equipo especial. Esta tecnología involucra la introducción de secuencias de péptidos o proteínas exógenas en el genoma de fagos como f1, fd y M13 (fig. 5), de manera que puede expresarse como proteínas de fusión con alguna proteína de cápside, mientras que el DNA que codifica para la fusión reside en el interior del virión. Esta unión física entre la proteína desplegada y el DNA que lo codifica permite el escrutinio de un gran número de proteínas.^{49,50}

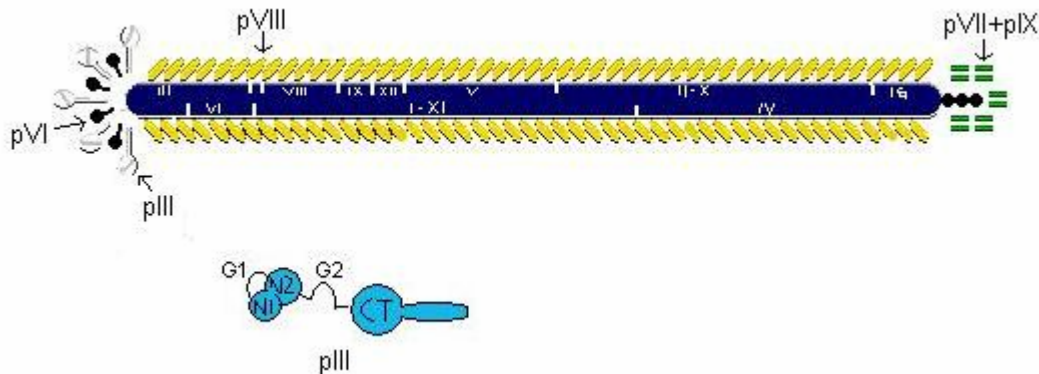


Fig. 5 Estructura del fago filamentoso M13. En la parte inferior se presentan los distintos dominios de la proteína III de la cápside (pIII) y sus regiones G1 y G2, ricas en glicina.

Es posible desplegar péptidos o proteínas como fusiones del gen III, VI o PVIII. Cuando se despliegan en pVIII, especialmente considerando la necesidad de obtención de bibliotecas con un gran número de anticuerpos, se producen partículas de fago con el péptido expuesto a lo largo de la superficie del fago, lo que las hace potencialmente inmunogénicas. Este despliegue se limita a péptidos de seis a ocho aminoácidos de largo, de manera que proteínas pVIII que contienen péptidos grandes o proteínas deben desplegarse en viriones híbridos (80% o más de las moléculas pVIII son tipo silvestre). De esta forma, cuando las bacterias que producen esta proteína de fusión pVIII-quimérica se infectan por fago silvestre, la proteína se une al conjunto de pVIII de tipo silvestre y se producen fagos que tienen un pVIII modificado con pVIII silvestre.⁴⁹

La pIII es la proteína más empleada para el despliegue; se pueden empacar moléculas quiméricas de la misma con insertos grandes, pero teóricamente sólo se pueden desplegar cinco

moléculas por fago. La inserción pone la proteína extraña en el extremo carboxilo terminal de la partícula empaquetada y produce menos impedimento estérico cuando pasa a través del poro de salida de pVI. Sin embargo, insertos grandes tienden a bajar la infectividad del fago, limitando la habilidad de seleccionar una proteína desplegada en particular. ⁴⁹

En su forma más simple, el proceso del despliegue en fagos se realiza en etapas denominadas rondas de tamizado (Fig. 6), donde un repertorio de variantes desplegadas en fagos, son incubados

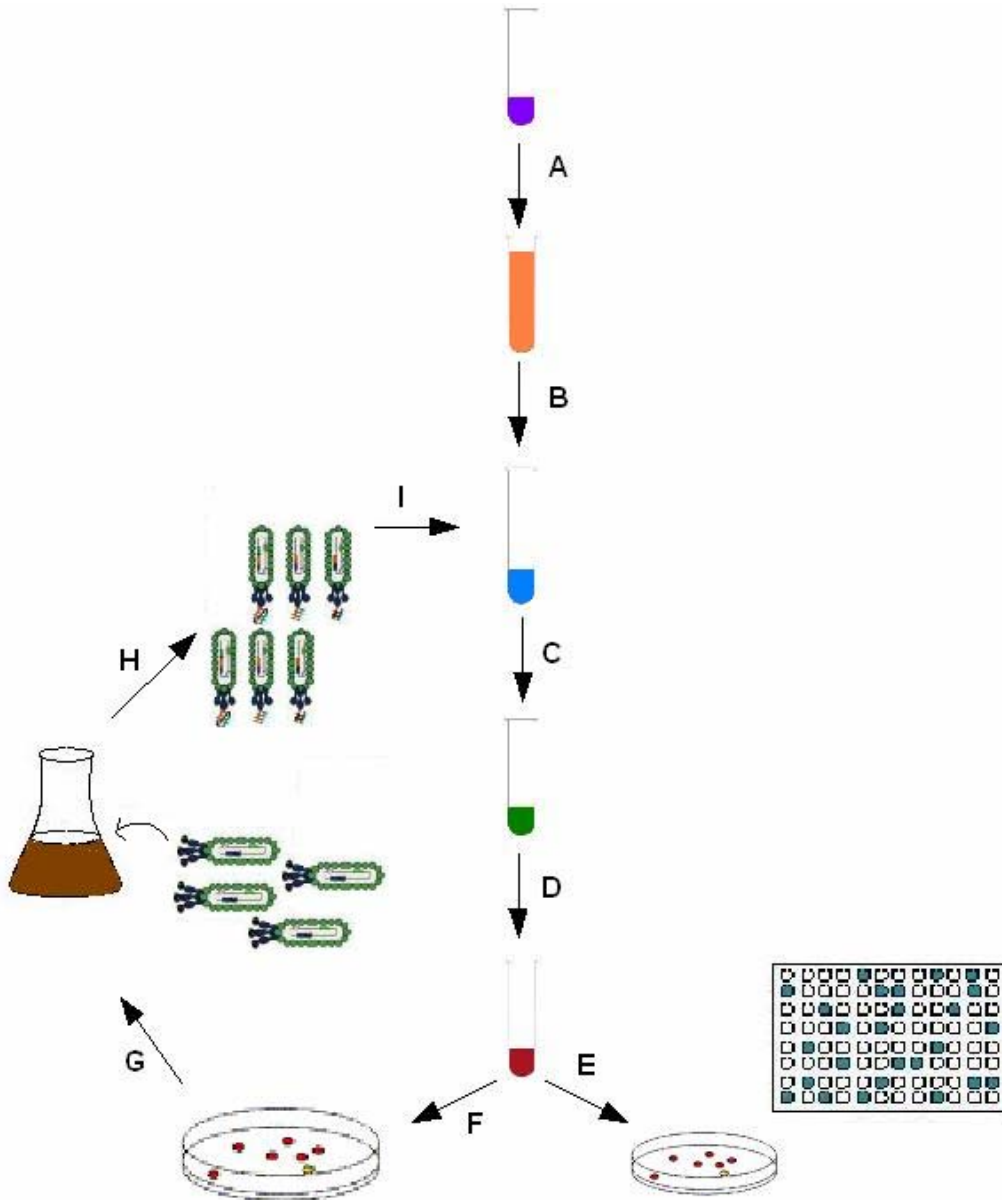


Fig. 6 Proceso de tamizado de fago-anticuerpos. A un inmunotubo previamente sensibilizado con el antígeno y bloqueado con alguna otra proteína para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo (A), se le agrega un repertorio de partículas víricas (B). Después de un determinado tiempo de incubación con los fago-anticuerpos, estos son eluidos con trietilamina (C) y finalmente utilizados para infectar células (D). De esta forma, se obtienen colonias bacterianas (E,F) que contienen el material genético que codifica para el(los) anticuerpo(s) resultante(s), y que pueden ser caracterizados. Por otro lado, el material celular cosechado de esa ronda (G) puede utilizarse para amplificar en un cultivo las clonas seleccionadas (H) y someterse a una nueva ronda de selección (I).

con un blanco de interés en solución o inmovilizado. Después se lavan y excluyen los fagos no unidos y se eluyen los que se unen específicamente, interrumpiendo las interacciones entre el fago y la molécula blanco. Los fagos eluidos se amplifican y el proceso es repetido, resultando en un enriquecimiento del "pool" de los virus elegidos.⁵¹⁻⁵⁴

III. HIPOTESIS

La agregación amiloide del V_L de una cadena ligera de la familia λ6 puede ser inhibida por la unión de un ligando derivado de un fragmento variable de cadena sencilla de anticuerpo (scFv) con reconocimiento específico a la V_L.

IV. OBJETIVOS

General

Obtener ligandos, basados en la estructura del scFv humano, potencialmente inhibidores de la fibrillogénesis in vitro del dominio variable recombinante λ6.

Específicos

1. Diseñar un sistema de selección de dominios humanos scFv a partir de librerías de fagos, basados en su afinidad de unión con dominios V_L λ6.
2. Caracterizar los scFv en términos de especificidad y estabilidad.
3. Determinar el efecto de la unión de los scFv en la fibrillogénesis in vitro del dominio variable recombinante 6aJL2 y sus mutantes, así como en el comportamiento de cadenas λ6 amiloidogénicas bien documentadas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

Equipos de reacciones

- QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)
- Rapid plasmid purification systems (Marligen biosciences Inc.)

Amortiguadores

- PBS (NaCl 1.37 M, KCl 30 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KH₂PO₄ 15mM, pH 7.4)
- IMAC (Imidazol 250 mM, azida de sodio 0.2% en PBS 1X)
- Transferencia (Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.035% v/v, metanol 20% v/v)
- PPB (Sacarosa 20% p/v, EDTA 1 mM en Tris HCl 20 mM pH 8.0)
- Carbonatos (Bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9.4)
- Fosfatos (Fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4)

Medios de cultivo

- YT2X líquido (triptona 0.16% p/v, extracto de levadura 0.1% p/v, NaCl 0.5% p/v, pH 7.0)
- YT2X sólido (triptona 0.1% p/v, extracto de levadura 0.05% p/v, NaCl 0.05% p/v, agar 0.15% p/v, pH 7.0)
- SB (triptona 0.32% p/v, extracto de levadura 0.2% p/v, NaCl 0.5% p/v)

Otros reactivos

- PEG/NaCl 5X (polietilenglicol 8000 al 20% p/v, NaCl al 15% p/v)
- Fago ayudador M13KO7 (New England Biolabs Inc.)
- Anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con HRP (GE Healthcare)
- Anticuerpo murino anti c-Myc (Zymed Laboratories Inc.)
- Anticuerpo de cabra anti-ratón IgG conjugado con HRP (Invitrogen)
- Sustrato de θ -fenilendiamina (θ -fenilendiamina al 4.8% p/v, peróxido de hidrógeno al 1.2% v/v en amortiguador de fosfato de sodio)
- Sustrato de diaminobenzidina (diaminobenzidina al 6.0% p/v, peróxido de hidrógeno al 1.2% v/v en amortiguador de fosfato de sodio)
- Ni-NTA (QIAGEN)
- Ampicilina (200 mg/mL)
- Tetraciclina (5 mg/mL)

- o Kanamicina (50 mg/mL)
- o Sfi I (New England Biolabs)
- o Not I (New England Biolabs)
- o Ligasa T4 (New England Biolabs)
- o Proteína monomérica y fibrilla de rV_L6aJL2
- o Proteína monomérica y fibrilla de rV_LR25G
- o Solución de azul de coomassie (azul de coomassie al 20% v/v, isopropanol al 25% v/v y ácido acético al 10% v/v en agua)
- o Solución A para desteñir (azul de coomassie al 8% v/v, isopropanol al 25% v/v y ácido acético al 10% v/v en agua)
- o Solución B para desteñir (azul de coomassie al 0.8% v/v, isopropanol al 10% v/v y ácido acético al 10% v/v en agua)

Cepas de Escherichia coli

Nombre	Genotipo
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10(Tet ^r)]
TG1	K12 supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsd SM) 5 (r _k m _k) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]
BL21(D3)pLys	BF- dcm ompT hsd S(r _B -m _B)gal λ(DE3) [pLysS Cam ^r]

5.2 METODOLOGÍA

En una primera etapa metodológica, una biblioteca de 1.1×10^8 variantes de scFv, previamente desarrollada en el laboratorio, se utilizó como fuente para la selección de los ligandos⁵³. Para ello fue necesario, amplificar las secuencias que codificaban para los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas (consultar anexo 1). Así, haciendo decenas de combinaciones se produjo un repertorio representativo de todas las familias de los dominios V_H y V_L. Se partió de RNAm de linfocitos provenientes de sangre periférica de un donador sano y posteriormente se amplificaron los genes e insertaron en el vector de clonación pSyn2 (anexo 2). Los plásmidos fueron utilizados después para transformar células de Escherichia coli cepa TG1, sin embargo, para facilitar la selección (por poseer resistencia a tetraciclina) se utilizó la cepa de E. coli XL1-Blue en las rondas. Se puso a crecer una alícuota de la biblioteca (en glicerol), y con el auxilio de fago silvestre (M13KO7) se recuperaron los fago-anticuerpos que se sometieron después a selección. Este paso de infección, con un subsecuente crecimiento toda la noche en presencia de kanamicina (puesto que el fago per se, es resistente a kanamicina) y la precipitación con polietilenglicol de los fagos producidos por las bacterias, se realizaron en cada una de las rondas de selección o tamizado (Fig. 6).

ETAPA I

SELECCIÓN

5.2.1 Despliegue en fagos filamentosos

Recuperación de fago-anticuerpos

- a. Se colocó en 4 tubos falcon, 15 mL de YT2X-Amp-Glu2% y se inoculó con 300 μ L de la biblioteca. Se creció hasta una D.O. de 0.7 a 1 unidades de absorbancia (a 600 nm) y se adicionó fago ayudador en una relación de 20 fagos por bacteria.
- b. Se dejó 30 min a 37°C sin agitación y se cambió a 37°C con agitación.
- c. Se centrifugó el cultivo a 4000 rpm 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en YT2X-amp-kan hasta un volumen final de 50 mL. Se pasó a un matraz de 250 mL y luego se agitó a 37°C 30 min.
- d. Se pasó a 30°C con agitación toda la noche y se dividió el cultivo en 2 tubos falcon (25 mL en cada uno).
- e. Se agregaron 5 mL de PEG/NaCl y se dejó reposar en hielo 15 min. Se homogenizó y se centrifugó 20 min a 4°C a 5500 rpm, tirando posteriormente el sobrenadante en cloro.
- f. Se recuperó el pellet de todos los falcon en 20 mL finales de PBS y se adicionaron 4 mL de PEG/NaCl.
- g. Se reposó en hielo 15 min y se centrifugó a 5500 rpm 20 min a 4°C.
- h. Se tiró el sobrenadante, se resuspendió en pellet en 2.5 mL de PBS 1X y se filtró en membranas de 0.45 μ m para almacenarse finalmente a 4°C.

Titulación de entrada

- a. Se crecieron células E. coli cepa XL1-Blue ON en 1 mL de YT2X-Tc a 37°C.
- b. Se inocularon 15 mL de YT2X con 100 μ L del ON y crecieron hasta 0.7-1 de D.O (a 600 nm).
- c. Se utilizaron fagos recuperados como se describió en el procedimiento anterior para hacer diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} en un mL de medio YT2X. De las últimas 4 diluciones se tomaron 10 μ L e infectaron 990 μ L de células.
- d. Se dejaron en reposo a 37°C durante 30 min sin agitación, luego otros 30 min a 37°C con agitación y se tomaron 100 μ L de la infección para sembrar en cajas YT2X-Km. Se cuantificaron las colonias al día siguiente de la siguiente forma:

$$\text{No. de fago anticuerpos/mL} = \text{No. de colonias/mL} * \text{factor de dilución}$$

Rondas de selección

Posterior a la amplificación de la biblioteca (recuperación de la diversidad de fago-anticuerpos), se realizó el despliegue en fagos para poder seleccionar aquellos scFv de alta afinidad de unión a 6aJL2. Las partículas víricas se recuperaron mediante la infección con el fago ayudador M13-K07, y la selección se basó en la utilización de inmunotubos, trietilamina y células para recuperar los fagos seleccionados. Así, con sucesivas rondas de selección y usando concentraciones decrecientes de ligando, se enriqueció la diversidad de scFv capaces de reconocer el VL 6aJL2.

Procedimiento:

- a. Se colocó 1 mL de proteína (6aJL2 monomérica soluble junto con su fibrilla en el mismo inmunotubo) a una concentración de 50 µg/mL de proteína total, 25 µg/mL y 12.5 µg/mL para las rondas 1, 2 y 3 respectivamente. Se dejó incubando ON, y en paralelo, se dejó crecer, XL1-Blue en YT2X-Tc (10 µg/mL) a 37°C para utilizarse en la ronda siguiente.
- b. Se retiró lo que no se adhirió al inmunotubo con pipeta y se lavó 3 veces con PBS 1X.
- c. Se saturó con leche al 2% en PBS 1X (4 mL) y se incubó 2 hr a 37°C (el tipo de solución saturante se cambió en cada ronda).
- d. Se lavó 3 veces con PBS 1X. Por otro lado se inocularon 20 mL de YT2X-Tc con 200 µL del ON de XL1-Blue y se dejó crecer en agitación a 37°C durante 3 hr.
- e. Se agregó al inmunotubo 1 mL de fago-anticuerpos del banco (1×10^{13}) y 3 mL de leche al 2%.
- f. Se puso a temperatura ambiente 30 min con agitación y 1.5 hr a temperatura ambiente sin agitación.
- g. Se descartó el sobrenadante en cloro al 2%, se lavó el tubo 20 veces con PBS-Tween 20 (0.1%) y otras 20 veces con solo PBS, invirtiendo rápidamente (por las paredes).
- h. Se adicionó 1 mL de trietilamina 100 mM y dejó incubando a temperatura ambiente durante 4, y 12 minutos en las rondas 1, 2 y 3 respectivamente.
- i. Se decantó y lavó el tubo posteriormente con PBS 1X, 3 veces.
- j. Se agregó 1 mL de células XL1-Blue crecidas a 0.7 unidades de D.O (paso d) a 600 nm.
- k. Se puso sin agitación 30 min a 37°C y otros 30 min a 37°C con agitación.
- l. Para la titulación de salida se sembró 1 µL en cajas YT2X- Amp-Tc-Glu1%, 100 µL de una dilución 1:1000 en YT2X y el resto en cajas grandes con YT2X-Amp-Tc-Glu1%. Se incubó a 37°C ON.
- m. Se cosecharon las células de las cajas grandes con 2.5 mL de YT2X-Amp-Tc-Glu1%, raspando suavemente con un asa y tomando con una pipeta de 1 mL el cultivo cosechado.
- n. Se realizaron gliceroleros de las células cosechadas utilizando 150 µL de glicerol al 100%, por 850 µL de células.
- o. Para la siguiente ronda de selección, se tomaron 10 µL de las células cosechadas y se adicionaron a 15 mL de YT2X- Amp-Tc-Glu1%, dejándolas crecer a 37°C hasta 0.7-1 de D.O (600nm). Posteriormente se infectaron con el fago ayudador y se procedió con el paso b, de "Recuperación de fago-anticuerpos" hasta rescatar estas partículas infectivas y continuar con

el tamizado. Este ciclo de recuperación de fago-anticuerpos y tamizados se hace por lo menos 3 veces.

5.2.2 Análisis de las clonas seleccionados

La elaboración de placas maestras fue necesaria para conservar colonias provenientes de la última ronda de selección. De esta forma se tuvo el material para expresar fago-anticuerpos o proteínas solubles, y ensayar su actividad contra 6aJL2.

Placas maestras

- a. Utilizando placas de fondo plano, se adicionaron 100 μL de YT2X-Amp-Tc-Glu1% a cada pozo de la placa.
- b. Se inocularon colonias individuales de la tercera ronda de tamizado y se incubaron ON a 37°C en agitación.
- c. Se colocaron 11 μL de glicerol al 100% por pozo de la placa maestra para conservar las colonias a -70°C.

Rescate de fagos de clonas individuales para su ensayo en ELISA

- a. Se agregaron 100 μL de YT2X-Amp-Tc-Glu1% en cada pozo, se inocularon con cada colonia (4 μL de los gliceroles de la placa maestra) y se incubaron hasta que la D.O. fue de 0.7 (600 nm) a 37°C en agitación.
- b. Después de 3 hr se agregaron 25 μL de 10^9 ufc/YT2X-Amp-Glu1% de fago ayudador y se incubó 30 min a 37°C sin agitación.
- c. La placa se agitó después 30 min a 37°C y se centrifugó 10 min a 3000 rpm para eliminar el sobrenadante.
- d. Las células se resuspendieron en 125 μL de YT2X-Amp-Kan y crecieron 20 hr con agitación a 37°C.
- e. Se centrifugó 10 min a 3000 rpm, y el sobrenadante conteniendo fago-anticuerpos, se utilizó para ser analizado por ELISA.

ELISA de fago anticuerpos

Para analizar la actividad de los fago anticuerpos que expresó cada clona (contenidos en los sobrenadantes), se colocaron las muestras y reactivos en el siguiente orden:

- a. Se agregaron 100 μL de antígeno a cada pozo (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína 6aJL2 soluble con su fibrilla en una placa) y se incubó toda la noche a 4°C.
- b. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1%.
- c. Se bloqueó con 200 μL de BSA al 0.5% en PBS y se incubó 2 hr a 37°C.

- d. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- e. Se agregaron 50 µL del sobrenadante de cada cultivo, 50 µL de PBS y se incubó 1 hr a 37°C.
- f. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- g. Se agregaron 100 µL del anticuerpo conjugado, anti M13 (1:2000 en PBS) y se incubó 1 hr a 37°C.
- h. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- i. Se adicionó 100 µL de sustrato (OPD) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad para esperar el desarrollo de una coloración amarilla.
- j. Se paró la reacción con 30 µL de HCl 6N y se midió del desarrollo de color en el lector de ELISA a 492 nm.

5.2.3 ELISA de especificidad con fago anticuerpos

Ensayando los sobrenadantes por duplicado, se observó la actividad de algunos de los fago-anticuerpos que mostraron actividad en el ELISA anterior. En este punto se analizó la existencia de una actividad cruzada (reconocimiento tanto a la proteína soluble como a la fibrilla), así como actividad contra otras proteínas tales como gelatina, BSA y caseína. De esta forma, se colocaron las muestras y reactivos en el siguiente orden:

- a. Se agregaron 100 µL de la proteína 6aJL2 o fibrilla 5 µg/mL en buffer de carbonatos (dos pozos por cada anticuerpo, para cada forma proteica) y se incubó toda la noche a 4°C.
- b. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1%.
- c. Se bloquearon los pozos anteriores con 200 µL de BSA/PBS al 0.5% y se agregaron a los otros pozos BSA, gelatina o caseína al 0.5% en PBS) para posteriormente incubarlo 2 hr a 37°C.
- d. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- e. Se agregaron 50 µL del sobrenadante de cada cultivo, 50 µL de PBS, e incubó 1 hr a 37°C.
- f. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- g. Se agregaron 100 µL del anticuerpo conjugado, anti M13 (1:2000 en PBS) y se incubó 1 hr a 37°C.
- h. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- i. Se adicionó 100 µL de sustrato (OPD) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad para esperar el desarrollo de una coloración amarilla.
- j. Se paró la reacción con 30 µL de HCl 6N y se midió del desarrollo de color en el lector de ELISA a 492 nm.

ETAPA II

EXPRESIÓN

Después de seleccionar algunas clonas de interés por ELISA, en esta segunda etapa se indujo la expresión de aquellas elegidas en pequeña escala. Después se procedió a su subclonación en el vector pSyn1 (anexo 2) y se electroporaron en *E. coli* TG1, para caracterizarse sin estar fusionado el anticuerpo al fago, sino como proteína soluble.

5.2.4 Análisis de expresión de las clonas seleccionadas

Preparación de la muestra

- a. Se indujo un cultivo de 5 mL ON con cada clona a expresar (aún en el vector de clonación), y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min.
- b. Al pellet se le adicionaron 125 μ L de PPB y se resuspendió quitando los grumos. Posteriormente se colocó en hielo durante 10 min y se centrifugó de nuevo 1 min a 14 000 rpm.
- c. El sobrenadante se separó y al pellet se le agregaron 125 μ L de $MgSO_4$ 5 mM, el pellet se resuspendió quitando grumos, se incubó en hielo 10 min y se centrifugó 1 min a 14 000 rpm.
- d. Se juntó el sobrenadante de PPB y $MgSO_4$, y se cuantificó la proteína total contenida en el extracto proteínico a 280 nm con luz UV (Una unidad de absorbancia equivale a 1 mg/mL de proteína).

Ensayo de aplicación en gota

- a. Se agregó el volumen de extracto necesario para colocar 500 μ g de proteína total en las membranas de nitrocelulosa obtenido de cada clona en análisis.
- b. Se colocó la membrana 30 min en BSA al 2% en PBS a temperatura ambiente y se decantó.
- c. Se colocó el anticuerpo (anti-Cmyc) diluido 1:2000 en BSA al 2% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente.
- d. Se lavó 5 veces con PBS 1X.
- e. Se agregó el anticuerpo de cabra anti-ratón diluido 1:2000 en PBS y se incubó 30 min a temperatura ambiente (en oscuridad).
- f. Se lavó 5 veces con PBS 1X y dos veces con fosfato de sodio 50 mM pH 7.4.
- g. Finalmente se reveló utilizando como sustrato diaminobenzidina.
- h. Se incubó protegiendo de la luz, el tiempo necesario para la aparición de manchas cafés y se paró la reacción retirando el sustrato y lavando 5 veces con fosfato de sodio y agua.

5.2.5 Subclonación en el vector de expresión

Se subclonaron (transfirieron de un plásmido a otro) las secuencias con mejor capacidad de expresión en E. Coli TG1, haciendo uso del vector de expresión pSyn1, el cual contiene los sitios de restricción Sfi I y Not I, y el péptido señal pelB para dirigir la exportación al periplasma del anticuerpo. Finalmente se extrajeron del periplasma bacteriano, por shock osmótico, las proteínas para proceder con la purificación.

Obtención de células electrocompetentes (cepa que se utilizará para expresar)

- a. Se puso un ON de una asada de una colonia de células de TG1 (o en su defecto, 20 μ L de un glicerol de la cepa) con 4 mL de medio SB y simultáneamente se dejó otro tubo ON con 4 mL de SB para utilizarlo como control negativo.
- b. Se tomaron dos matraces Erlenmeyer de un litro y se colocaron en cada uno 1.3 mL del ON, 250 mL de SB, 5 mL de glucosa al 20 por ciento esterilizada por filtración y 2.5 mL de $MgCl_2$ 1 M, estéril.
- c. Se agitó a 250 rpm, 37°C hasta llegar a 0.7 de D.O. a 600 nm.
- d. Se enfrió en hielo por 15 min los matraces y se pasó su contenido en tubos para centrifuga previamente enfriados.
- e. Se centrifugó a 4°C, 4000 rpm por 20 min y se descartó el sobrenadante.
- f. Se resuspendió cada paquete con 25 mL de glicerol al 10 por ciento frío.
- g. Se agregó glicerol hasta 50 mL y se centrifugó a 4°C, 4000 rpm por 20 min.
- h. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 50 mL de glicerol frío al 10 por ciento.
- i. Se centrifugó a 4°C, 4000 rpm por 20 min.
- j. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete en 25 mL de glicerol frío (10 por ciento). Se centrifugó a 4°C, 3 500 rpm por 15 min.
- k. Se descartó el sobrenadante hasta verse que el paquete celular comenzaba a deslizarse hacia fuera.
- l. Con una pipeta fría de cinco mL se resuspendió el paquete con el volumen restante del sobrenadante (1-2 mL).
- m. Con una punta de 1 mL cortada, se prepararon alícuotas de 300 μ L en tubos eppendorf previamente enfriados, y se almacenaron las células a -70°C hasta su utilización posterior.

Extracción de plásmido que contiene los genes de cadenas sencilla (Rapid plasmid purification systems, Marligen Biosciences Inc.)

- a. Se colocó un ON utilizando medio YT2X/amp 100 μ g/mL.
- b. Se obtuvo el pellet del cultivo anterior (Se consideraron de 1 a 5 mL de células crecidas ON para las proporciones de reactivos que se utilizaron en los pasos siguientes), y se descartó el medio de cultivo.

- c. Se agregaron 250 μL del buffer de suspensión celular G1, conteniendo RNasa A, al pellet y se resuspendieron las células hasta que quedo una sustancia homogénea.
- d. Se adicionaron 250 μL de la solución de lisis celular G2 y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 5 veces.
- e. Se agregaron 350 μL del buffer de neutralización M3, y se mezcló inmediatamente por inversión 5 veces. Se centrifugó la mezcla a 12000 x g durante 10 min.
- f. Se colocó el filtro en el tubo de lavado de 2 mL. Se cargó el sobrenadante del paso anterior al filtro y se centrifugó a 12000 x g 1 min. Se descartó el líquido recuperado en el tubo de 2 mL.
- g. Para un lavado opcional, se colocó de nuevo el filtro en el tubo de 2 mL y se agregaron 500 μL del buffer de lavado opcional GX al filtro. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min, y se centrifugó a 12000 x g 1 min. Se descartó el líquido recuperado en el tubo de 2 mL.
- h. Se colocó el filtro dentro del tubo de nuevo y se agregaron 700 μL del buffer de lavado G4 que contiene etanol. Se centrifugó a 12000 x g por 1 min y se descartó el líquido recuperado en el tubo de 2 mL. Se centrifugó de nuevo 1 min a 12000 x g para eliminar el buffer residual.
- i. Se colocó el filtro a un tubo de 1.5 mL nuevo y se adicionaron 75 μL del buffer TE proporcionado, calentado brevemente, en el centro del filtro. Se incubó a temperatura ambiente 1 min y se centrifugó a 12000 x g durante 2 min.

5.2.6 Digestión y ligación

Se realizaron las correspondientes digestiones del vector de expresión y scFv, con los reactivos mencionados en la tabla 4. La digestión con Not I se llevó a cabo a 37°C y a 50°C la de Sfi I, cada una de ellas, con una duración de 5 horas aproximadamente. Los productos doblemente digeridos, se purificaron posteriormente utilizando un gel de agarosa, para poder ser finalmente ligados.

Tabla 4. Reacciones de digestión del Vector y genes scFv.

Digestión con Not I		Digestión con Sfi I	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
DNA	X μg	DNA	X μg
Buffer 3	10 μL	Buffer 2	10 μL
BSA 100X	1 μL	BSA 100X	1 μL
Not I 10 U/ μL	1 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ DNA	Sfi I 20 U/ μL	1 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ DNA
Agua cbp...	150 μL	Agua cbp...	100 μL

Extracción y purificación de DNA de 70 pb a 10 Kb de geles de agarosa en buffer TAE o TBE. (QIAquick PCR Purification kit)

- a. Se cortó el fragmento de gel que contenía el DNA de interés.
- b. Se pesó el fragmento de gel y agregaron 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel (100mg~100 μ L). La cantidad máxima de gel por columna QIAquick es 400 mg.
- c. Se incubó a 50°C hasta que el gel estuviera totalmente disuelto.
- d. Ya disuelto, se observó que el color de la mezcla fuera amarilla. Si el color era naranja o violeta, se agregaron 10 μ L de acetato de sodio 3M, pH 5 y se mezclaron para volver a tener coloración amarilla. La absorción del DNA a la membrana es eficiente solo a pH \leq 7.5
- e. Se añadió 1 volumen de isopropanol a la muestra y se mezcló. Este paso incrementa el rendimiento en fragmentos de >500 pb y <4 Kb. No se centrifugó la muestra en este punto.
- f. Se colocó la columna en el tubo colector provisto.
- g. Se pasó la muestra a la columna en volúmenes de 700 μ L, y se centrifugó por 1 min a baja velocidad y posteriormente 1 min a mayor velocidad (se repitió por cada volumen adicionado).
- h. Se descartó el sobrenadante y se regresó la columna al tubo colector.
- i. Se agregó (Opcional) 0.5 mL de buffer QG a la columna y se centrifugó 1 min (para remover las trazas de agarosa). Esto es necesario cuando el DNA se utiliza para secuenciación directa, transcripción in vitro o microinyección.
- j. Para lavar, se agregó 0.75 mL de buffer PE a la columna y se centrifugó 1 min a 6000 rpm y 1 min a 14000 (si el DNA se utiliza para aplicaciones sensibles, es necesario esperar de 2 a 5 min antes de centrifugar).
- k. Se eliminó el sobrenadante y se centrifugó la columna nuevamente 1 min.
- l. Se pasó la columna a un tubo limpio de 1.5 mL.
- m. Para eluir el DNA, se agregaron 50 μ L de buffer EB (ligeramente calentado) en el centro de la membrana. Se centrifugó 1 min a baja velocidad y 1 min a máxima velocidad.

Los reactivos utilizados para la ligación, que fue llevada a cabo ON a 16°C, se mencionan en la tabla 5.

Tabla 5. Ligación de pSyn1 y scFv. La cantidad de vector e inserto son equivalentes, considerando su relación molar.

Reactivo	Cantidad
Inserto	15 ng de DNA
Vector	15 ng de DNA
Buffer	2 μ L
Ligasa	1 μ L
Agua	cbp 20 μ L

De los productos de ligación, se utilizaron 5 μ L para transformar células de Escherichia coli cepa TG1 electrocompetentes (50 μ L) y platearon cajas con células recuperadas (100, 10 y 1 μ L) puestas a crecer 1 hr en medio de cultivo a 37°C, 250rpm.

Transformación por electroporación

- a. Se mezclaron 50 μ L de células electrocompetentes con 5 μ L de DNA ligado y se introdujeron a una cubeta de electroporación.
- b. Se incubó en hielo por 1 min y se secó el exterior de la cubeta.
- c. Se electroporó a 2.5 KV, 25 μ F y 200 Ω , por cuatro mseg aproximadamente.
- d. Se lavó la cubeta inmediatamente con 1 mL de SOC y se incubó el medio con las células 1 hr a 250 rpm, 37°C.
- e. Se platearon 1 y 10 μ L, se dejó crecer ON para recuperar los genes subclonados.

5.2.7 Expresión y purificación del anticuerpo

Expresión en pSyn1/E. coli

- a. Una colonia se inoculó en medio YT2X-Amp-Glucosa 2% y se incubó a 37°C a 250 rpm ON.
- b. Se agregaron células del ON a un matraz conteniendo YT2x-Amp-Glucosa 0.1% (se inoculó 1/100 del volumen utilizado para crecer las células) y se incubó a 37°C a 250 rpm hasta una D.O. de 0.7 a 600 nm.
- c. Se indujo la expresión con IPTG 1 mM y se incubó durante 6 hr adicionales en agitación a 25°C.
- d. Se colectaron las células por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm.

Extracción del fragmento de anticuerpo

- a. Se resuspendió todo el paquete celular en buffer PPB (1/40 del volumen de cultivo) y se incubó en hielo por 20 minutos.
- b. Se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a tubos falcon.
- c. Se resuspendió el pellet en MgSO₄ (1/40 del volumen de cultivo) 5 mM y se incubó en hielo por 20 min.
- d. Se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min y se transfirió el sobrenadante a tubos falcon.
- e. Se recentrifugaron ambas extracciones a 15000 rpm durante 15 min y se juntó el sobrenadante para ser dializado.

Diálisis

- a. Se lavaron las membranas para diálisis con agua tetradestilada y PBS.
- b. Se cargó el sobrenadante de las extracciones en las membranas de diálisis, y se dializó por 4 hr a 4°C contra 3 L de PBS 1x.

- c. Se cambió el PBS 1x por fresco y se dejó dializando toda la noche a 4°C.

Cromatografía de afinidad IMAC para anticuerpos con cola de His

- a. Se empacó una columna utilizando 1 mL de resina Ni-NTA
- b. Se equilibró la columna utilizando 5 mL de buffer de carga (20 mM de imidazol en PBS 1x).
- c. Se cargó la muestra dializada dentro de la columna.
- d. Se lavó con 5 mL de buffer de lavado (35 mM de imidazol en PBS 1x).
- e. El anticuerpo se eluyó con 500 μ L de buffer IMAC.
- f. Se cuantificó la proteína filtrada, por espectrofotometría a 280 nm.

ETAPA III CARACTERIZACIÓN

El objetivo de esta etapa fue detectar la presencia del fragmento de anticuerpo en el extracto proteínico bacteriano, confirmar su pureza y determinar características del mismo como son: capacidad inhibitoria de fibrillas formadas por cadenas ligeras $\lambda 6$, estabilidad funcional y capacidad de reconocimiento de los mismos epítopes de 6aJL2, que reconoce el anticuerpo murino monoclonal 55-5-F5.

5.2.8 Detección

SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS es un método de bajo costo, fácil, reproducible y rápido para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Esta técnica fue utilizada para observar tanto extractos totales como fracciones puras del anticuerpo obtenido. Los siguientes pasos se siguieron para correr la electroforesis (preparado según los reactivos mencionados en la tabla 6) durante 6 hr:

- a. Se ensambló el sándwich de gel con los correspondientes platos, espaciadores y peine, sellándolo del fondo para evitar derrames.
- b. Se introdujo 5 mL del gel concentrador, 5 del espaciador y aproximadamente 10 mL del gel separador entre los platos, se colocó el peine y dejó polimerizar el tiempo necesario.
- c. Se cargaron las muestras en el gel y se dejó correr 6 hr a 50 Ω .

Tabla 6. Reactivos utilizados en el SDS-PAGE.

	Gel concentrador	Gel espaciador	Gel separador
Solución 49.5% T, 3% C (Mezcla acrilam-biscrilam.)	8.4 mL	1.02 mL	3.34 mL
Buffer gel	1.24 mL	1.67 mL	3.34 mL
Glicerol	-	-	1.06 mL
Agua	-	2.31 mL	2.26 mL

Tinción con Azul de Coomassie

Este es un método sencillo, rápido y puede detectar desde 0.1 µg de proteína:

- Se transfirió el gel a un contenedor pequeño con aprox. 20 mL de una solución de azul de coomassie y agitó lentamente durante 5-10 min.
- Se decantó la solución y agregó un volumen similar de solución A, para desteñir el gel, agitando lentamente durante 15 min.
- Se decantó la solución A y se reemplazó por la solución B para desteñir.
- Se agitó lentamente durante algunos minutos y reemplazó la solución por nueva, para finalmente dejar desteñiendo toda la noche.

Western Blot (transferencia semiseca)

- Se corrió un gel de poliacrilamida con las muestras a analizar.
- Se preparó la membrana de nitrocelulosa (del tamaño del gel) sumergiéndola en buffer de transferencia durante 30-40 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 más capas de papel filtro.
- Se utilizó un tubo de ensayo para eliminar el buffer de transferencia residual y burbujas en el sándwich, se cerró el cassette y se agregó buffer a la cámara para posteriormente transferirlo durante 1 hr a 51 Ω.

Inmunodetección

- La membrana de nitrocelulosa se despegó del cassette de transferencia y se bloqueó con BSA al 2% en PBS durante una hora en agitación a temperatura ambiente.
- Se decantó la BSA y se lavó 5 veces con PBS-Tween 20.
- Se agregó anticuerpo anti C-myc 1:2000 y se incubó a temperatura ambiente 1 hr en agitación.

- d. Se decantó el primer anticuerpo y se lavó 5 veces con PBS-Tween 20.
- e. Se agregó anticuerpo de cabra anti-ratón 1:2000 y se incubó a temperatura ambiente 1 hr en agitación.
- f. Se decantó el segundo anticuerpo y se lavó 5 veces con PBS-Tween 20.
- g. Se reveló la membrana utilizando diaminobenzidina, parando la reacción finalmente con agua.

5.2.9 Ensayos de inhibición de extensión de fibrillas.

El objeto del experimento de extensión homóloga de semillas 6aJL2 y R25G en presencia del scFv 7D y del anticuerpo monoclonal anti- λ 6 55-5-F5, es determinar si el scFv 7D inhibe la elongación de las semillas, utilizando como control positivo el anticuerpo 55-5-F5.

Diseño general del experimento

Se prepararon alícuotas (50 μ L) de una dilución de 25 μ g/mL en PBS de cada proteína en análisis (cadena ligera recombinante 6aJL2 o R25G), a las que se le adicionaron la cantidad de semilla homóloga suficiente para alcanzar la proporción p/p de 10%. El volumen de cada muestra fue de 50 μ L, contenida en tubo de plástico para PCR. Las muestras se incubaron 12 horas a 37°C en un termociclador, en presencia o ausencia del anticuerpo 7D, y por otro lado, en presencia del control positivo (anticuerpo monoclonal 55-5-F5). Se determinó la cantidad de fibrilla amiloide de 6aJL2 o R25G formada, mediante la medición de la fluorescencia de ThT a cada muestra al final del experimento.

Preparación de la muestras de trabajo

Se calculó la concentración de la solución stock de los rVL 6aJL2 y R25G. Para ello se preparó dilución 1:10 de la proteína en 7.0 M de Gdn-HCl en amortiguador fosfato 20 mM pH 7.5. Se determinó el valor de su A_{280} a esta dilución y la concentración de proteína se calculó mediante el ϵ^{280} de los rVL. Para el cálculo de la concentración se usó el coeficiente de extinción molar de la proteína, obtenido mediante la herramienta ProtParam de la página web ExPassy.

- R25G : Solución de 1mg/mL según ExPassy $A_{280nm}=1.229$.
- 6aJL2 : Solución de 1mg/mL según ExPassy $A_{280nm}=1.219$.

Obtención de las fibrillas amiloide

Se obtuvieron agregados de esta proteína mediante agitación en incubadora con agitador orbital y mediante agitación con una micro-barra magnética.

- Fibrillas por agitación en agitador orbital: Se incubaron 4 muestras de 1.5 mL de solución con 1 mg/mL de cada proteína en fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 más NaCl 150 mM, a 37°C con

agitación constante de 250 rpm en una incubadora orbital. Se usaron cubetas de plástico para fluorescencia de 4.5 mL. La incubación se extendió por 96 horas.

- Cosecha de los agregados: Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf plásticos de 1.5 mL y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante, el cual se guardó a 4°C para cuantificar posteriormente la concentración de proteína. Los agregados sedimentados se resuspendieron en 1 mL de amortiguador PBS y nuevamente se centrifugaron. Se desechó el sobrenadante y el sedimento en cada caso se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador PBS con azida de sodio. Se determinó la concentración de proteína de cada suspensión de fibrilla a partir del valor de A_{280} de una dilución 1/10 en solución de GdnHCl 7 M en fosfato 20 mM pH 7.5 (Concentración final de GdnHCl de 6.3 M). Para el cálculo de concentración se usó el ϵ^{280} de cada proteína soluble.

Preparación de las suspensiones de semillas:

Se preparó una dilución de 0.5 mg/mL de suspensión de fibrillas R25G y 6aJL2 en PBS en 1 mL de volumen final.

Fibra	R25G-Shaker	6aJL2-Shaker
Muestra	1	1
mg/mL	1.46	1.38
Vol. (μ L)	340	365
PBS (μ L)	660	635
Vol. Final (μ L)	1000	1000

Las fibrillas fueron fragmentadas por sonicación usando el siguiente protocolo:

- Cuatro pulsos de 10 segundos de duración con intervalos de 20-30 segundos, manteniendo las muestras en hielo. Se usó un sonicador a potencia 4 (output) y modo de pulso constante. Se utilizó una punta de 2 mm.

Preparación de las muestras a evaluar

Se prepararon 2 mL de mezclas compuestas por el monómero soluble 100 μ g/mL más semilla homóloga 10 μ g/mL. La mezcla de reacción se mantuvo en hielo hasta su posterior uso. Después se prepararon muestras de 160 μ L compuestas por los siguientes reactivos (dos tubos distintos para cada proteína a inhibir, R25G o 6aJL2):

Nombre de cada muestra	Mezcla de reacción mono:semilla 10:1 (µL)	scFv 7D 300 µg/mL (µL)	PBS 1x (µL)	Relación molar monómero:Ab
R25G7D-1 ^α ó 6AJ7D-1 ^α	40 (equivalente a 4 µg: 0.4 µg)	54 (equivalente a 16 µg)	66	1:2
R25G7D-2 ^α ó 6AJ7D-2 ^α	40 (4 µg: 0.4 µg)	27 (8 µg)	93	1:1
R25G7D-3 ^α ó 6AJ7D-3 ^α	40 (4 µg: 0.4 µg)	13.5 (4 µg)	107	2:1
R25G7D-4 ^α ó 6AJ7D-4 ^α	40 (4 µg: 0.4 µg)	7 (2 µg)	113	4:1
R25G7D-5 ^α ó 6AJ7D-5 ^α	40 (4 µg: 0.4 µg)	3.5 (1 µg)	117	8:1
R25G7D-6 ^α ó 6AJ7D-6 ^α	40 (4 µg: 0.4 µg)	-	120	-

Controles Positivos	Mezcla de reacción mono:semilla 10:1 (µL)	MAB 55-5-F5 1mg/mL (µL)	PBS 1x (µL)	Relación molar Monómero:Ab
R25G-55.5.F5 ^β	40 (equivalente a 4 µg: 0.4 µg)	16 (16 µg)	104	16:1
6a-55.5.F5 ^β	40 (4 µg: 0.4 µg)	16 (16 µg)	104	16:1

Controles Negativos	Mezcla de reacción mono:semilla 10:1 (µL)	scFv G4 o C1, 300 µg/mL (µL)	PBS 1x (µL)	Relación molar Monómero:Ab
R25G-4G ^ζ	40 (equivalente a 4 µg: 0.4 µg)	13.5 (4 µg)	107	2:1
R25G-4G ^ζ	40 (4 µg: 0.4 µg)	7 (2 µg)	113	4:1
6a-4G ^ζ	40 (4 µg: 0.4 µg)	13.5 (4 µg)	107	2:1
6a-4G ^ζ	40 (4 µg: 0.4 µg)	7 (2 µg)	113	4:1
R25G-1C ^δ	40 (4 µg: 0.4 µg)	13.5 (4 µg)	107	2:1
R25G-1C ^δ	40 (4 µg: 0.4 µg)	7 (2 µg)	113	4:1
6a-1C ^δ	40 (4 µg: 0.4 µg)	13.5 (4 µg)	107	2:1
6a-1C ^δ	40 (4 µg: 0.4 µg)	7 (2 µg)	113	4:1

^α Muestras con el anticuerpo en estudio (scFv 7D).

^β Muestras con un anticuerpo anti-λ6 (monoclonal murino 55-5-F5).

^ζ Muestras con un anticuerpo anti-toxina (scFv 4G).

^δ Muestras con un anticuerpo anti-toxina (scFv 1C).

Blancos	monómero (μL)	Semilla (μL)	PBS 1x (μL)
Semilla R25G sin monómero (C1)	-	1.0 (1.46 μg)	159
Semilla 6aJL2 sin monómero (C2)	-	1.0 (1.38 μg)	159
monómero R25G sin semilla (C3)	1.5 (0.15 μg)	-	158.5
monómero 6aJL2 sin semilla (C4)	1.5 (0.15 μg)	-	158.5

Se transfirieron alícuotas de 50 μL a tubos de PCR. Las muestras se incubaron a 37°C en un termociclador. Luego de 13 horas de incubación se mezclaron los 50 μL cada muestra con 350 μL de solución de ThT 20 μM en PBS y se registraron espectros de emisión de fluorescencia ajustando el fluorímetro de la siguiente manera:

Excitación: 450 nm

Slit Exc.: 3.5 nm

Emisión: 460 nm-510 nm

Slit Em: 7.0 nm

Velocidad de registro: 300 nm/min

Repeticiones: 2

5.2.10 Ensayos de estabilidad

Se determinó la estabilidad del anticuerpo, analizando mediante un ELISA, la forma en que afectaba el reconocimiento de 6aJL2 por el scFv, la desnaturalización del scFv con GdnHCL, y calor. Se realizó el ensayo como se mencionó en "ELISA de especificidad con fago anticuerpos" sólo que, se sustituyó el uso de fago anticuerpos, por 1 μg de anticuerpo purificado soluble en 100 μL de PBS por pozo. Analizando la actividad del anticuerpo por triplicado, se incubó el anticuerpo, antes de utilizarse, con 0.5, 1, 2, 3, y 4 M de Cloruro de Guanidinio y sin Cloruro de Guanidinio una hora a temperatura ambiente, además de someterlo en un experimento en paralelo, a temperaturas de 4, 25, 37, 50 y 60°C por una hora. El resto de los reactivos se utilizaron en las proporciones y secuencia mencionada, pero en vez de utilizar un anticuerpo anti-M13 para detectar fago-anticuerpos, se usó un anti-Cmyc y posteriormente un anticuerpo de cabra anti-ratón para detectar scFv solubles. La actividad contra la fibrilla y el monómero soluble se analizó por separado.

5.2.11 Ensayo de competencia con el anticuerpo monoclonal 55-5-F5

Se analizó por ELISA la unión de la cadena sencilla 7D a la cadena ligera recombinante 6aJL2, y de manera simultánea se agregó el anticuerpo monoclonal anti- λ 6 55-5-F5 para determinar si el sitio

de unión a 6aJL2, del anticuerpo completo y el scFv era el mismo. Para ello, se utilizaron los siguientes reactivos en el orden que se menciona a continuación:

- a. Se incubó en las placas el scFv (100 μ L de una concentración 10 μ g/mL en buffer de carbonatos) 1 hr a 37°C.
- b. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1%.
- c. Se bloquearon los pozos anteriores con 200 μ L de BSA al 0.5% en PBS al incubando 2 hr a 37°C.
- d. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- e. Se agregaron 100 μ L de la proteína 6aJL2 monomérica o fibrilla 5 μ g/mL (por triplicado en pozos distintos) en buffer PBS y se incubó 1 hr a 37°C.
- f. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.1%.
- g. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo monoclonal en PBS (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ g/mL en pozos distintos), y se incubó 1 hr a 37°C.
- h. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- i. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo conjugado de cabra anti-ratón, y se incubó 1 hr a 37°C.
- j. Se descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con PBS-Tween.
- k. Se adicionó 100 μ L de sustrato (OPD) e incubó a temperatura ambiente en oscuridad para esperar el desarrollo de una coloración amarilla.
- l. Se paró la reacción con 30 μ L de HCl 6 N y se midió el desarrollo de color en el lector de ELISA a 492 nm.

VI. RESULTADOS

En primera instancia, se cuenta con un dominio variable $\lambda 6$ modelo, el $6aJL2$, que tiene la secuencia de la línea germinal $6a$. A partir de este dominio se han obtenido varias mutantes (R25G, H8P, F2L, F2S, F2S-H8P, etc), cuyas propiedades de estabilidad termodinámica y de fibrilogénesis in vitro han sido extensamente estudiadas, y se caracterizan por un variado rango de tendencia a la agregación amiloide y estabilidad termodinámica. En base a estas proteínas, es que se buscó el(los) ligando(s) que pudiera(n) cumplir con los siguientes requisitos: afinidad de interacción con la V_L y capacidad para evitar la fibrilogénesis de $6aJL2$ y la de sus dominios variables mutantes. Se utilizó el despliegue de scFv en fagos filamentosos por ser esta una metodología que cumple con estas exigencias.⁴⁹ Un segundo paso necesario para el logro de los objetivos fue la caracterización del fragmento de anticuerpo seleccionado y el estudio de la fibrilogénesis in vitro del rVL $6aJL2$ y sus mutantes en presencia del mismo. Se han establecido varios métodos que permiten estudiar la cinética de la fibrilogénesis in vitro de las cadenas ligeras, tanto en tiempo real como por mediciones seriadas y existen métodos básicos de estudio de los cambios conformacionales que acompañan la agregación amiloide de estas proteínas.

Etapa I SELECCION

RONDAS DE SELECCIÓN

Se llevaron a cabo tres rondas de despliegue en fagos para encontrar ligandos potenciales, de una biblioteca humana no inmune de 1.1×10^8 variantes de fragmentos variables de cadenas sencillas, arrojando los títulos de entrada y salida mostrados en la tabla 7. El aumento de astringencia (Disminución del antígeno inmovilizado, aumento de lavados y aumento del tiempo de incubación con trietilamina) en las condiciones utilizadas conforme avanzaron las rondas, se vió reflejado en los valores de los títulos, que disminuyeron.

Tabla 7 Títulos de los fagos en las rondas de selección con la biblioteca humana de scFv.

	1era Ronda	2da Ronda	3era Ronda
Titulo de Entrada (Fagos/mL)	2.25×10^{11}	4.3×10^{10}	2.5×10^{10}
Titulo de Salida (fagos/mL)	1.45×10^5	4.1×10^4	5.5×10^4

De la tercera ronda de selección, se analizaron 52 clonas, mediante un ELISA de fago-anticuerpos (Fig. 7). El criterio utilizado para considerar de utilidad y seguir analizando las clonas elegidas fue que arrojaron una señal de absorbancia mayor a 0.5 unidades y que contuvieran el inserto (scFv) del tamaño de interés, por ello, a pesar de que 26 clonas dieron la señal esperada (Fig. 8), el ensayo posterior se hizo solo con 12 de ellas, puesto que eran las únicas que contuvieron genes de scFv de un tamaño de 850 pb aproximadamente. Esto fue observado al realizar PCR's en colonia, donde, contrario a encontrar amplificadas bandas únicas, se encontraron además fragmentos de alrededor de 500 pb.

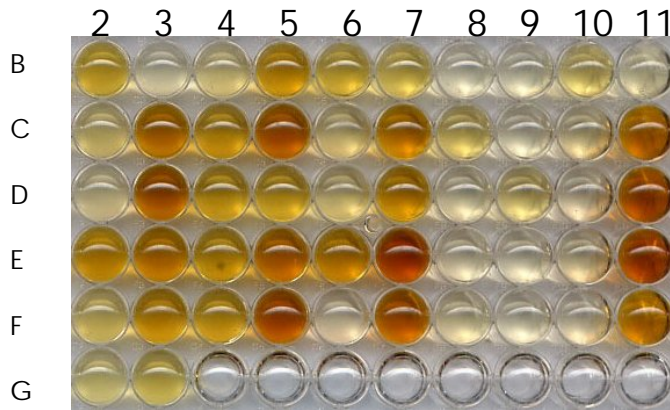


Fig. 7 Análisis del reconocimiento de las clonas de tercera ronda de selección, contra la forma soluble y fibrilla de la proteína recombinante 6aJL2. Los números del 2 al 11 y letras B al G, indican la posición de cada clona analizada en los pozos de la placa de ELISA.

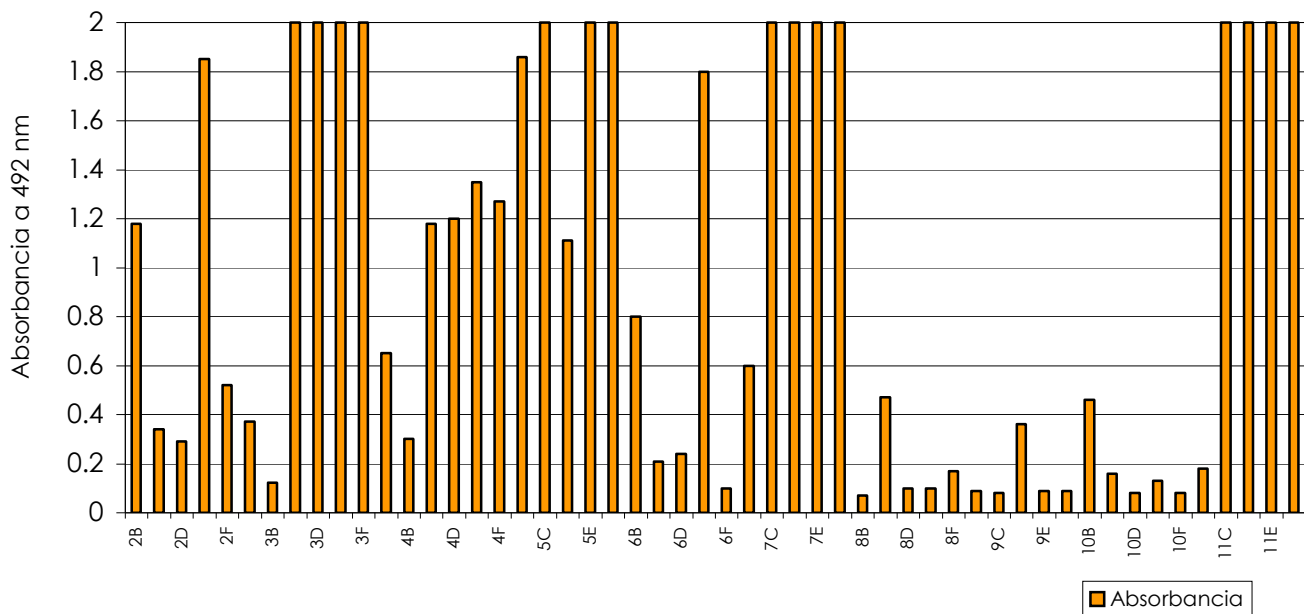


Fig. 8 Absorbancia arrojada en la evaluación del reconocimiento de las clonas. Las barras representan cada una de las clonas que dieron desde 0.066 unidades hasta números que salen del rango de detección (asignados con valor de 2.0). En el eje X se encuentran alfaunos de los nombres de las clonas analizadas.

La especificidad fue posteriormente determinada, nuevamente en un inmunoensayo enzimático, al analizar el reconocimiento del monómero soluble y la fibrilla de la cadena ligera recombinante 6aJL2 por las clonas (Fig. 9), Como puede observarse, las clonas con mayor especificidad mostraron ser 5B, 3C y 7D, puesto que la diferencia en la señal existente contra los antígenos mencionados y la señal dada por el reconocimiento de las proteínas utilizadas para bloquear, fue mayor (Fig 10).

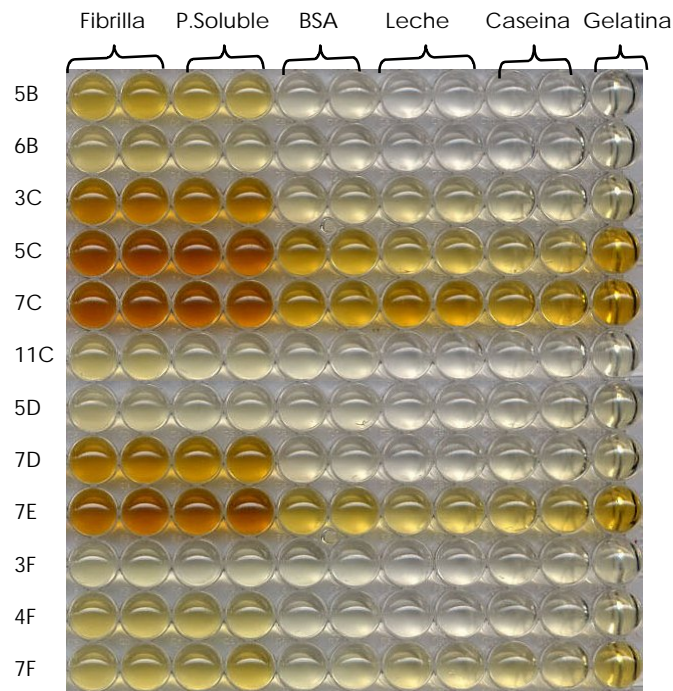


Fig. 9 ELISA de especificidad en el cual se observa la actividad de las clonas seleccionadas contra la forma soluble y fibrilla de 6aJL2. Como controles de especificidad se usaron BSA, leche, caseína y gelatina.

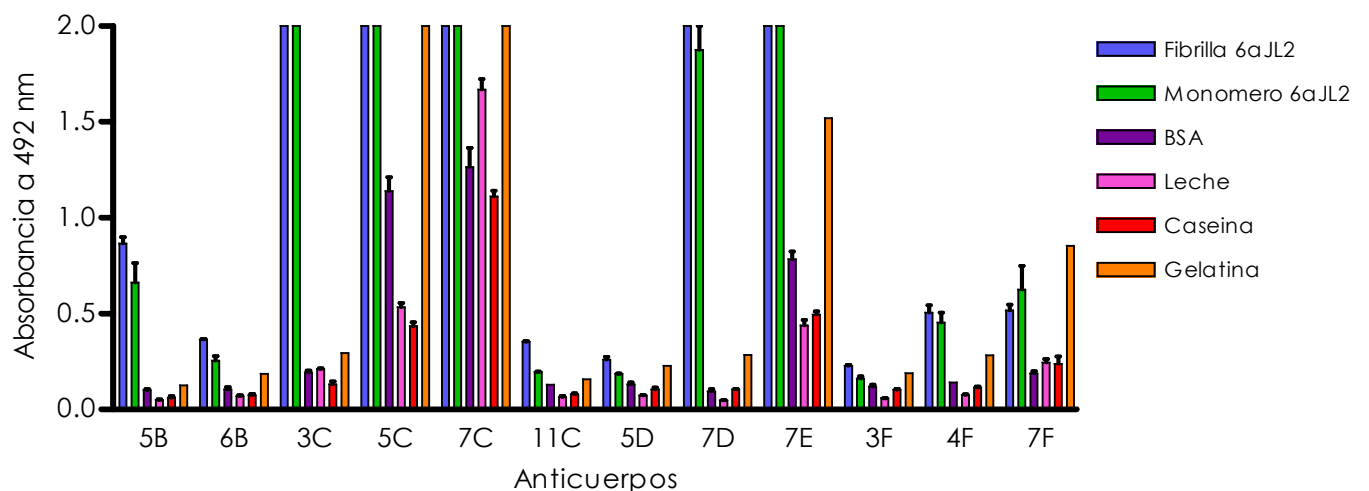


Fig. 10 Gráfico del ELISA de especificidad. Se visualiza los valores de absorbancia arrojados al utilizar fago-anticuerpos contra el monómero y fibrilla de 6aJL2. En base a la diferencia de estas señales contra aquellas ofrecidas por reconocimiento de agentes bloqueadores, es que se pueden discriminar clonas inespecíficas.

Etapa II EXPRESION

Con la finalidad de confirmar que las proteínas podían ser expresadas, fue necesario hacer un Dot Blot (Aplicación en gota), con el que finalmente se detectaron dos clonas potenciales: 5B y 7D. Otras clonas también expresaron scFv, pero muy poco en comparación con las ya mencionadas, y dado que, no se observó que fueran muy específicas y/o la señal de absorbancia no fue reproducible, no se utilizaron en los subsecuentes ensayos. Posteriormente se continuó con la expresión de la clona 7D, que se eligió para caracterizar más ampliamente, por lo que se procedió a insertar el gen del scFv en el vector de expresión. La clona 5B, debido a la inestabilidad que presentaba su secuencia no pudo ser subclonada, y por ende no se utilizó en los siguientes estudios. Las fig. 11 y 12 muestran los resultados de un ELISA, donde se confirmó la actividad específica de 7D en forma de anticuerpo soluble contra el monómero y fibrilla de 6aJL2, y contra el monómero y fibrilla de su mutante R25G.

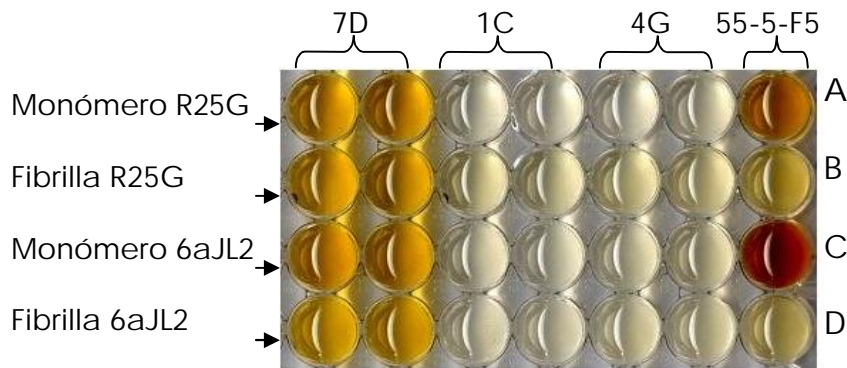


Fig. 11 Análisis de actividad de la clona 7D contra el monómero y fibrilla de 6aJL2, utilizando el anticuerpo en forma soluble. El control positivo (Ctr+) es el anticuerpo monoclonal utilizado anteriormente.

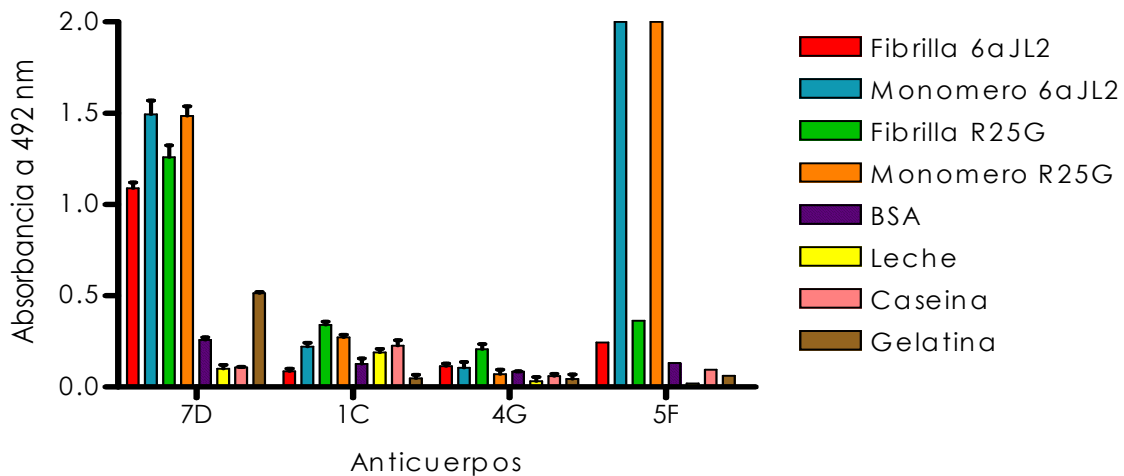


Fig. 12 Graficación del ELISA de proteína soluble. Se visualiza los valores de absorbancia arrojados al utilizar el ScFv soluble de la clona 7D contra el monómero y fibrilla de 6aJL2 y R25G. Los scFv utilizados como control negativo no ofrecen una señal comparable en el inmunoensayo, a la señal dada por el scFv 7D seleccionado.

Como se puede observar, la señal contra las proteínas de interés es mayor que la señal que arrojaron otros scFv (anti-toxinas) utilizados como controles negativos, hacia los mismos antígenos, pero menor (hacia los antígenos solubles específicamente) que el control positivo.

Para conocer las condiciones óptimas a expresar, se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* (TG1 y XL1 Blue) y a distintas temperaturas, se indujo la expresión de la proteína. Se tomaron muestras a determinados períodos de tiempo y se corrió un gel SDS-PAGE para observar las proteínas contenidas en el extracto total, obtenido por choque osmótico de las células. Como lo muestra el panel A de la figura 13, el extracto total de proteínas obtenidas utilizando TG1 da una mayor cantidad del anticuerpo de interés (así como de otras proteínas extraídas en el proceso) que el extracto de BL21 (panel B, fig.13). Alrededor de los 25 KDa se consideró que estuviesen las bandas correspondientes al anticuerpo, que aún sin haber comenzado el proceso de inducción, ya se estaba visualizando (Carriles 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12) carril (C-) de los dos paneles. De esta forma, como se observó una mayor cantidad de proteína en los extractos de TG1, a las 6 horas de inducción, y temperaturas de 25°C y 37°C (carriles 9 y 11 respectivamente), se consideraron que éstas, eran las condiciones óptimas para expresar el anticuerpo en una mayor escala. Para confirmar que las bandas vistas, correspondían efectivamente al anticuerpo, se procedió a correr de nuevo un gel de poliacrilamida para transferirlo a una membrana de nitrocelulosa y hacer una inmunodetección, que finalmente confirmó lo predicho. Al analizar la secuencia (fig.14) de la clona

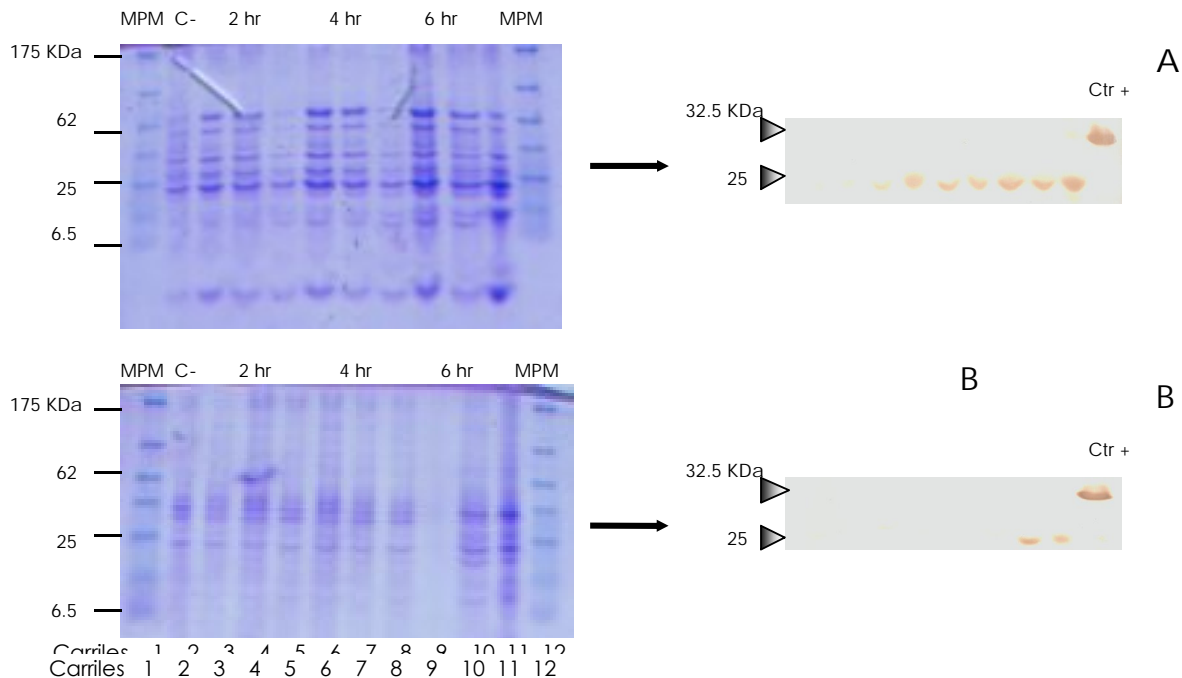


Fig. 13 SDS-PAGE y Western Blot. El panel A representa los ensayos elaborados con la cepa TG1 y el panel B, con la cepa BL21. En el primero y último carriles de los gels de poliacrilamida, se cargó un marcador de peso molecular de proteínas (MPM); el segundo carril contiene controles negativos (C-), que representan cultivos sin inducir; el tercero, sexto y noveno carriles representan muestras obtenidas de los cultivos crecidos a 25°C a las 2, 4 y 6 hr de inducción respectivamente; el cuarto, séptimo y décimo carriles, contienen muestras de cultivos crecidos a 30°C a los tiempos indicados, y el quinto, octavo y onceavo carriles son de cultivos crecidos a 37°C. Todas las muestras son extractos de proteínas totales, obtenidas por choque osmótico. Los gels para transferir se hicieron de la misma forma, pero sustituyendo el MPM del último carril, por una cadena sencilla como marcador.

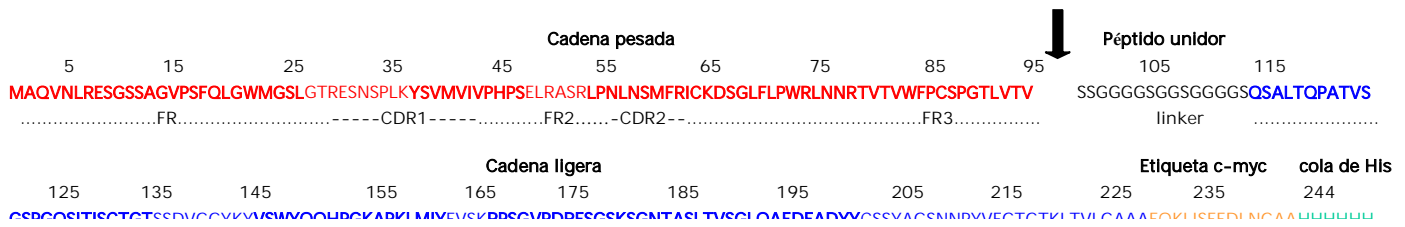


Fig. 14 Secuencia de la clona 7D. Los aminoácidos en azul, representan la parte correspondiente a la cadena pesada; en color negro se encuentra asignada la región del péptido unidor; en rojo se representa la cadena ligera; la secuencia de la etiqueta de detección del anticuerpo se encuentra en color anaranjado y la cola de histidinas en verde. Los frameworks de las dos cadenas se encuentran en negrilla. La flecha vertical indica la posición de la delección del CDR3 de la cadena pesada.

7D y observando el tamaño de las bandas en los gels, se dedujo que era un anticuerpo de menor tamaño a las cadenas sencillas convencionales (último carril de los Western Blots, Ctr+), con parte de la cadena pesada truncada (correspondiente a la familia VH₃), un péptido unidor de 15 aminoácidos y una cadena ligera correspondiente a la familia lambda 2.

Conociendo las condiciones adecuadas, fue llevada la expresión del anticuerpo a un litro. Se realizó de nuevo la extracción de proteínas totales, y finalmente se purificó por cromatografía de afinidad con níquel, el anticuerpo soluble. La fig. 15 muestra un gel en el que se puede apreciar la proteína, donde ninguna banda adicional se observa en los carriles 4 y 5, en los cuales se cargaron fracciones del extracto tratado con PPB y MgSO₄. El rendimiento de la proteína alcanzó los 416 µg/L.

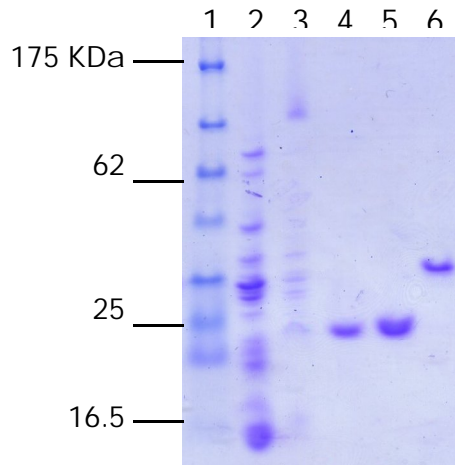


Fig. 15 SDS-PAGE. Se comparó parte del extracto total de proteínas (carril 2), con el eluado resultante de la purificación del anticuerpo (carril 3) y fracciones de proteína pura extraídas con MgSO₄ y PPB (carriles 4 y 5 respectivamente). En el segundo carril ya no se observa una banda de 25 KDa, con lo que se puede deducir, que para el momento del desarrollo de este ensayo, el anticuerpo fue degradado en el extracto. En el primer carril se encuentra el MPM y en el último, un scFv usado como marcador. El eluado contiene un poco de anticuerpo que no logró retenerse en la resina.

Etapa III

CARACTERIZACIÓN

Con la proteína purificada se hizo el ensayo de inhibición de extensión de fibrillas tanto de 6aJL2 (proteína contra la que se retó la biblioteca), como R25G. Como se menciona en la etapa metodológica, monómero con semilla de 6aJL2 o R25G se colocaron en presencia o ausencia de diferentes proporciones del scFv 7D, el Mab 55-5-F5 u otras cadenas sencillas irrelevantes y se dejaron incubando a 37°C toda la noche con el fin de observar una extensión o inhibición de la extensión de las semillas. Los resultados reflejaron una inhibición de hasta 85% de formación de fibrillas de R25G y 53% de inhibición de las de 6aJL2, ocasionada por el fragmento variable de cadena sencilla 7D (Fig.16 panel A y B respectivamente), al ser utilizado en una proporción molar 1:1 (monómero:scFv).

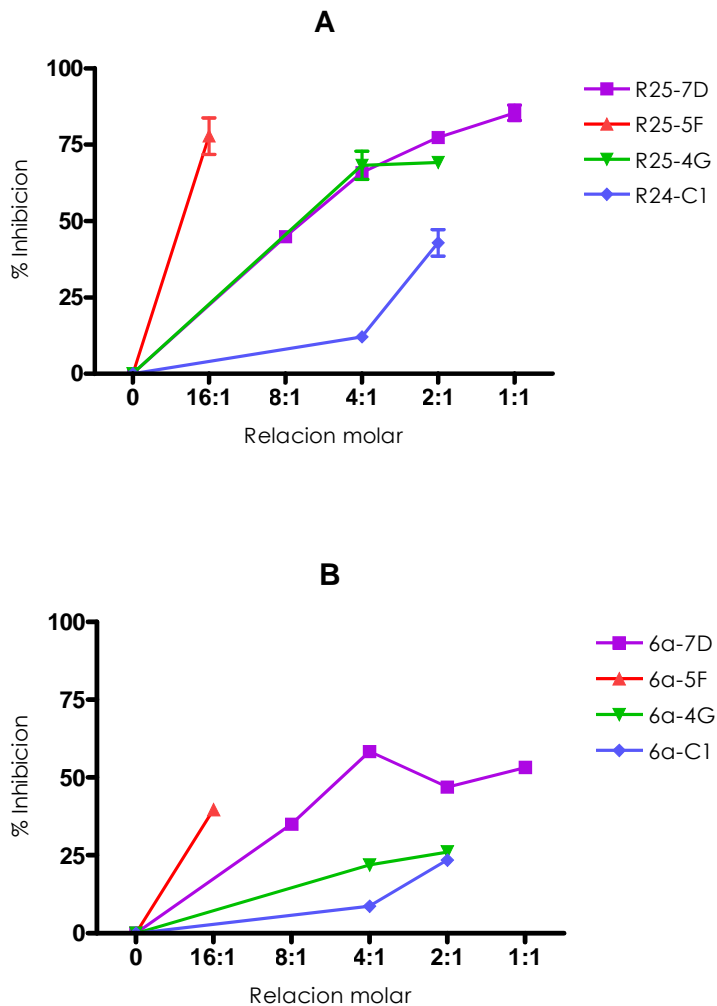


Fig. 16 Inhibición de extensión de "semillas". El panel A muestra los porcentajes de inhibición de la extensión de fibrillas formadas por R25G; el control positivo se ve indicado con una línea de color rojo, los anticuerpos irrelevantes utilizados como control negativo, se encuentran en color azul y amarillo, y el anticuerpo analizado en color morado. El panel B muestra los porcentajes de inhibición de 6aJL2 y el patrón de colores utilizado es el mismo del panel anterior.

Además se mostró una inhibición en una proporción 1:2 del 77% para R25G, manteniéndose prácticamente estable la de 6aJL2. El anticuerpo 55-5-F5 utilizado como control positivo inhibió en un 78% y 39% a R25G y 6aJL2, respectivamente, al utilizarse en una proporción 1:16 (monómero:AcM). Los controles negativos utilizados fueron dos anticuerpos irrelevantes (1C y 4G) que extrañamente también inhibieron, a R25G y 6aJL2 en un 69% y 26%, respectivamente (para el caso de 4G) y en un 42 y 23%, respectivamente (para el caso del anticuerpo 1C) al utilizarse en una proporción 1:2 (monómero:scFv). Los blancos en los que se utilizó exclusivamente monómero soluble, dieron una intensidad de fluorescencia prácticamente equivalente a la del ThT/PBS sin proteína, por lo que al valor de fluorescencia de todas las muestras se le dedujo solamente aquel valor que dió la producción de fibrillas formada por los blancos que incluían solo “semilla”.

Posteriormente se procedió a analizar su estabilidad por ELISA en presencia de concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio, o bien, incubándolo en un ensayo paralelo, a diferentes temperaturas, antes de ponerlo a interactuar con el antígeno. Las lecturas demostraron que cerca del 75% del reconocimiento del monómero de 6aJL2 por el anticuerpo fue abatido, al incubar el anticuerpo toda la noche con GdnHCl a una concentración de 0.5 M, sin embargo aún con el aumento de la concentración del desnaturalizante, el reconocimiento de la fibrilla se mantuvo en un 80% aproximadamente. En cuanto a la estabilidad a distintas temperaturas, se confirmó que la actividad del anticuerpo se mantiene a 4°C, sin embargo a 37°C cae hasta a un 30%, ya sea para la fibrilla o para el monómero de 6aJL2 (Fig.17).

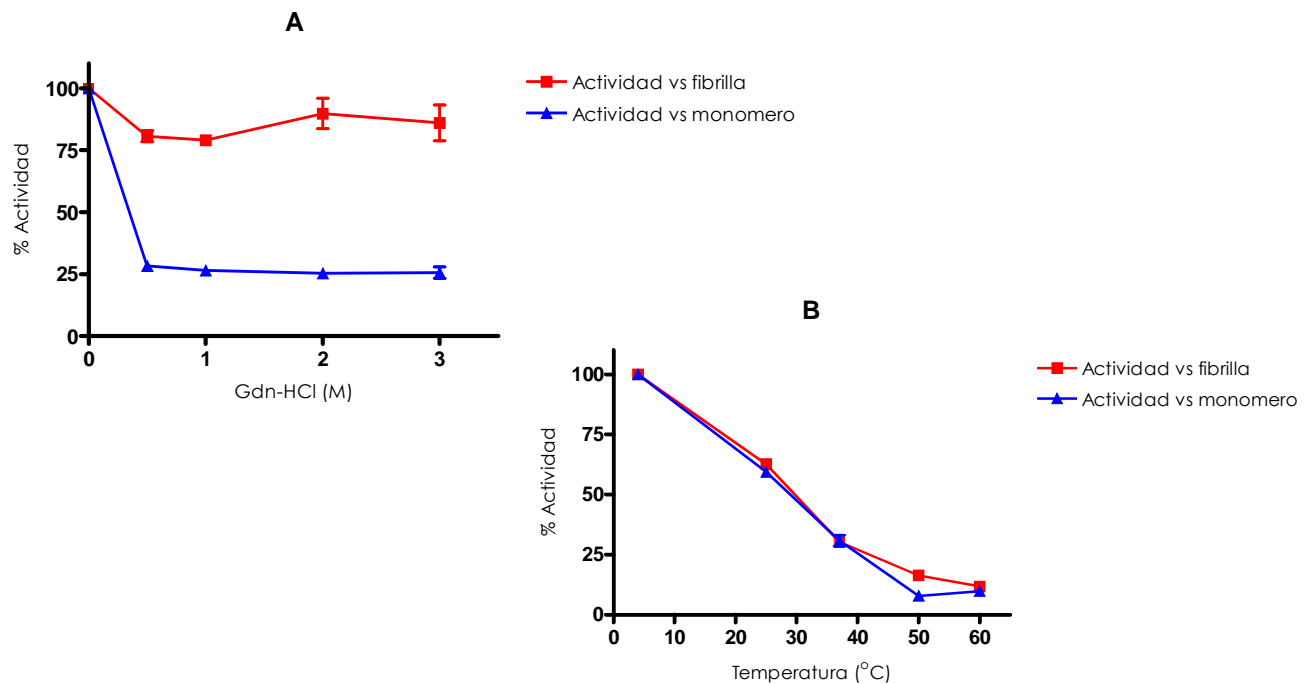


Fig. 17 Estabilidad funcional del anticuerpo 7D. En el panel A se visualiza el comportamiento del scFv 7D, con una incubación previa con distintas concentraciones de cloruro de guanidinio. La pérdida de la actividad hacia la fibrilla y el monómero se muestran mediante una línea roja y azul respectivamente. En la grafica inferior, se aprecia asimismo, la disminución de la actividad conforme un aumento en la temperatura de incubación del scFv, previo contacto con el antígeno.

Con el objeto de conocer si podrían tener los mismos sitios de interacción con la fibrilla o monómero soluble, el anticuerpo monoclonal murino 55-5-F5 y el scFv 7D, se desarrollaron ensayos de competencia. La figura 18 reveló la tendencia de los valores de absorbancia a aumentar conforme se incrementó la cantidad de anticuerpo monoclonal utilizado, a una cantidad constante de scFv. Lo que indica, finalmente, que no existe desplazamiento de la cadena sencilla 7D por el anticuerpo 55-5-5F y el reconocimiento de los dos anticuerpos, tanto para la fibrilla (panel A) como para el monómero (panel B) es hacia epítopes distintos.

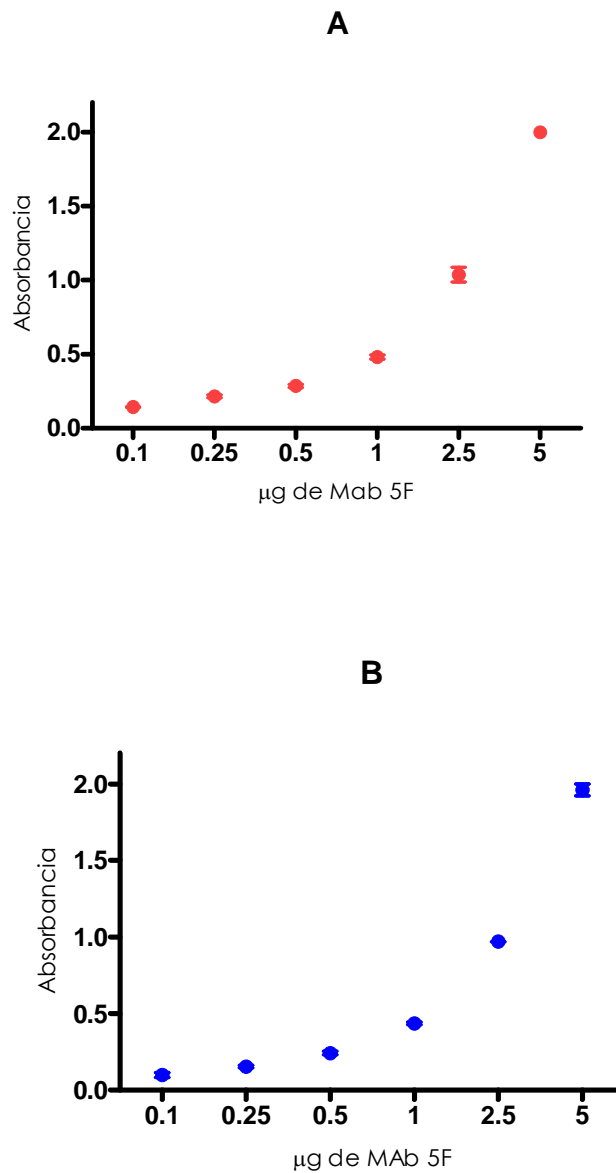


Fig. 18 Prueba de competencia. En los paneles A y B se encuentran graficadas las lecturas de absorbancia arrojadas, al analizar el desplazamiento del scFv 7D por el anticuerpo monoclonal 5F en su unión con la fibrilla y el monómero de 6aJL2 respectivamente.

VII. DISCUSIONES

Las amiloidosis son enfermedades que comprenden patologías que llegan a afectar al paciente en forma sistémica o localizada, y pueden representar un gran impedimento para realizar incluso tareas cotidianas, lo que no permite llevar una vida normal. Existe evidencia, de que no son las fibrillas, sino estados oligoméricos intermediarios, los que causan el daño tisular importante en las amiloidosis no neuropáticas, sin embargo, el mecanismo de patogénesis no se encuentra totalmente esclarecido, cuestión que es de trascendencia comprender, ya que permite orientarnos en la búsqueda de una propuesta terapéutica.⁴³

Hay varios factores de riesgo involucrados en el desarrollo de estas enfermedades en nuestro organismo. Se ha planteado, que el paciente per se, juega un rol importante considerando elementos como: decaimiento del sistema de chaperonas y procesamiento endoproteolítico por la edad del paciente; elevación de la concentración de péptidos y proteínas nativas desplegadas, o de fragmentos de proteínas generadas por proteólisis; propiedades intrínsecas de la proteína amiloidogénica como hidrofobicidad, carga o estructura secundaria; o bien, factores externos, ambientales causantes de mutaciones somáticas.⁴⁴

Se han planteado varias estrategias terapéuticas con la finalidad de abatir las manifestaciones clínicas de estas enfermedades. En éstas se incluyen, la intervención en el plegamiento anómalo y/o procesamiento endoproteolítico aberrante (inhibiendo la formación de precursores amiloidogénicos monoméricos mediante micro o macromoléculas), prevención de la formación de fibrillas en estado maduro e inducción de la depuración de amiloides. Sin embargo, aunque algunas compañías farmacéuticas han obtenido productos potenciales, in vitro, que previenen la maduración de la fibrilla, ninguno mantiene al amiloide en forma monomérica o se une a una estructura cuaternaria definida, lo que quizá lleve a una exacerbación, de la patología in vivo.⁴⁴⁻⁴⁸

Con estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo ha planteado la posibilidad de encontrar mejores alternativas terapéuticas basados en la búsqueda, mediante el despliegue en fagos, de anticuerpos provenientes de bibliotecas no inmunes⁴⁹⁻⁵³. Uno de los anticuerpos precisamente encontrados mediante esta metodología fue el scFv denominado 7D. Éste proviene de un repertorio humano, que fue retado contra la forma monomérica y fibrilla del modelo de estudio para amiloidosis AL, 6aJL2. El proceso de selección, incluyó una preelucion con trietilamina 100 mM y una infección posterior de células con los fagos remanentes. Esta estrategia ha sido planteada anteriormente con el objeto de incrementar el número de clones con insertos de tamaño completo. El resultado de ello es una disminución considerable en el título de salida de anticuerpos/mL, pero se basa en el razonamiento de que, al utilizar solo un agente para eluir, posiblemente se eliminaran los fagos de alta afinidad de la población total, al no rescatarse todos.⁵⁴

Finalmente se obtuvieron varias clonas con actividad tanto para la fibrilla como para el monómero de 6aJL2, pero como ensayos posteriores revelaron que no todos contenían el inserto del tamaño de interés, muchos se descartaron. El hallazgo de anticuerpos con estas características (V_H incompletos en scFv, o scFv carecientes de V_H) ha sido anteriormente reportado, incluso el scFv 7D, como se puede visualizar en su secuencia, carece del dominio CDR3. Las razones de estos hallazgos pueden deberse a deleciones en los insertos durante el crecimiento, a la presencia de construcciones incompletas en la biblioteca (y posible selección positiva de esos insertos pequeños durante el cultivo), eliminación de anticuerpos completos por la célula (por poseer una secuencia tóxica para la misma), inmunodominancia, entre otros. Sin embargo, a pesar de que no es el tipo de fragmento de anticuerpo comúnmente utilizado con fines diagnósticos o tratamiento, en el presente trabajo, se plantea su potencial para inhibir la extensión de semillas de proteínas fibrillogénicas.^{51,54}

En la etapa inicial de obtención del anticuerpo, la expresión se hizo auxiliándose del sistema procariótico. Éste es muy ventajoso porque es bien conocido, es relativamente económico, de manipulación sencilla, no existe preocupación por trabajar con virus perjudiciales para humanos y el tiempo transcurrido entre la transformación y la purificación de la proteína es corto.^{55,56} Posteriormente, se extrajeron las proteínas totales por choque osmótico del periplasma, utilizando una estrategia ampliamente utilizada. Aprovechando el ambiente oxidativo de este compartimento a su vez facilita el plegamiento de proteínas recombinantes^{55,57}. Finalmente para poder tener el anticuerpo puro, se recurrió a la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, en este caso Ni(II). La unión de este metal con las histidinas en el extremo carboxilo terminal del anticuerpo, permite su retención en la columna. La eliminación de otras proteínas irrelevantes, se hace posible con lavados de imidazol a baja concentración, y la elución de la proteína de interés con imidazol concentrado⁵⁸. Una vez obtenido el anticuerpo puro, se procedió a caracterizarlo. Éste se pudo visualizar en un SDS-PAGE con tricina, lo que permite separar proteínas pequeñas (1-100 KDa) con mejor resolución que el SDS-PAGE-glicina; además su tamaño fue confirmado por inmunodetección.

^{59,60}

Basado en los ensayos de extensión de fibrillas, se monitoreó la intensidad de fluorescencia de ThT para determinar si la interacción del scFv 7D con el monómero o semilla de 6aJL2 y R25G, inhibía la extensión de estas últimas^{61,62}. R25G es una proteína que proviene de una mutación en el residuo 25 de 6aJL2 (lo que ocasiona un aumento en la cinética de fibrillogénesis) y se utilizó en virtud de ser un mejor modelo para analizar la capacidad de fibrillogénesis, y por ende, de ser inhibida. Estos ensayos revelaron, que efectivamente se inhibió la extensión de las fibras de las dos proteínas, lo que se vio reflejado en la disminución de la intensidad de fluorescencia de las muestras de que contenían 6aJL2 o R25G con anticuerpo, en comparación con las muestras que únicamente contenían semilla y monómero de 6aJL2 o R25G (lo que reflejó un decremento en la cantidad de fibrilla formada). Comparando los resultados del control positivo con la inhibición de R25G por el scFv 7D, es claro que utilizando la relación equivalente, la inhibición por parte del monoclonal sería mayor, considerando

que en proporción 16:1, el monoclonal inhibe prácticamente igual que 7D a una relación molar mayor (2:1). En cuanto a los controles negativos, a un misma relación (2:1) C1 inhibe 35% menos a R25G, sin embargo 4G lo inhibe únicamente 8% menos. Lo anterior, pudiese indicar que existen varios mecanismos posibles de inhibición entre los cuales se pudieran encontrar, aquellos ocasionados por uniones específicas del anticuerpo con la fibrilla o el monómero soluble (como la interacción planteada de 7D con 6aJL2), o bien, interacciones inespecíficas mediadas por regiones distintos a los dominios variables (interacción de 6aJL2 con los scFv irrelevantes), sugerido además por el inmunoensayo enzimático (fig.11), donde no existe reconocimiento significativo, por estos otros anticuerpos contra los antígenos inmovilizados. Por otro lado, en el caso de la inhibición de 6aJL2, el monoclonal lo inhibe un poco más, en una relación 16:1, que 7D en relación 8:1, lo que también indica que el mejor inhibidor es el anticuerpo completo. Comparando todas las cadenas sencillas, 4G inhibe 26% menos que 7D a una misma relación molar, y C1 inhibe 29% menos, a las mismas condiciones, que 7D.

También se realizaron experimentos con el fin de analizar la estabilidad funcional, lo que permitió encontrar la concentración y temperaturas críticas a las cuales el anticuerpo seguía manteniendo su actividad hacia la fibrilla y monómero de 6aJL2.^{63,64} Esto evidenció la inestabilidad del anticuerpo, a excepción de la actividad en GdnHCl, hacia la fibrilla, que no disminuyó drásticamente. Esto quizá es atribuible a la estabilidad de la fibrilla misma, con la que se inmovilizó la placa, especialmente si consideramos que el reconocimiento del anticuerpo sea más hacia un epítipo conformacional encontrado en la fibrilla, que hacia un epítipo secuencial que pudiésemos encontrar en el monómero. Esto no ha sido determinado con precisión, y aún encontrando que existe una reacción cruzada (reconocimiento hacia las dos formas, fibrilla y monómero), de 6aJL2, no se puede descartar que quizá el reconocimiento hacia el monómero pueda ser simplemente por la cantidad de epítopes expuestos del mismo, que son más, que en la fibrilla.

Finalmente, en el ensayo de competencia se vió un incremento en la respuesta al subir la concentración del anticuerpo murino 55-5-F5, lo que sucedió, debido a que los dos anticuerpos permanecen unidos al antígeno reconociendo epítopes distintos. Se ha planteado anteriormente, que el desarrollo de bibliotecas no inmunes, permiten el aislamiento de anticuerpos con capacidad de reconocimiento a cualquier antígeno dado, puesto que se imita la respuesta inmune in vitro; sin embargo, la selección que se hace con este método es distinta al proceso de maduración que sufren los anticuerpos cuando un antígeno entra en contacto con el organismo. Considerando además que la posibilidad de presentar tolerancia inmunológica a algunos antígenos, provoca que el repertorio natural de anticuerpos que se genera puede no incluir moléculas que establezcan las mismas interacciones con el agente extraño que un anticuerpo proveniente de una biblioteca desarrollada in vitro, por ello es obvio que anticuerpos de diferente origen y aislados de fuentes distintas (puesto que el Mab 55-5-F5 proviene de una biblioteca inmune), puedan reconocer epítopes independientes.^{52,65,66}

Recientemente se han descrito péptidos sintéticos utilizados con éxito para generar anticuerpos con reconocimiento específico hacia proteínas amiloides (de cadena λ). Estos anticuerpos a su vez, han sido de utilidad para la detección de proteínas amiloides por inmunohistoquímica y Western blots. Los péptidos sintéticos mencionados, se desarrollaron por considerarse los dos epítopes mas inmunogénicos de una variedad de secuencias de cadenas ligeras λ amiloides y no amiloides.⁶⁷ Dado que existe un alto nivel de similitud de uno de estos epítopes con un fragmento de la cadena ligera del scFv 7D seleccionado, pudiese fundamentar la idea de la gran influencia que tiene la cadena ligera del anticuerpo 7D, que estuviese actuando como un monómero más en el proceso de formación de fibrillas, sin embargo, como un proceso interrumpido (lo que genera la inhibición de la extensión de las "semillas") por el otro dominio (el de la cadena pesada) del scFv que impide estéricamente la unión de más monómeros.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado el aislamiento de un fragmento variable de cadena sencilla con relativa especificidad hacia el modelo de estudio 6aJL2.
2. El scFv denominado 7D, tiene un dominio variable de cadena pesada perteneciente a la familia VH3, y un dominio variable de cadena ligera de la familia lambda 2.
3. El anticuerpo 7D inhibe hasta en un 85% la extensión de fibrillas formadas por la proteína R25G, y hasta en un 53%, aquellas formadas por 6aJL2.
4. La cadena sencilla 7D es un anticuerpo inestable, que prácticamente pierde actividad hacia su antígeno en condiciones tales como incubación con GdnHCl 0.5 M y temperaturas mayores a 37°C.
5. Los epítopes de 6aJL2 que son reconocidos por 7D y el anticuerpo monoclonal 5F, son distintos.
6. La interacción del scFv con el antígeno, no es mediada por la presencia del CDR3, lo que sugiere, que posiblemente sea la cadena ligera de 7D la que este más involucrada en esta unión.

IX. PERSPECTIVAS

1. Amplificar por separado los dominios variables del scFv 7D y evaluar su actividad por ELISA, para confirmar la forma como cada uno de ellos, pudiese estar involucrado en el reconocimiento de 6aJL2.
2. Madurar el(los) dominio(s) involucrados en el reconocimiento para mejorar propiedades del anticuerpo como la afinidad y estabilidad.
3. Estandarizar las condiciones óptimas a las cuales se puede lograr una mejor expresión del anticuerpo.
4. Realizar ensayos para determinar su estabilidad y afinidad, mediante ELISA y un sensor de interacciones moleculares en tiempo real, respectivamente.
5. Desarrollar péptidos basados en el segmento de anticuerpo que conserva la capacidad de reconocimiento hacia 6aJL2 para obtener agentes terapéuticos más eficientes.

X. REFERENCIAS

1. Stevens, F.J., Myatt, E.A., Chang, C., Westholm, F.A., Eulitz, M., Weiss, D.T., Murphy, C., Solomon, A., Schiffer, M. (1995) A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: immunoglobulin light chains 34: 10697-10702.
2. Dobson, C.M., (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology*, 15: 3-16.
3. Uversky, V.N., Fink, A.L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta* 1698: 131-153.
4. Wall, J.S., Gupta, V., Wilkerson, M., Schell, M., Loris, R., Adams, P., Solomon, A., Stevens, F., Dealwis, C. (2004) Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four $V\lambda 6$ proteins. *Journal of Molecular Recognition* 17: 323-331.
5. Dumoulin, M., Dobson, C.M. (2004) Probing the origins, diagnosis and treatment of amyloid diseases using antibodies. *Biochimie* 86: 589-600
6. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrnčić, R., Stevens, F. J., Solomon, A. (1999) Thermodynamic instability of human $\lambda 6$ light chain: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*, 38(42): 14101-14108.
7. Hou, L., Zagorski, M.G., (2004) Sorting out the driving forces for parallel and antiparallel alignment in the A β peptide fibril structure. *Biophysical Journal*, 86: 1-2.
8. Park, M.A., Mueller, P.S., Kyle R.A., Larson, D.R., Plevak, M.F., Gertz, M.A. (2003) Primary (AL) hepatic amyloidosis clinical features and natural history in 98 patients. *Medicine* 82: 291-298.
9. Solomon, A., Frangione, B., Franklin, E. C. (1982) Preferential Association Of The $V\lambda VI$ Subgroup Of Human Light Chains In Amyloidosis AL. *J. of Clin. Invest.* 70: 453-460.
10. Ozaki, S., Abe, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D. T., Solomon, A. (1994) Preferential expression of human-lambda light chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenström's macroglobulinemia. *Clin. Immunol. Immunopath.* 71: 183-189.
11. Comenzo, R. L., Wally, J., Kica, G., Murray, J., Ericsson, T. (1999) Clonal immunoglobulin light chain variable region germline gene use in AL amyloidosis: association with dominant amyloid-related organ involvement and survival after stem cell transplantation. *B. J. of Haematology*, 106: 744-751.
12. Comenzo R. L., Zhang, Y., Martinez, C., Osma, K., Herrera, G. (2001) The tropism of organ involvement primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V_L germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood*, 98(3): 714-720.
13. Bellotti, V., Mangione, P., Merlini, G. (2000) Review: Immunoglobulin light chain amyloidosis-The archetype of structural and pathogenic variability. *J. of Struct. Biol.* 130: 280-289.

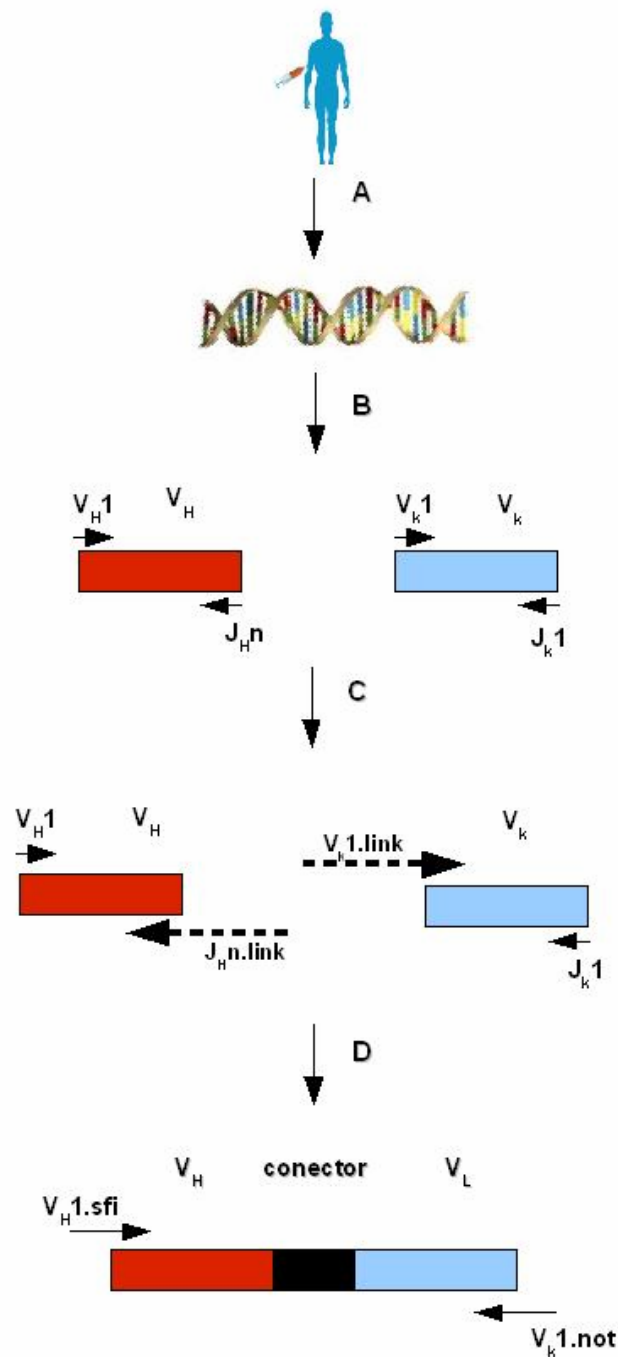
14. Khurana, R., Ionescu-Zanetti, C., Pope, M., Li, J., Nelson, L., Ramírez-Alvarado, M., Regan, L., Fink, A.L., Carter, S. (2003) A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 85: 1135-1144.
15. Khurana, R., Souillac, P. O., Coats, A.C., Minert, L., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A., Solomon, A., Fink, A. (2003) A model for amyloid fibril formation in immunoglobulin light chains based on comparison of amyloidogenic and benign proteins and specific antibody binding. *Amyloid: J. Protein folding Disord.* 10: 97-109.
16. Takahashia, N., Hasegawaa, K., Yamaguchia, I., Okadaa, H., Uedac, T., Gejyob, F., Naikia, H. (2002) Establishment of a first-order kinetic model of light chain-associated amyloid fibril extension in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1601: 110-120.
17. Hosia, W., Bark. N., Liepinsh, E., Tjernberg, A., Persson, B., Hallen, D., Thyberg, J., Johansson, J., Tjernberg, L. (2004) Folding into a β -hairpin can prevent amyloid fibril formation. *Biochemistry*, 43: 4655-4661.
18. Serpell, L.C., Sunde, M., Blake, C.C.F. (1997) The molecular basis of amiloidosis. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, 53: 871-887.
19. Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2001) Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 2754-2759.
20. Khurana R., Gillespie J.R., Talapatra A., Minert L.J., Ionescu-Zanetti C., Millet I., Fink A. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*, 40: 3525-3535
21. Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millert, I S., Khurana, R., Doniach, S., Fink, A. L. (2002) Effect of association state and conformation stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH. *J. Biol. Chem.* In Press. Published on January 28, 2002 as Manuscript.
22. Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., Pluckthun, A. (2003) Biophysical properties of human antibody variable domains. *Journal of Molecular Biology*, 325: 531-553.
23. Mason, J., Kokkoni, N., Stott, K., Doig, A. (2003) Design strategies for anti-amyloid agents. *Current Opinion in Structural Biology*, 13: 526-532.
24. Solomon, B., Koppen, R., Hanan, E., Katzav, T. (1996) Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer β -amyloid peptide, 93: 452-455.
25. Liu, R., Yuan, B., Emadi, S., Zameer, A., Schulz, P., AMAllister, C., Lyubchenko, Y., Goud, G., Sierks, M.R. (2004) Single Chain variable fragments against β -amyloid ($A\beta$) can inhibit $A\beta$ aggregation and prevent $A\beta$ -induced neurotoxicity, 43: 6959-6967.
26. Hanan, E., Goren, O., Eshkenazy, M., Solomon, B. (2001) Immunomodulation of the human prion peptide 106-126 aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 280:115-120.

27. Dottorini, T., Vaughan, C., Walsh, M., LoSurdo, P., Sollazzo, M. (2004) Crystal structure of a human VH: requirements for maintaining a monomeric fragment. *Biochemistry*, 43: 622-628.
28. Dumoulin, M., Last, A., Desmyter, A., Decanniere, K., Canet, D., Larsson, G., Spencer, A., Archer, D., Sasse, J., Muyldermans, S., Wyns, L., Redfield, C., Matagne, A., Robinson, C., Dobson, C. (2003) A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature*, 424: 783-788.
29. Chiti, F., Dobson, C. M (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 333-366.
30. Sacchettini, J.C., Kelly, J.W. (2002) Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature reviews*, 1: 267-274.
31. Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J., Selkoe, D.J (2002) Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society Transactions*, 30: 552-557
32. Klabunde, T., Petrassi, H.M., Oza, V.B., Raman, P., Kelly, J.W., Sachettini, J.C. (2000) Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors. *Nature structural biology*, 7(4): 312-321.
33. Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E. ((2001) Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer disease conundrum. *Trends in neurosciences*, 24(4): 219-224.
34. Fukuchi, K., Accavitti-Loper, M.A., Kim, H., Tahara, K., Cao, Y., Lewis, T.L., Caughey, R.C., Kim, H., Lalonde, R. (2006) Amelioration of amyloid load by anti-A β single-chain antibody in Alzheimer mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344: 79-86.
35. Hrcic, R., Wall, J., Wolfenbarger, D.A., Murphy, C, L., Shell, M., Weiss, D.T., Solomon, A. (2000) Antibody-mediated resolution of light chain-associated amyloid deposits. *American Journal of Pathology*, 157(4): 1239-1246.
36. Solomon, A., Weiss, D.T., Wall, J. Immunotherapy in Systemic Primary (AL) amyloidosis using amyloid-reactive monoclonal antibodies. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 18(6): 853.
37. Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G.J., Muyldermans, S., Wyns, L., Matagne, A. (2002) Single domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*, 11: 500-515.
38. Van Dijk, M.A., van de Winkel, J.G.J. (2001) Human antibodies as next generation therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 368-374.
39. Stockwin, L.H., Holmes, S. (2003) The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochemical society Transactions*, 31: 433-436.
40. Presta, L.G. Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies. (2005) *Journal of allergy and clinical immunology*, 116(4): 731-736.
41. Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., Pluckthun, A. (2003) Structure based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry*, 42: 1517-1528.

42. Davies, J., Riechmann, L. (1995) Antibody VH domains as small recognitions units. *Biotechnology*, 13: 475-479.
43. Davies, J., Riechmann, L. (1996) Single antibody domains as small recognitions units: design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein engineering*, 9: 531-537.
44. Holt, L., Herring, C., Jespers, L., Woolven, B., Tomlinson, I. (2003) Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends in biotechnology*, 21: 484-490.
45. Riechmann, L., Muyldermans, S. (1999). Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *Journal of immunological methods*, 231: 25-38.
46. Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K., Pluckthun, A. (2002) Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains. *Biochemistry*, 41: 3628-3636.
47. Tanha, J., Xu, P., Chen, Z., Ni, F., Kaplan, H., Narang, S., MacKenzie, R. (2001) Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *The Journal of biological chemistry*, 276: 24774-24780.
48. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajajaya Songa, E., Bendahman, N., Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
49. Willats, W. (2002) Phage display: Practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, 50: 837-854.
50. Pini, A., Bracci, L. (2000) Phage display and antibody fragments. *Current protein and peptide science*, 1:155-169.
51. Lou, J., Marzari, R., Verzillo, V., Ferrero, F., Pak, D., Sheng, M., Yang, C., Sblattero, D., Bradburry, A. (2001) Antibodies in haystacks: how selection strategies influences the outcome of selection from molecular diversity libraries. *Journal of immunological methods*, 253: 233-242.
52. Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. (1991) Bypassing immunization, human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of Molecular Biology*, 222: 581-597.
53. Riaño-Umbarila L., Juárez González, V.R., Olamendi-Portugal, T., Ortíz-León, M., Possani, L.D., Becerril, B. (2005) A strategy for the generation of specific human antibodies by direct evolution and phage display. *The FEBS Journal*, 272: 2591-2601.
54. De Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R., Quattrocchio, F. (1999) Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature biotechnology*, 17: 397-399.
55. Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., MacKenzie, R. (2005) Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25:501-519.
56. Miller, K.D., Weaver-Feldhaus, J., Gray, S.A., Siegel, R.W., Feldhaus, M.J. (2005) Production, purification and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 42: 255-267.

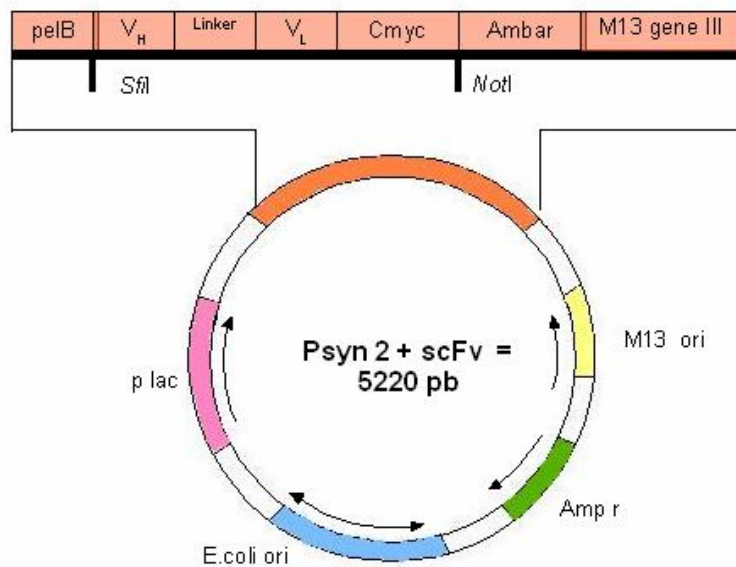
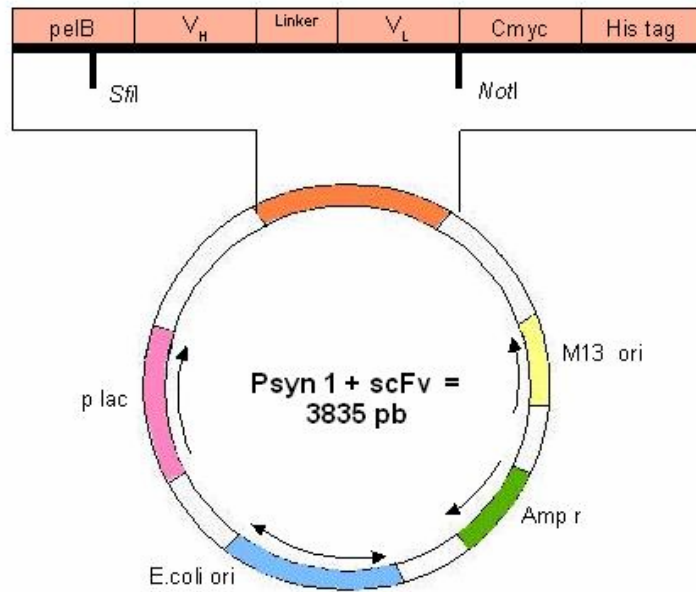
57. Guo, Q., Wei, D., Tong, W. (2006) Partial purification of human parathyroid hormone 1-84 as a thioredoxin fusion form in recombinant *Escherichia coli* by thermoosmotic shock. *Protein Expression and Purification*.
58. Gaberc-Porekar, V., Menart, V. (2001) Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49: 335-360.
59. Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368-379.
60. Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. 488-489, 498-502.
61. Levine, H. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease B-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2:404-410.
62. O'Nuallain, B., Hrcic, R., Wall, J.S., Weiss, D.T., Solomon, A. (2006) *The Journal of Immunology*, 176: 7071-7078.
63. Juárez-González, V.R., Riaño Umbarila, L., Quintero-Hernández, V., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Ortiz, E., Possani, L.D., Becerril, B. (2005) Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *Journal of Molecular Biology*, 346: 1287-1297.
64. Jung, S., Hogenner, A., Plüchthun, A (1999) Selection for improved protein stability by phage display. *Journal of molecular biology*, 294: 163-180.
65. Crouzier, R., Martin, T., Pasquali, J. (1995) Heavy chain variable region, light chain variable region, and heavy chain CDR3 influences on the mono- and polyreactivity and on the affinity of human monoclonal rheumatoid factors. *The Journal of Immunology*, 154: 4526-4535.
66. Amersdorfer, P., Wong, C., Smith, T., Chen, S., Deshpande, S., Sheridan, R., Marks, J.D. (2002) Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine*, 20: 1640-1648.
67. Kuci, H., Ebert, M.P., Rocken, C. (2007) Anti- λ -light chain-peptide antibodies are suitable for the immunohistochemical classification of AL amyloid. *Histology and Histopathology*, 22: 379-387.

ANEXO 1



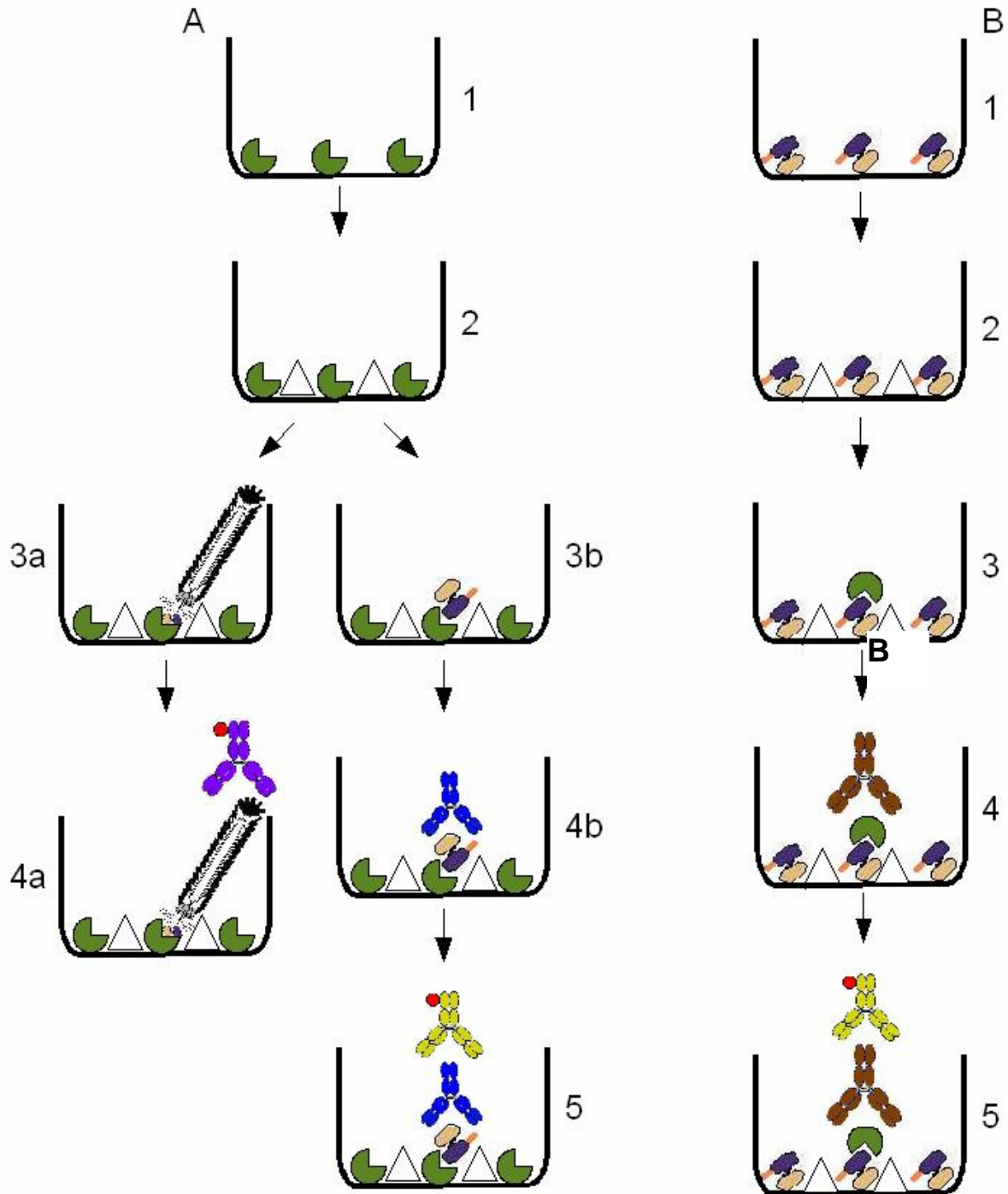
Proceso de generación de la biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla, fuente de aislamiento del anticuerpo 7D anti 6aJL2. Se aislaron linfocitos de sangre humana periférica. (A) De éstos se extrajo el RNA y utilizó posteriormente en un RT-PCR para la producción de cDNA. (B) Este molde, sirvió para generar la diversidad de secuencias de las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas. (C) En un segundo PCR se introdujo la secuencia del péptido unidor, para finalmente empalmar las secuencias (D) generando fragmentos variables de cadena sencilla. Riaño, U. L., tesis de doctorado.

ANEXO 2



Representación esquemática de los vectores utilizados para la expresión (pSyn1) y clonación (pSyn2) de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), en los paneles A y B respectivamente.

ANEXO 3



Procedimiento para la realización de los inmunoensayos enzimáticos. El panel A muestra el proceso seguido para la detección de los fago-anticuerpos o los anticuerpos solubles que reconocen el antígeno (fibrilla o monómero soluble 6aJL2). El paso 1 consiste en la inmovilización del antígeno, seguido de un bloqueo (2) para prevenir reconocimiento inespecífico. Posteriormente se adicionan los fago-anticuerpos (3a) o los anticuerpos solubles (3b), después los anticuerpos conjugados (4a y 5) para finalmente revelar con el sustrato (el reconocimiento del anticuerpo soluble, involucra la adición de un anticuerpo anti c-Myc adicional, que será identificado por el anticuerpo conjugado). En el panel B, se visualiza el proceso del ensayo de competencia, donde lo que se inmoviliza en la placa es el scFv seleccionado (1). La placa se bloquea (2), después se adiciona el antígeno (3) y posteriormente el Mab 55-5-F5 anti- $\lambda 6$. Enseguida se agrega el anticuerpo conjugado, para finalizar con la adición del sustrato.